

**Rolle der Mastzellen in der Chronischen Prostatitis und dem
Chronischen Beckenschmerzsyndrom**

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

vorgelegt von Schambeck, Rupert Michael
aus Regensburg

Gießen, 2019

Aus der Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie,
unter der Leitung von Prof. Dr. Florian Wagenlehner,
des Fachbereiches der Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. Florian Wagenlehner
2. Gutachter: PD Dr. Hans Ulrich Schmelz

Tag der Disputation: 17.9.2019

Abkürzungsverzeichnis

IBD	<i>inflammatory bowel disease</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BPH	benigne Prostata-Hyperplasie
CAF	<i>carcinoma associated fibroblasts</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CGI	CpG Insel
CP	<i>chronic prostatitis</i> <i>chronic prostatitis / chronic pelvic pain</i>
CP/CPPS	<i>syndrom</i>
CRP	C-reaktives Protein
CTMC	<i>connective tissue mast cell</i>
5-aza-CdR	5-Aza-2'-Desoxycytidin
DEPC	<i>Diethylpyrocarbonat</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA Methyltransferase
DTT	Dithiothreitol
EAE	autoimmune Enzephalomyelitis
ED	Erektile Dysfunktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESR	<i>Estrogen Receptor</i>
EtOh	Ethanol
FcER	Fc-Rezeptor
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPSS	Internationaler Prostata-Symptom-Score
LUTS	<i>lower urinary tract symptoms</i>
MBD	<i>methylation binding protein</i>
MC	<i>mast cell</i>
MCc	<i>mast cell chymase</i>
MCt	<i>mast cell tryptase</i>
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein 1</i>

MMC	<i>mucosal mast cell</i>
MS	Multiple Sklerose
NaOH	<i>Natriumhydroxid</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NP40	<i>Nonoxinal 40</i>
NIH	<i>National Institute of Health</i>
	<i>national institute of health chronic prostatitis</i>
NIH-CPSI	<i>symptom score index</i>
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCa	<i>prostate cancer</i>
PSA	prostata-spezifisches Antigen
rh-BMP2	rekombinantes BMP2
SDS	Natriumdodecylsulfat
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TLR	<i>toll-like-receptor</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
Chronische Prostatitis / Chronisches Beckenschmerzsyndrom (CP / CPPS)	1
CP/CPPS und Klassifikation	1
Diagnosestellung und Behandlungsmöglichkeiten	2
Pathogenetische Modelle der CP/CPPS	3
Entwicklung der chronischen Entzündung	4
Mastzellen	4
Mastzellen allgemein	4
Ursprung, Reifung und Differenzierung im Gewebe	6
Mastzellen und Entzündung	6
Mastzellen und die Chronifizierung von Schmerzen und Entzündung am Beispiel von CP/CPPS	9
Mastzellen und Östrogen	12
Mastzellen beim Prostatakarzinom (PCa) und der Benignen Prostata Hyperplasie (BPH)	12
Tryptase und andere Mastzellmarker	13
Epigenetische Veränderung in CPPS und Mastzellen	13
Epigenetische Mechanismen	13
Epigenetik in MCs und CPPS	16
Mastzellen und TGFB	17
BMP2, BMP6 und BMP7	19
Zielsetzung	20
Material und Methoden	22
Material	22
Proben	22
Einverständniserklärung und Ethikvotum	23
Chemikalien	23
Reagenzien und Puffer	23
Geräte	25
Gebrauchswaren	26
Pyrosequenzier-Primer	27
Tryptasemessung	27
Methoden	28
Proben-Sammlung und Aufbau der Biodatenbank	28
Gesunde Kontrollgruppe	30

Zelllinien	30
Tryptasemessung	31
Tryptase allgemein und als Mastzellmarker	31
Messtechnik des ImmunoCap Tryptase 250	32
Meine Messung. Anzahl Patienten, Gesunde, Fehlschlagen der Messung im Urin	32
Pyrosequenzierung	34
Epigenetik, CpG-Inseln, Promotorregionen und Methylierungen	34
DNA-Extraktion	34
Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	35
Bisulfit-Konvertierung	36
Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Pyrosequenzierung	38
Überprüfung der Pyrosequenzierung-PCR auf Agarosegel	40
Pyrosequenzierung	42
Auswertung der erhobenen Daten	50
Ergebnisse	51
Beschreibung der Gesamt-Kollektives	51
Ergebnisse der Tryptase-Messungen	53
Vergleich der Tryptasekonzentrationen von Patienten mit CP/CPPS und Gesunden	54
Vergleich der Tryptasewerte von Patienten mit CPPS3a und Gesunden	55
Vergleich der Tryptasewerte von Patienten mit CPPS3b und Gesunden	56
Vergleich der Tryptasewerte von Patienten mit CPPS3a und Patienten mit CPPS3b	56
Vergleich der Tryptasewerte von Patienten mit CPPS und Gesunden	57
Korrelationen der Tryptase mit klinischen Parametern	58
Ergebnisse der DNA-Methylierungsanalysen	62
Allgemeine Messung und Patientendisposition	62
Methylierung des <i>BMP2</i> Promotors	65
Methylierung des <i>BMP6</i> Promotors	69
Methylierung des <i>BMP7</i> Promotors	72
Methylierung des <i>TGFB2</i> Promotors	76
Auswertung der Median-Werte anstelle der Mittelwerte	81
Korrelationen und Assoziationen der Methylierungen	83
Methylierungsanalysen in den Zelllinien	84
Diskussion	88
Untersuchungen zu Tryptasespiegel in CP/CPPS Patienten und Kontrollen	88
Systemische Messung der Tryptase	88
Korrelation der Tryptasespiegel mit Entzündungsparametern und Hormonen	89
Tryptasemessung im Exprimaturin	89

CP/CPPS und Tryptase in der Literatur und weiterer Ausblick	89
Systemische Tryptasewerte weisen ein breites Referenzspektrum auf	90
Tryptasewerte und die Altersverteilung der Kohorten	90
DNA-Methylierungsanalysen im Vergleich.....	91
Systemische Messung der DNA-Methylierung.....	91
Unterschiede zwischen gesunden Kontrollen und CP/CPPS Patienten.....	91
Detaillierte Betrachtung einzelner Stellen der untersuchten Promoter und möglicher Zusammenhang mit Estrogen.....	92
Korrelationen und Assoziationen der Methylierungen.....	93
Methylierungen der untersuchten Gene in PCa-Zellreihen PC3, DU145, LnCaP	94
Methylierungen der mit Östrogen behandelten Mastzelllinien HMC-1 und LAD2.....	94
Erkenntnisse aus den Fragebögen	95
Zentrale Schwäche der Arbeit: Aufbau der Patienten-und Kontroll-Kohorten.....	95
Zusammenfassung	95
Summary	97
Literaturverzeichnis.....	100
Anhang	119

Einleitung

Chronische Prostatitis / Chronisches Beckenschmerzsyndrom (CP / CPPS)

CP/CPPS und Klassifikation

Die Prostata ist ein vulnerables Organ. Drei Krankheitsentitäten spielen eine führende Rolle: Die Benigne Prostat hyperplasie (BPH), die bei 90% der Männer über 80 Jahre prävalent ist (Berry et al. 1984), das Prostatakarzinom (PCa), von dem ungefähr jeder zehnte Mann im Laufe seines Lebens betroffen ist (National Institute of Health et al. 2018), und die Chronische Prostatitis / Chronische Beckenschmerzsyndrom (CP/CPPS), ein bislang noch nur unzureichend verstandenes Krankheitsbild. CP/CPPS ist ein chronisches Schmerzsyndrom des Mannes, das von Missempfindung und Schmerzwahrnehmung in Becken, Perineum, Skrotum, Rektum und den Testis begleitet ist (Wagenlehner et al. 2013), ((Breser et al. 2017). Hinzu kommen oftmals Schmerzen bei der Ejakulation, im Bereich der lumbalen Wirbelsäule und im Abdomen. Häufig sind diese Symptome mit Lower Urinary Tract Symptoms (LUTS) und Erektile Dysfunktion (ED) vergesellschaftet (Wenninger K. et al. 1996). Zudem scheint CP/CPPS negativen Einfluss auf die Fertilität zu haben (Wagenlehner et al. 2013), (Schagdarsurengin et al. 2017). (Fu et al. 2014) berichten in ihrem Review von geringerer Spermienkonzentration, eingeschränkter Motilität und morphologischen Defiziten. Die Symptome der CP/CPPS sollten nach Diagnosebedingungen mindestens drei Monate in den vergangenen sechs Monaten bestanden haben, zugleich vergeht aber auch häufig eine sehr lange Zeit bis zur Diagnosestellung (Smith 2016). CP/CPPS ist die häufigste urologische Erkrankung von Männern unter 50 Jahren. Jeder sechste Mann weltweit leidet an einem CP/CPPS (Krieger et al. 1999). 8% aller urologischen Konsultationen und 1% der Allgemeinarztbesuche sind auf eine Prostatitis zurückzuführen (Mary Mcnaughton Collins et al. 1998). Für Betroffene ist die Erkrankung eine Last, da die Empfindung der Krankheitsschwere durchaus der eines kardialen Infarktes, einer kardialen Angina oder der eines Morbus Crohn äquivalent ist (Wenninger K. et al. 1996). Die Klassifikation der Prostatitis erfolgt im praktischen Klinikalltag nach der Einteilung des National Institutes of Health (NIH) und teilt in vier Kategorien ein (Krieger et al. 1999):

Einleitung

Akute bakterielle Prostatitis (NIH I)

Chronische bakterielle Prostatitis (NIH II)

Chronische Prostatitis / Chronisches Beckenschmerzsyndrom (CP/CPPS) (NIH III)

CP/CPPS IIIa: nicht entzündlich

CP/CPPS IIIb: entzündlich

Asymptomatische Prostatitis

Diagnosestellung und Behandlungsmöglichkeiten

Während bei den infektiösen Prostatitis-Erkrankungen eine nachvollziehbare Ursache der Erkrankung vorliegt, der mit der anti-infektiösen Therapie der ursächlichen Erreger begegnet werden kann, ist die Diagnosestellung und Behandlung der CP/CPPS ungleich diffiziler. Andere urologische Erkrankungen müssen demnach vorerst durch ausführliche Diagnostik ausgeschlossen werden (Magistro et al. 2016). Die Diagnostik der Patienten in der Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie, der Justus-Liebig Universität Giessen erfolgt ambulant in einer speziellen Prostatitis-Sprechstunde. Hier durchlaufen die Patienten eine ausführliche Anamnese und Einordnung der Beschwerden mittels spezieller Fragebögen. Darunter sind der Internationale Prostata Symptom Score (IPSS), National Health Institut Chronic Prostatitis Symptom Index (NIH-CPSI), der Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS), der Pelvic Pain and Urgency/Frequency Patient Symptom Scale (PUF), der Internationale Index der erektilen Dysfunktion (IIEF) und der Sexual Function Index (SFI). Zudem erfolgt eine körperliche Untersuchung, die auch eine Palpation der Prostata beinhaltet. Es folgt eine Ultraschalluntersuchung der ableitenden Harnwege und der Prostata. Zur Infektions- und Entzündungsuntersuchung erfolgt eine 2-Gläser-Probe, sowie eine Ejakulatuntersuchung. Die Therapie erfolgt entlang eines Phänotypisierungssystems, dem U-POINT(S)-System. Dies ermöglicht „[...] für Patienten mit bereits gestellter Diagnose CP/CPPS und [interstitieller Zystitis] IC eine klinisch relevante Phänotypisierung, die rational die Therapie anleiten kann“ (Daniel Shoskes MD 2009). Diese Modalitäten sind harntraktspezifisch, psychosoziale, organspezifische oder infektiöse Aspekte, neurologisch-systemische Verfassung und der Zustand der Beckenbodenmuskulatur (Shoskes et al. 2009). Die Anzahl der betroffenen Phänotypen korreliert gut mit dem NIH-CPSI. Das Hinzufügen einer weiteren sexuellen Domäne zeigte eine weitere Verbesserung dieser Korrelation (Magri et al. 2010)

Einleitung

Die komplexe Pathophysiologie des CP/CPPS ist sehr heterogen, sodass multimodale Therapieansätze einen vielversprechenden Ansatz darstellen. Laut (Passavanti et al. 2017) ist diese Krankheit häufig auch von psychosozial belastenden Symptomen begleitet, mit „[...] negativen kognitiven, sexuellen und emotionalen Konsequenzen.“ Patienten mit CP/CPPS zeigen, wie andere chronische Schmerzpatienten auch, Auffälligkeiten in der neuroradiologischen Bildgebung (Apkarian et al. 2009), neuropathische Schmerzen sind in dieser Krankheit möglich und können entsprechend mit Antikonvulsiva oder Antidepressiva behandelt werden (Strauss und Dimitrakov 2010).

Frustration und verminderte Lebensqualität sind verbreitet (Breser et al. 2017). Psychosoziale und kognitiv-behaviorale Faktoren wie Hilflosigkeit, Katastrophendenken und Schmerzbedingte Pausen sind verbreitete Erfahrungen und auch Prädiktoren für den Schmerz der Patienten (Smith 2016) die auch depressive Symptome zeigen (Strauss und Dimitrakov 2010). Laut (Wesseley S. et al. 1999) erfüllt CP/CPPS auch die Kriterien eines funktionellen somatischen Syndroms. Des Weiteren zeigte sich, dass auch in der bakteriellen Prostatitis die Symptome über die Erregereradikation mit Antibiotika hinaus häufig persistieren (Bjerklund Johansen und Weidner 2002, S. 64).

Pathogenetische Modelle der CP/CPPS

Da die historisch vermutete Ursache der Erkrankung eine Infektion darstellt, erfolgte lange Zeit eine empirische Behandlung mit Antibiotika. Die Beschwerden einer bakteriellen Prostatitis vermögen jedoch auch nach Erregereradikation zu persistieren (Wagenlehner et al. 2009), (Nickel et al. 2013), (Breser et al. 2017). Ein weiterer Erklärungsansatz ist die Dysfunktion und Empfindlichkeit der Beckenboden-Muskulatur. So wurden bei CP/CPPS Patienten Triggerpunkte und Muskelkrämpfe in der direkten muskulären Umgebung der Prostata nachgewiesen (Polackwich AS 2016). Aber ob nun die Muskelspasmen Ursache oder Folge der eigentlichen Erkrankung sind, ist unklar (Breser et al. 2017).

Ein dritter Erklärungsansatz ist die chronische Entzündung. Ob nun als Antwort auf eine tatsächlich stattgefundene Infektion und fehlgeleitet chronifiziert, oder als autoimmune Erkrankung. Laut des Reviews von (Breser et al. 2017) finden sich Beweise für eine floride autoreaktive Entzündung der Prostata: autoreaktive T-Zellen (Richard B.Alexander et al. 1997), gerichtet gegen Prostata-eigene (Kouiavskaia et al. 2009) und

Einleitung

Seminalplasma-interne Proteine (Batstone et al. 2002), IgG gerichtet gegen das Prostata-spezifische Antigen (PSA) (Dunphy et al. 2004), sowie IgA und IgM ohne Infekt-Spezifikation (Doble et al. 1990). Auch seien erhöhte prostatistische Leukozyten- und T-Zell-Infiltration und erhöhte Mengen an Immunglobulinen und Leukozyten (darunter Granulozyten, Makrophagen, B- und T-Zellen) in Prostata-Fluiden und Exprimaturin (John et al. 2001; Ludwig et al. 2001) bereits aufgezeigt. Auch wird von erhöhten Werten von Cytokinen, Chemokinen und Mastzellmediatoren im Seminalplasma berichtet (John et al. 2001; Rivero et al. 2007). Es scheint der IL-8-Spiegel im Seminalplasma mit der Symptomschwere zu korrelieren (Penna et al. 2007) und viele Studien fanden einen erhöhten Interleukin-1 β -Spiegel im Prostatasekret der Patienten. (Robert B. Nadler et al. 2000; Yang et al. 2004). Dies alles deutet auch auf eine autoimmune chronische Entzündung hin.

Entwicklung der chronischen Entzündung

Als potentieller Auslöser und Initiator der Chronifizierung der Entzündung rückt zunehmend die Mastzelle in den Focus. So zeigte sich, dass die Mastzelle durchaus in der Lage ist autoinflammatorische Antworten in autoentzündlichen Erkrankungen zu dirigieren (Maurer und Pucillo 2018). Dieser Nachweis wird zunehmend auch in anderen chronischen Erkrankungen, wie zum Beispiel der Arthritis (David M. Lee et al. 2002) und in intestinalen Entzündungen (Frossi et al. 2018,) erbracht. Auch scheint die Rolle von Östrogen und Östrogen-Rezeptoren abklärungsbedürftig. So wurden erhöhte 17- β -Östradiol-Spiegel im Seminalplasma und minderexprimierte Östrogenrezeptoren 1 und 2 (ESR1, ESR2 von Patienten mit CP/CPPS) in Leukozyten im Ejakulat gefunden (Nesheim et al. 2018). Erhöhte Östrogenspiegel zeigten hier auch direkten Einfluss auf die Epigenetik von Mastzelllinien in vitro. Nähere potentielle Mechanismen sind detaillierter im Absatz unter Mastzellen aufgeführt.

Mastzellen

Mastzellen allgemein

„Von Mastzellen wird behauptet, sie besäßen mehr Rezeptoren als jede andere Zelle des menschlichen Körpers, und keine andere Zelle würde in ähnlichem Umfang Mediatoren produzieren wie sie“ (Maurer und Pucillo 2018, S. 5). Hieran ist ersichtlich, dass die Mastzelle wohl lange Zeit auf ihre tragende Rolle bei allergischen und anaphylaktischen Reaktionen reduziert wurde. Heutzutage sind viele weitere Aufgabenfelder und mögliche

Einleitung

Prozessbeteiligungen bekannt: So haben Mastzellen eine essentielle Rolle in der Wundheilung, aber auch bei der Regulierung von Fibroblasten (Frossi et al. 2018, S. 38). Ihnen wird vor allem im Gastro-Intestinaltrakt neben Aufgaben in der Immunität auch Verantwortung für die Epithelienstruktur zugeschrieben. Aufgrund ihres meist direkten Kontaktes zu Nervenendungen ist der Einfluss auf neuroimmune Reaktionen der Eingeweide naheliegend und aufgezeigt (Schemann und Camilleri 2013; Buhner und Schemann 2012). Auch werden Mastzellen heute als eine Art „Wächter“ verstanden, der bei Pathogenkontakt Immunantworten einleiten und regulieren kann (Maurer und Pucillo 2018, S. 6).

Mastzellen beeinflussen Muskelzellen des Herzens und in den Atemwegen, des Verdauungstraktes und der Blutgefäße. (Rivera 2006; Krystel-Whittemore et al. 2015) Sie wirken nicht nur auf Epithelzellen ein, sondern auch auf Drüsen. Und sie vermögen Leukozyten zu rekrutieren (Marshall 2004; Maurer und Metz 2005) und teilweise in ihrer Ausprägung zu beeinflussen. Darunter sind Neutrophile, Eosinophile, Basophile, Monozyten, Makrophagen, T-Zellen und Dendritische Zellen. (Metz und Maurer 2007; Krystel-Whittemore et al. 2015).

Mastzellen werden zunehmend in Zusammenhang mit Krankheiten beschrieben: So modellieren sie allgemein bei neurogenen Entzündungen Schmerz und Juckreiz (Gupta und Harvima 2018). Chymase, eine Mastzellprotease scheint profibrotische Eigenschaften bei Lungenfibrose und hypertrophen Narbenbildungen zu haben (Chen et al. 2017,). Martino et al. 2015 fanden eine erhöhte Mastzellinfiltration im Pankreas von Patienten mit Diabetes Mellitus Typ I. In der Arthritis des familiären Mittelmeerfiebers findet sich eine erhöhte Mastzellinfiltration, im Schnitzler Syndrom wurde erhöhte dermale Mastzellaktivität nachgewiesen, ebenso in Hautläsionen der Psoriasis (Christophers et al. 2014). Da Mastzellen in diesen Läsionen frühzeitig präsent sind und zur T-Zell vermittelten Immunantwort beitragen (Tilo Biedermann et al. 2000) sieht Bonnekoh et al. 2018) sie als möglichen Vermittler zwischen akuter und chronischer Phase der Erkrankung. Weitere der in diesem Review genannten Modellerkrankungen lassen sich im Tierversuch in Mastzell-defizienten Mäusen nicht oder nur erschwert etablieren (Kinet 2007). Dazu zählt die Autoimmune Encephalomyelitis (EAE), eine Modellerkrankung für Multiple Sklerose (MS) (Secor et al. 2000). Hier scheint eine über Mastzellen regulierte T-Zellaktivität mit das Krankheitsausmaß zu regulieren (Russi et al. 2018). Eine weitere Modellerkrankung, bei der Mastzellen eine ursächliche Rolle

Einleitung

spielen, ist die entzündliche Arthritis (David M. Lee et al. 2002). Auch in der Kontaktdermatitis, die bekanntermaßen eine Typ-IV Reaktion vom Spättyp ist, lässt sich im Mausmodell effektiv eine Limitierung der Entzündungsreaktion mittels Unterdrückung der Mastzellen erreichen (Bonnekoh et al. 2018).

Ursprung, Reifung und Differenzierung im Gewebe

Vorläuferzellen der Mastzelle entstammen der myeloischen Reihe aus Knochenmark und Milz. Diese Vorläuferzellen werden durch Integrine und Chemokine an ihren Bestimmungsort im Gewebe durch das vaskuläre Kompartiment geleitet. Im Gewebe reifen sie aus. Lokale Entzündung bewirkt eine erhöhte Mastzellrekrutierung (Jenny Hallgren, Michael F. Gurish 2007, S. 1). Mastzellen sind in nahezu allen vaskularisierten Geweben präsent und ihre direkte Umgebung wirkt auf ihre endgültige Differenzierung ein. Eine statistische Häufung findet sich in den Extremitäten, speziell an Händen und Gesicht. Weiterhin auch an Oberflächen mit häufigem Antigenkontakt, dazu zählen auch Lunge und Verdauungstrakt (Galli et al. 2011). Mastzellen zirkulieren nicht, Sie sind aber auch nicht vollkommen statisch an einen Ort gebunden. Sie vermögen zum Beispiel in Lymphknoten abzuwandern (Frossi et al. 2018). Historisch wurden Mastzellen mithilfe ihres Proteasegehalts in zwei Typen unterteilt: Mastzellen mit überwiegend Tryptase (MCt) oder mit überwiegend Chymase (MCc). Im Mausmodell wurde häufig die Connective Tissue Mastzelle (CTMC) von der Mucosal Mastzelle (MMC) unterschieden, diese unterscheiden sich hauptsächlich im Heparin Gehalt (Frossi et al. 2018). Frossi et al. 2018 postuliert nun aufgrund der in unterschiedlichen Organen von Mastzellen entwickelten spezifischen Eigenschaften wie Gehalt der Granula, Rezeptorexpression und Genexpression eine Klassifikation nach Organen.

Mastzellen und Entzündung

Die Mastzelle wurde erstmals von Paul-Ehrlich beschrieben als „gemästete Zelle“, da sie lichtmikroskopisch durch ihre Anfärbbarkeit mit basophilen Farbstoffen und einem stark gekörnten Zytoplasma auffällt. Die Körnung im Zytoplasma stellt multiple Vesikel dar, die eine Reihe von Mediatoren beinhalten.

„Mastzellen können aktiviert werden um vorgefertigte und/oder neusynthetisierte Produkte zu degranulieren. Die Freisetzung dieser Mastzell-Produkte kann zahlreiche Effekte auf andere Zelltypen, auf Pathogene und auf endogene oder exogene Peptide

Einleitung

haben, was zu einer verbesserten angeborenen und/oder erworbenen Immunantwort führen kann.“ (Metz und Maurer 2007, S. 235)

Mastzellen sind phylogenetisch ältere Zellen als andere Immunzellen. Eine Teilnahme an Entzündungsprozessen, zum Beispiel gegen Parasiten, ist bekannt (Kinet 2007). Sie vermögen vielfältige Funktionen auszuüben, die sie über Mediatoren vermitteln (Abbildung 1)(Abbildung 2). Darunter sind Entzündungsmediatoren wie Histamin, Leukotriene, und andere, wie Serotonin und Proteasen wie Tryptase, sowie der Nerve Growth Factor (NGF) (Eine Übersicht bietet Abbildung 1). Diese Stoffe können in Granula eingelagert werden und durch eine Stimulation über Chemokine wie MCP-1 und MCP-2 freigesetzt werden (Done et al. 2012). Auch Tumor Nekrose Faktor Alpha (TNF α) wird unter anderem von Mastzellen produziert und freigesetzt (Eklund 2007). Eine Aktivierung der Mastzelle kann via IgE-Rezeptoren erfolgen, ein Antigenkontakt führt dann zur Degranulation (Done et al. 2012; Galli et al. 2011). Über die Aktivierung ebenso exprimierter Toll-Like-Rezeptoren (TLR) erfolgt eine Sekretierung von Zytokinen, Chemokinen und Lipidmediatoren, aber nur in geringem Maße eine Degranulation (Galli et al. 2011). Weitere Liganden, die eine Degranulation bewirken, sind Neuropeptide, die Komplemente C3a und C5a sowie manche Gift-Strukturen (Galli et al. 2011). Freigesetzte Metalloproteasen zerstören Umgebungsstrukturen und/oder Parasiten und/oder Gifte, Chemokine locken weitere Immunzellen an. Wie bereits oben erwähnt ist die Mastzelle in der Lage, Einfluss auf diese auszuüben. Dies betrifft nicht nur deren Rekrutierung, sondern auch teilweise deren Ausreifung und Aktivierung (Metz und Maurer 2007). Des Weiteren kann die Umgebung der Mastzelle wie zum Beispiel Nervenenden und Endothelien durch Mediatoren direkt beeinflusst werden: Über Histamin und Prostaglandine und NGF werden Nerven für Schmerzen sensibilisiert. Im Falle einer Degranulation wird unter anderem auch Heparin und Histamin freigesetzt, dadurch stellen sich die Gefäße weit und die Diapedese wird durch Lockerung des Endothels für Leukozyten vereinfacht (Krystal-Whittemore et al. 2015). Es kommt zur sichtbaren Rötung und Schwellung des Gewebes. Zusammenfassend lässt sich formulieren, dass „die Fähigkeit der Mastzelle, ihre Antwort in Abhängigkeit vom erhaltenen Stimulus zu kalibrieren, aufzeigt, dass die Mastzelle nicht nur den Beginn sondern auch die Amplifikation, Erweiterung und das Beenden der Immunantwort regulieren kann.“ (Frossi et al. 2018, S. 35)

Einleitung

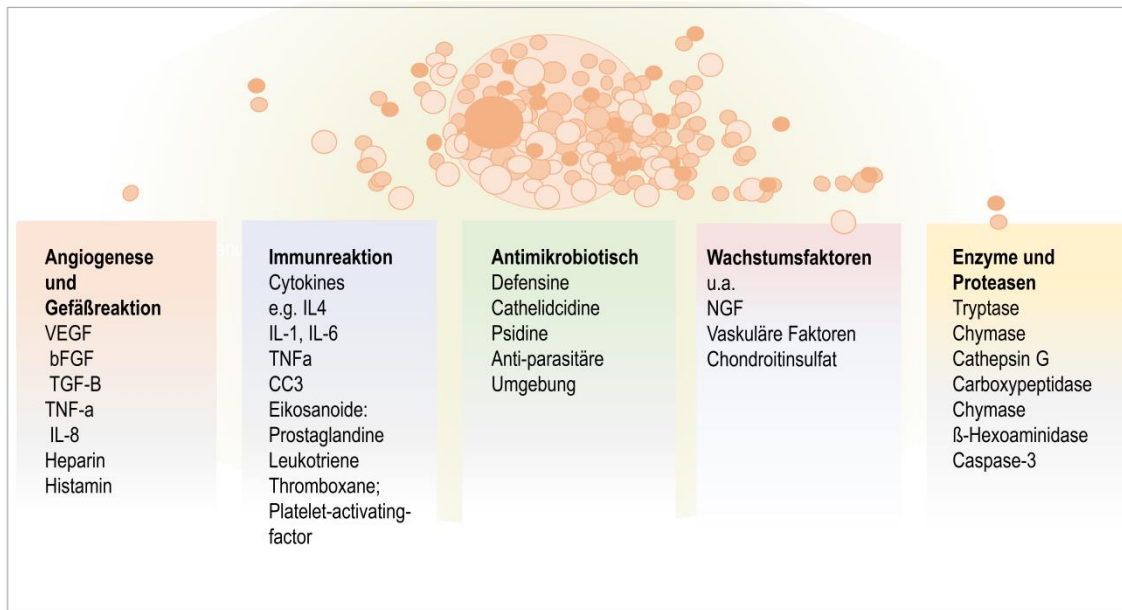


Abbildung 1 zeigt einen Überblick über die Mastzellmediatoren. (Krystel-Whittemore et al. 2015; Metz und Maurer 2007).

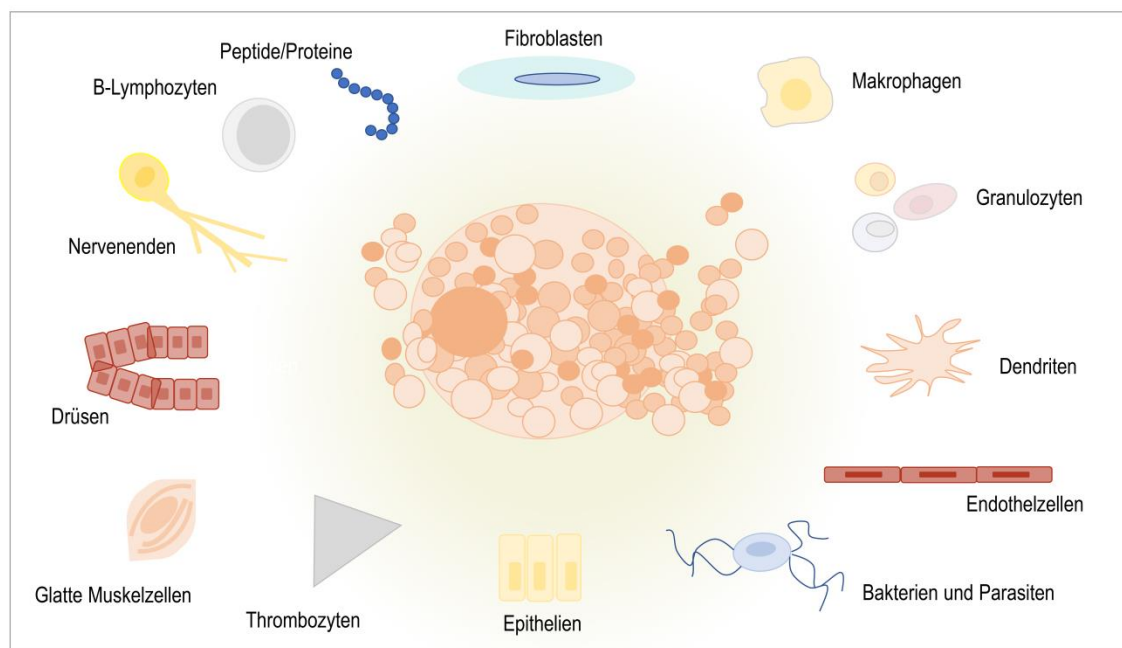


Abbildung 2 zeigt einen Überblick über die Zelltypen die einer Beeinflussung durch Mastzellen unterliegen (Metz und Maurer 2007; Krystel-Whittemore et al. 2015)

Hinweise darauf, dass Mastzellen Entzündungs-initierende und regulierende Funktionen haben, ergeben sich auch aus folgenden Erkenntnissen im Mausmodell: Das gängigste Multiple Sklerose-Modell, die Experimentelle Allergische Enzephalomyelitis (EAE) lässt sich in Mastzell-defizienten Mäusen nicht etablieren oder in nur sehr viel geringerem Umfang. Nach einer Rekonstitution der Mastzellpopulation steht die Schwere der

Einleitung

Ausprägung der Krankheit der Wildtyp Mäusen in nichts nach (Secor et al. 2000). Sehr ähnlich verhält es sich mit dem Mausmodell für Arthritis (Kinet 2007).

Mastzellen und die Chronifizierung von Schmerzen und Entzündung am Beispiel von CP/CPPS

Mastzellen besitzen das Potential eine autoimmune Entzündung zu unterhalten. (Breser et al. 2017) postulieren ein mögliches Modell der chronischen Prostatitis geprägt durch neuronale Sensibilisierung und potentielle Mastzellaktivität als Erklärung für das chronische Beckenschmerzsyndrom: Eine anfangs stattfindende Gewebeschädigung löst eine Entzündungsreaktion aus, die in der Ausschüttung von Chemokinen und Zytokinen durch Mastzellen weitere Leukozyten hinzuzieht. Weitere ausgeschüttete Lipidmediatoren wirken vasoaktiv und inflammogen (Kabashima et al. 2018). Durch die andauernde Ausschüttung von Entzündungsmediatoren und lokalen Gewebeschäden, inklusive Nervenschäden und Nervenstimulation kann es zu einer Schmerzhypersensibilisierung kommen (Scholz und Woolf 2007), die nachweisbar und auch bei anderen chronischen Schmerzpatienten bekannt ist (Apkarian et al. 2009). Eine Hypersensibilisierung betrifft auch Patienten mit chronischer Prostatitis (Korkmaz et al. 2015). Weitere neuroradiologische Veränderungen weisen Ähnlichkeiten zu anderen chronischen Schmerzpatienten auf (Loeser und Melzack 1999) können aber auch charakteristische Merkmale im MRT des Gehirns haben (Farmer et al. 2011). Es kommt zu entzündungsbedingten, aber auch neuropathischen Schmerzen (Strauss und Dimitrakov 2010; Potts und Payne 2007). Diese können sich in Allodynie, Hyperalgesie und spontanem Schmerzempfinden äußern, und könnte bei Patienten mit CP/CPPS zu einer neurogenen Entzündung führen (Breser et al. 2017; Malykhina 2007); (Chen et al. 2005). Diese wird durch Substanz P, Calcitonin Gene-related Peptide and NGF aus Nervenenden unterhalten und die Degranulation der Mastzellen scheint eine essentielle Rolle bei der Unterhaltung dieser Entzündung innezuhaben. (Malykhina 2007; Andrews et al. 1989; Jasmin et al. 2000). So bringen Substanz P (Kulka et al. 2008), und andere Neuropeptide die Mastzellen zur Degranulation (Bienenstock et al. 1987). Nach (Meyer-Siegler und Vera 2004) scheinen aber auch weitere Mediatoren für die Verstärkung und Fortbestand der durch Substanz P induzierten Entzündung von Nöten zu sein.

Für die Betrachtung der Mastzelle als zentral organisierende Entzündungszelle einer lokalen Entzündung, die für Initialzündung, Progression und Unterhaltung sowie für die neuronale Aktivierung verantwortlich ist, berufen sich (Breser et al. 2017) auf die

Einleitung

Zusammenfassung bisheriger Erkenntnisse im Review von Metz und Maurer 2007, Sayed et al. 2008 und Walker et al. 2012 (Abbildung 3).

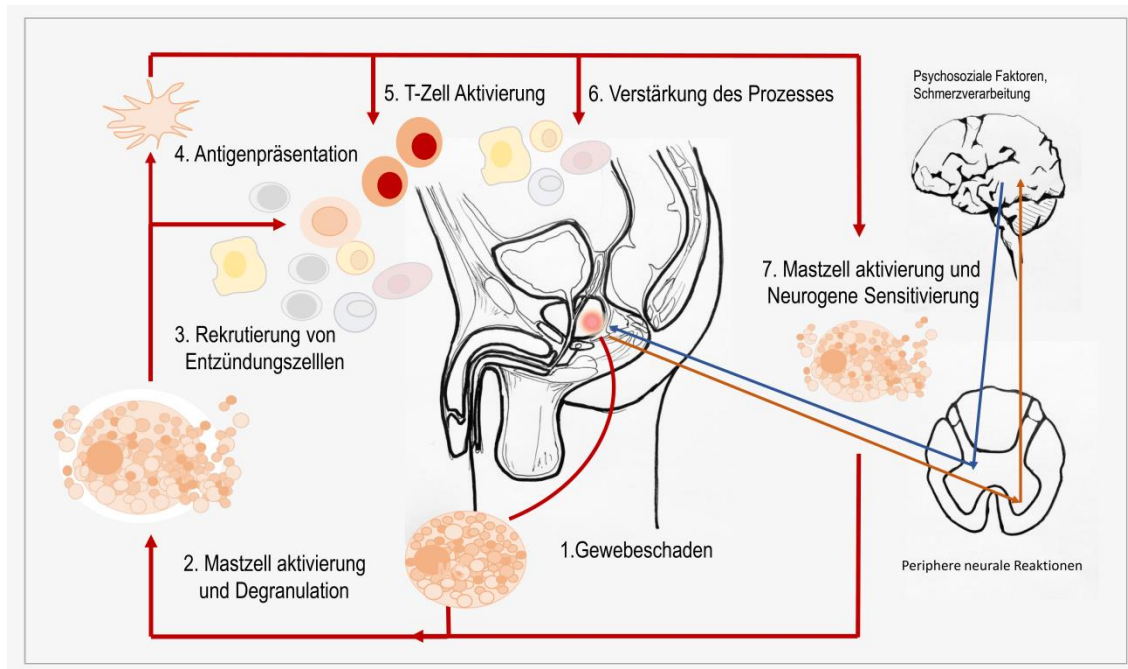


Abbildung 3 : nach (Breiser et al. 2017): postulierte Erkrankungsschema.

Der Review von Bonnekoh et al. 2018 erläutert die Rolle der Mastzelle im Konzept der Autoinflammation (Abbildung 4): Eine gegen körpereigene Strukturen gerichtete Entzündung des angeborenen Immunsystems. Auch hier wird die Mastzelle als möglicher Verursacher und Promoter des Entzündungsgeschehens vermutet. Die Autostimulation könnte über Interleukin-1B (IL-1B) erfolgen: Dieses Cytokin ist ein potenter Entzündungsmediator und Pyrogen (L. J. Rosenwasser und C. A. Dinarello 1981). Auch Mastzellen sezernieren IL-1B aus dem Vorläuferprotein bei Aktivierung oder Stimulation (Burd et al. 1989; Grabbe et al. 1994; Möller et al. 1998). Dies wird in sogenannten Inflammasomen, abhängig von Caspasen, geschnitten (Nakamura et al. 2009). Aber auch Mastzellproteasen wie Trypsin besitzen das Potential das Vorläuferprotein zu schneiden (Afonina et al. 2015; Stehlik 2009). Dies könnte in Entzündungen auch außerhalb der Zellen geschehen, da pro-IL-1B aus apoptotischen Zellen freigesetzt werden kann (Bonnekoh et al. 2018). Auch zeigen verschiedene Studien wie (Stehlik 2009; Kono et al. 2012) die wichtige Rolle dieses alternativen Pathways über Proteasen wie Chymase und Cathepsin G auf. IL-1B ist nun andererseits auch ein Stimulanz für Mastzellen, die daraufhin Histamin und Entzündungsmediatoren wie IL-6, IL-8 und IL-13 freisetzen (Subramanian und Bray 1987; Chi et al. 2004; Kim et al. 2010). Andere Untersuchungen

Einleitung

zeigen eine verstärkte Produktion von IL-3, IL-5, IL-6, IL-9 und TNF bei Stimulation mit IL-1 β als Antwort auf eine Stimulation des IgE-Rezeptors (Hültner et al. 2000). Gleiches gilt für Leukotriene-C4, und die Prostaglandine-G2 Produktion in FcERi-stimulierten Mastzellen (Salari und Chan-Yeung 1989). Auch erhöht IL-1 β die NO-Freisetzung in Mastzellen und vermindert die des Plättchenaktivierenden Faktors (Hogaboam et al. 1993).

Dieser Befund ist interessant, da zahlreiche Studien an Prostata-abhängigen Flüssigkeiten von Patienten mit CP/CPPS erhöhte Spiegel von IL-1 β nachweisen konnten. (Guo et al. 2010; Orhan et al. 2001; Yang et al. 2004; Robert B. Nadler et al. 2000; Richard B. Alexander et al. 1997).

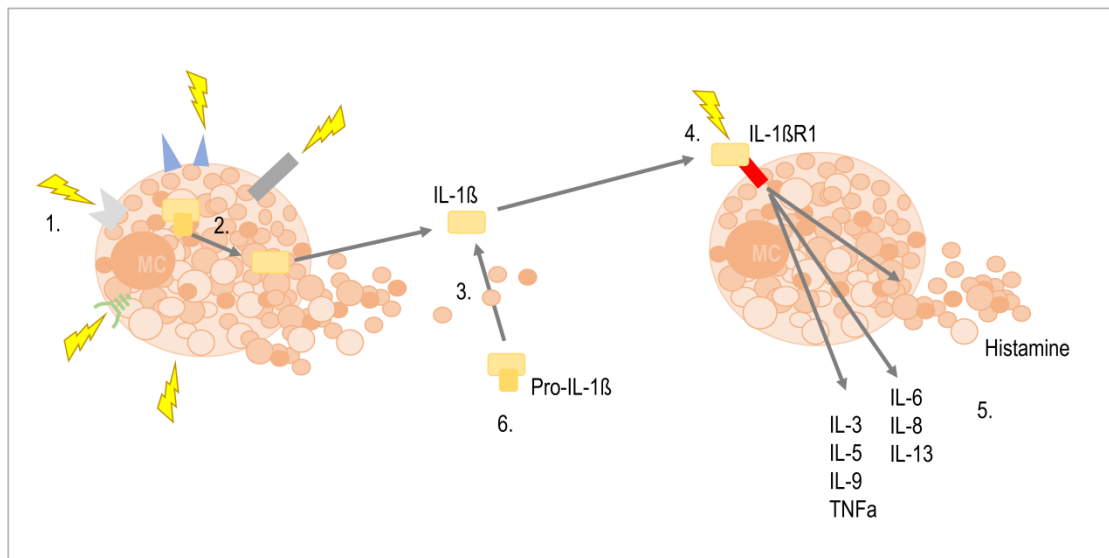


Abbildung 4 stark vereinfacht nach Bonnekoh, Scheffel et al. Mastzellen Emission und Reaktion auf IL-1. Stimulation und Aktivierung der MC über TLR, Substanz P, etc. (1). Schneiden von Pro-IL-1 β in IL-1 β und Freisetzen (2). Freies Pro-IL-1 β kann durch MC-Proteasen wie Chymase und Cathepsin G in Reifes geschnitten werden (3). „Durch Aktivierung des IL-1-Rezeptors (4) erfolgt eine Freisetzung von Histamin und bestimmten Cytokinen [...]. Des Weiteren erhöht es die die Zytokin-, Leukotriene-C4, und die Prostaglandine-G2 Produktion (5) in FcERi-stimulierten MCs und die spontane NO-Synthese, was wiederum die Freisetzung des Plättchen-aktivierenden Faktors hemmt.“ (Bonnekoh et al. 2018) Pro-IL-1 β könnte durch apoptotische Zellen in Entzündungen in erhöhten Maßen vorkommen (Bonnekoh et al. 2018) (6).

Kinet 2007 postuliert die Mastzelle als zentrales Element der Hygiene-Hypothese: Eine in der westlichen Zivilisation nahezu arbeitslos gewordene Entzündungszelle mit dem Potential Entzündungsgeschehen umfassend zu modellieren reagiert nun übersensitiv auf Stimuli und ist verantwortlich für die Zunahme an Autoimmunerkrankungen wie Atopie,

Einleitung

Ekzemen, Asthma, Multipler Sklerose, Diabetes Mellitus Typ I und entzündlichen Darmerkrankungen (Guarner et al. 2006).

Mastzellen und Östrogen

Mastzellen wurden mehrfach mit der Pathogenese des CP/CPPS in Verbindung gebracht (Nesheim et al. 2018), (Done et al. 2012; Breser et al. 2017; Bjerklund Johansen und Weidner 2002). Done et al. 2012 wiesen explizit im Vergleich zu Gesunden, erhöhte Tryptasewerte, ein für Mastzellen nahezu unikates Protein, im Ejakulat von Patienten mit CP/CPPS nach. Jedoch ist die Studienteilnehmerzahl leider sehr gering. Zudem zeigten sich Mastzellen auch als reagibel auf Östrogen (Ellem et al. 2014). Auch zeigten (Nesheim et al. 2018) ein verändertes Cytokin- und Chemokin-Expressionsspektrum von zwei Mastzelllinien HMC-1 und LAD2 unter Östrogeneinfluss, was speziell in HMC-1-Zellen zu einer verminderten Transkription von Entzündungsgenen führte. Zudem zeigten sich in dieser Arbeit erhöhte Östrogen-Spiegel im Seminalplasma der Patienten mit CP/CPPS, was eine direkte Verbindung vermuten lassen könnte. Studien zum Steroidhormon-Haushalt bei Patienten mit CP/CPPS sind jedoch widersprüchlich (Nesheim et al. 2018). In den Studien von (Rose et al. 2004; Daniel A Shoskes et al. 1999) konnte gezeigt werden, dass CP/CPPS Patienten von einer Anti-Östrogenen Therapie profitieren. Auch lassen die Ergebnisse von (Done et al. 2012) auf eine Therapie mit Mastzell-Inhibitoren hoffen und zeigen gleichzeitig die Relevanz dieser Entzündungszellen bei CP/CPPS.

Mastzellen beim Prostatakarzinom (PCa) und der Benigen Prostata Hyperplasie (BPH)

Das PCa ist eine weitere Erkrankung der Prostata, bei der eine Rolle von Östrogenen in der Pathogenese gesichert ist. Zudem wird vor allem im Tumor umgebenden Stroma von erhöhter Mastzellinvasion, verursacht durch Carcinoma-Associated-Fibroblasts (CAF), berichtet. Es wurde gezeigt, dass diese Mastzellen ER1 und ER2 exprimierten und sich via Östradiol in Migration und Proliferation beeinflussen ließen (Ellem et al. 2014a). Ob eine hohe Mastzellpräsenz nun eher inhibierend oder supportiv auf das Tumorwachstum wirkt, wird bislang noch kontrovers diskutiert (Frossi et al. 2018, S. 41). Allerdings konnte zumindest für Prostata Tumoren nachgewiesen werden, dass Östrogen die Rekrutierung und Aktivierung von Mastzellen fördert (Ellem et al. 2014).

Einleitung

Auch bei der BPH scheinen Mastzellen eine Rolle zu spielen: In den von (Nesheim et al. 2018) verglichenen Proben von PCa- und BPH-Patienten fanden sich in den BPH-Gewebe nur geringfügig weniger Mastzellen.

Tryptase und andere Mastzellmarker

Über potentielle Mastzellmarker schreibt (Kabashima et al. 2018): Die in den basophilen Mastzellgranula enthaltenen Substanzen sind hauptsächlich Tryptase, Chymase, Histamin, Lipidmediatoren wie Prostaglandine und Heparin. Tryptase, wie Chymase eine Protease, wird dabei nahezu allein von Mastzellen gebildet, nur ein geringer Anteil entsteht auch in basophilen Granulozyten. Einzig die Oberflächenmarker CD63 und CD203 wären spezifischer. Tryptase ist die überwiegend vorkommende Substanz in den Mastzellgranula. Es existieren vier Formen der Tryptase, wobei die Serum-Grundspiegel von ruhenden Mastzellen via Emission von monomerer α -Tryptase gebildet werden und aktivierte Mastzellen tetramere β -Tryptase ausschütten. Siehe auch (Thermo Scientific 2014). Somit würden sich die Messungen der Tryptasespiegel gut zur Bestimmung der Mastzellaktivität eignen. Die Referenzwerte werden dabei von 2 bis 12 Mikrogramm/Milliliter angegeben. Werte von bis zu 20 Mikrogramm/Milliliter deuten auf eine Mastzellanhäufung hin, sind aber auch im Gesunden möglich. Erhöhte Werte können bei folgenden Krankheiten vorkommen: Mastozytose, Anaphylaxie und Anaphylaktischer Schock und bestimmte Formen leukämischer Erkrankungen (Thermo Scientific 2014).

Epigenetische Veränderung in CPPS und Mastzellen

Epigenetische Mechanismen

Die Epigenetik umfasst alle Mechanismen der Gen- und Chromatinregulierung. Unter epigenetischen Vorgängen versteht man unter anderem Modifizierungen an Histonen und DNA, die die Gen-Expression beeinflussen, ohne dass Veränderungen an der eigentlichen DNA bestehen (Feinberg und Vogelstein 1983). Die Epigenetik wird als wichtiger Bestandteil der Zelldifferenzierung gesehen (Holliday 1987). Obwohl jede Zelle eines Blastozysten die gleiche Erbinformation hat, entwickeln unterschiedlichste Zelltypen diverse Expressionsmuster und Spezialisierungen (Adcock et al. 2006).

Zur epigenetischen Regulierung gehört einerseits die Modifikation der DNA mittels Methylierung. So vermag die Methylierung von Cytosin in CpG-Inseln am Promoterbereich der DNA in einer Expressions-Herunterregulierung des entsprechenden

Einleitung

Genes münden. Diese Veränderungen der DNA sind nicht kurzfristig und könnten auch vererbt werden (Schagdarsurengin et al. 2012), (Barnes 2011). Prozesse wie genomisches Imprinting und epigenetische Reprogrammierung, sowie auch das Stummschalten des zweiten X-Chromosoms der Frau erfolgt via epigenetischer Regulation. Auch die Unterdrückung der Transkription repetitiver Sequenzen erfolgt via DNA-Methylierung (Reik und Dean 2001) (Song et al. 2005; Jin et al. 2011)(Ooi et al. 2007).

Andererseits ist auch die post-transkriptionelle Modifikation von Histonproteinen ein bekannter epigenetischer Mechanismus. Die Histon-Modifikation kann durch Acetylierung, Phosphorylierung, Methylierung und Ubiquitination der vier verschiedenen Histon-Proteine H1-H4 erfolgen. Die möglichen Modifikationen unterscheiden sich in ihrer Stabilität und Dauer und beeinflussen im Allgemeinen die Chromatin-Struktur. Dies vereinfacht oder erschwert den Ablese-Vorgang und nimmt somit Einfluss auf die Gen-Expression (Cheung und Lau 2005).

Der Ursprung epigenetischer Veränderungen und Fehlregulierungen kann im Altern, in der Reaktion der Zellen auf Umwelttoxinen und Ernährungsbestandteilen, Entzündung, aber auch in einer Infektbekämpfung, zum Beispiel einer viralen oder parasitären Infektion, liegen. Diverse Krankheiten können mit der Epigenetik assoziiert werden. So könnten Defekte in Enzymen die die Methylierung katalysieren, die Ursache für manche Immuno-Deficiency-Syndrome und eine dysmorphe Entwicklung des Gesichts (ICF-Syndrom) sein (Xu et al. 1999). Für die akute myeloische Leukämie wurde ein ähnlicher Defekt beschrieben (Ley et al. 2010). Die Syndrome Angelman und Prader-Willi können ebenfalls durch fehlerhafte Methylierung entstehen (Dagli et al. 1993; Driscoll et al. 1993) und sind somit Beispiele für Imprinting-Krankheiten. Fehler der epigenetischen Regulierung können auch zur Karzinogenese führen (Robertson 2005).

Die Methylierung der DNA wird von verschiedenen Proteinen, den DNA-Methyltransferasen, katalysiert (Tabelle 1). Diese Enzyme können in zwei Gruppen unterteilt werden: Die *maintainance* und die *de novo* DNA-Methyltransferasen. DNMT1 als maintainance Methyltransferase methyliert hemimethylierte DNA während der DNA-Replikation. Dies erhält das eigentliche Methylierungslevel in mitotischen Zellen aufrecht. De novo Methylierungen sind Aufgaben der Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B im Rahmen der epigenetischen Reprogrammierung und des genomischen

Einleitung

Imprintings (Jin et al. 2011). Das „Ablesen und Interpretieren“ dieser methylierten Stellen ist Aufgabe des Methyl-CPG-Binding Proteins.

Tabelle 1 Methyltransferasen und CpG Binding Proteine

DNA Methyltransferase	Aktivität	Funktion
	bevorzugt hemi-methylierte DNA	Repression der Transkription
DNMT1		
DNMT2	zeigt nur geringe Aktivität	
		Repression der Transkription
DNMT3a	De novo Methylierungen	Wiederholung der Methylierung
	De novo Methylierungen und Erhalt	Repression der Wiederholung der Methylierung
DNMT3b		
DNMT3L	Co-Faktor	Repression
Methyl CpG Binding Protein	Spezifität	Funktion
MeCP2	einzeln methylierte CpG methylierte und unmethylierte	Repression
MBD1	DNA	Repression
MBD2	methylierte DNA	Repression
MBD3	unmethylierte DNA	Repression
MBD4	CpG/TPG mismatches	DNA-Reperatur

DNA Methylierungen sorgen für eine Verminderung der Transkription und scheinen wie Histone-Modifikationen stabil zu sein (Adcock et al. 2006). Regulierende Funktion haben Methylierungen vorwiegend an sogenannten CpG-Inseln (CGIs), die als Akkumulation der Dinukleotide Cytosin gefolgt von Guanin im DNA-Strang vorkommen. Die CGIs kommen gehäuft in Gen-Promotoren vor, wo sie Einfluss auf die Chromatininformation bzw. auf Bindung von Transkriptionsproteinen haben können (Deaton und Bird 2011). Die Methylierung der Cytosine dieser CGIs korreliert mit einer Herunterregulation der Promoteraktivität und Folge ist eine Stilllegung des Genes (Deaton und Bird 2011; Zingg und Jones 1997). Auch die Gene der DNA-Methyltransferasen besitzen

Einleitung

Promotorregionen die eine CpG-Insel aufweisen. Somit ist ihre eigene Expression durch Methylierung regelbar (Naghitorabi et al. 2013). Bei ungefähr 50% der allgemein vorkommenden CGIs ist die Promoterfunktion gesichert, der andere Teil wird als „Orphan CGIs“ bezeichnet (Deaton und Bird 2011). Bell und Vertino 2017 konnten zeigen, dass diese Orphan CPIs methyliert als starke Enhancer wirken. Edwards et al. 2017 sprechen ihnen diese Funktion eher ab. Die in dieser Arbeit untersuchten CGIs liegen in den Promoterregionen der Gene.

Epigenetik in MCs und CPPS

Mit dem Nachweis der epigenetischen Inaktivierung von CXCR4 in CP/CPPS Patienten (Schagdarsurengin et al. 2017) wurde gezeigt, dass die Krankheit epigenetische Veränderungen mit sich bringt. Nesheim et al. 2018 zeigten auch eine Herunterregulierung der Östrogenrezeptoren 1 und 2 im Seminalplasma bzw. ejakulierten Leukozyten von CP/CPPS Patienten bei gleichzeitiger Erhöhung der Östrogenspiegel im Seminalplasma. Des Weiteren wurde auch das Entzündungs-Expressionsprofil von Mastzellen, von 84 Cytokinen und Chemokinen, auch unter dem Einfluss von Östrogen untersucht. Hier zeigten sich zwischen den beiden Mastzelllinien HMC-1 und LAD2 zum Teil gegensätzliche Reaktionen (Abbildung 5). Unter den am stärksten herunterregulierten Genen der HMC-1-Reihe unter Östrogenstimulation zeigten unter anderem Bone Morphogenetic Proteine 7 (BMP7) eine sechs- bis neunfache Verminderung, gefolgt von Bone Morphogenetic Proteine 2 (BMP2) mit einer ungefähr zwei- bis dreifachen Verminderung. Dies liegt vermutlich auch an dem mit den Mastzellen assoziiertem Reifungsgrad (Nesheim et al. 2018). So repräsentiert HMC-1 im Vergleich zu reifen Hautmastzellen eine sehr unreife Mastzelle mit maligner Komponente im Gegensatz zu LAD2 (Guhl et al. 2010).

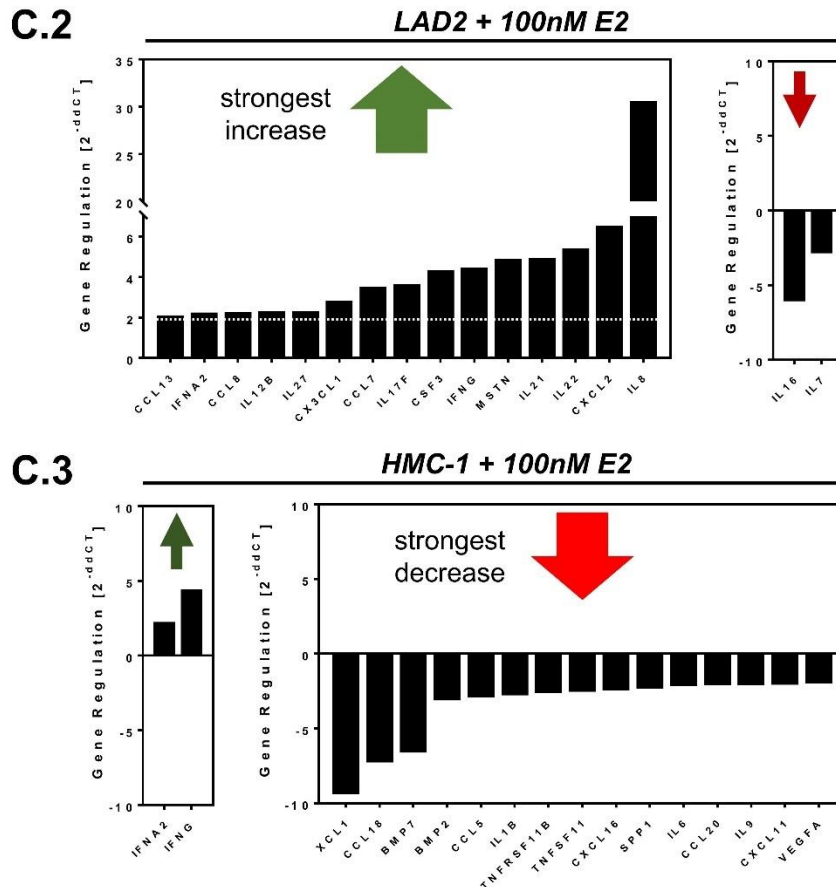


Abbildung 5 ;ARRAY der Expressionsänderung von HMC-1/LAD2 unter Estrogeneinfluss (Nesheim et al. 2018)

In einer Arbeit, die den Einfluss von Östrogen auf die Expression von 800 Genen in einer Brustkrebslinie untersucht, zeigte sich auch das Verhalten von Transforming Growth Factor Beta 2 (TGFB2) auffällig (Putnik et al. 2012). Eine erhöhte Östrogenkonzentration sorgte hier für eine Mindereexpression des TGFB2-Gens, wobei die Behandlung mit 5-aza-20-deoxycytidine (5-aza-CdR), einem DNMT1-Inhibitor, die Expression signifikant steigern konnte. TGFB2 wurde aufgrund vielfacher bekannter Funktionen, u.a. im Bereich der Entzündung, für diese Arbeit ausgewählt um dessen Methylierungsgrad in CP/CPPS Patienten und Mastzellen zu bestimmen. Des weiteren bilden TGFB und die BMPs mit Activinen und den Growth Differentiation Factors eine sogenannte Protein-Superfamilie (Herpin et al. 2004).

Mastzellen und TGFB

TGFB ist ein phylogenetisch ca. 1 Milliarde Jahre altes (S J Newfeld et al. 1999) und sehr vielseitiges Hormon: Es hat Einfluss auf die Zellproliferation und -Differenzierung und -Migration. Es ist an der Karzinogenese und der Wundheilung beteiligt. TGFB beeinflusst

Einleitung

des Weiteren Immunzellen und spielt eine Rolle bei der Fibrose (Blobe Gerard C. et al. 2000), dies wahrscheinlich auch im Zusammenspiel mit Mastzellen (Hügler 2014).

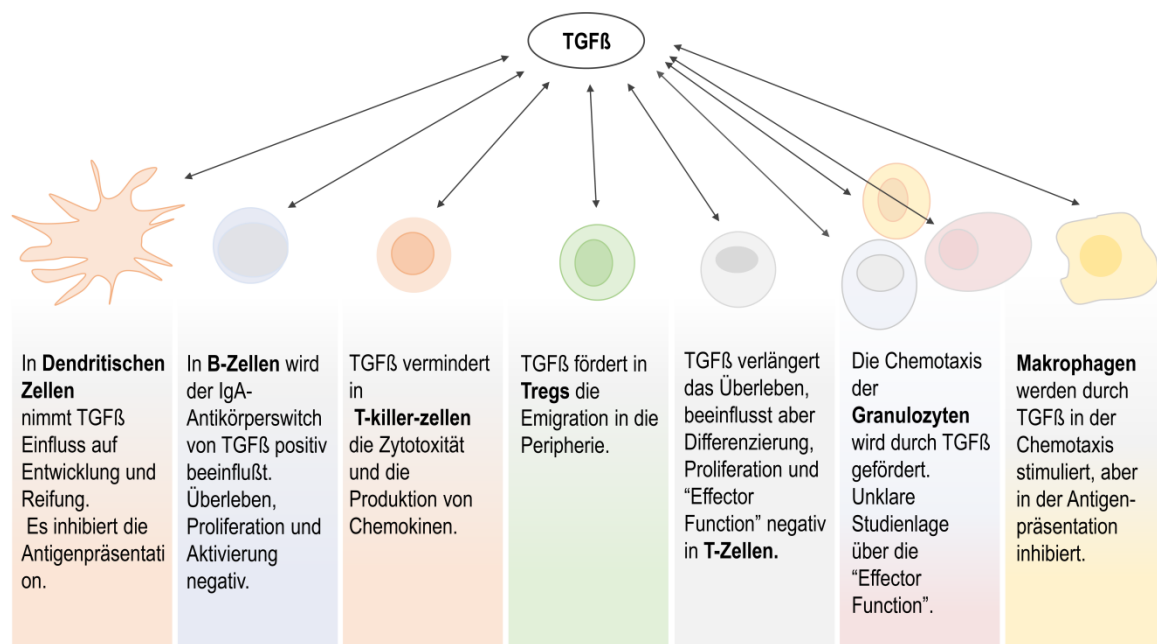


Abbildung 6: TGFβ nimmt Einfluss auf viele Immunzellen, nach (Li et al. 2006)

Der Signalweg verläuft linear: Der Ligand bindet an den Typ II Rezeptor, was den Typ I Rezeptor aktiviert, was wiederum die Phosphorylierung von SMAD-Proteinen zur Folge hat. Diese wiederum nehmen auf die Gen-Expression Einfluss (Li et al. 2006) indem sie an der DNA binden (Massagué und Wotton 2000). Weiterhin haben sie Einfluss auf die Acetylierung oder De-Acetylierung von Histonen (Derynck und Zhang 2003).

Es gibt drei Isoformen von TGFβ: TGFβ-1, TGFβ-2 und TGFβ-3; wobei TGFβ-1 im Immunsystem am meisten Einfluss zu haben scheint (Li et al. 2006).

TGFβ beeinflusst die Regulierung, Proliferation, Differenzierung, das Überleben und die Rekrutierung von Immunzellen. Darunter sind laut Review von (Li et al. 2006) T-Zellen und Th-Zellen, zytotoxische T-Zellen, T-regulatorische Zellen, B-Lymphozyten, Dendritische Zellen, Makrophagen, Granulozyten und Mastzellen (Abbildung 6). So werden unter anderem Cytokin- und Chemokinexpression wie zum Beispiel IL-2 und IL-10 oder IFN-γ beeinflusst (Kitani et al. 2003; Szabo et al. 2000; Brabletz et al. 1993). Zusätzlich ist TGFβ ein stark Mastzellen anlockendes Chemokin mit anfangs stimulativem Effekt (Gruber et al. 1994; Olsson et al. 2000). Auch hervorzuheben ist, dass viele Immunzellen, darunter auch Mastzellen selbst, TGFβ zu produzieren

Einleitung

vermögen (Pennington et al. 1992; Gordon 1994). Dies wirft die Frage nach einem möglichen, fehlgeleiteten und krankheitsrelevanten Feed-Back-Loop auf. So vermag Chymase, eine Mastzellprotease, die Ausschüttung von TGFB auf zwei Wegen zu stimulieren: Über die Aktivierung der Expression und des Vorläufer-Proteins, als auch über die Regulation der Bio-Aktivität (Frossi et al. 2018). Auch in Fibroblasten wird davon berichtet (Chen et al. 2017). Hingegen scheint das Heparin aus Mastzellen gegenteilige Effekte zu haben (Frossi et al. 2018). Mastzellen sind in der systemischen Sklerose der wichtigste TGFB-Lieferant (Hügler 2014) und TGFB vermag die Produktion von IL-6, IL-13, TNF α , und MCP-1 in Mastzellen konzentrationsabhängig zu verringern (Ndaw et al. 2017). Diese Erkenntnisse deuten auf eine nicht zu gering einzuschätzende Einflussnahme von TGFB auf Mastzellen hin (Abbildung 7).

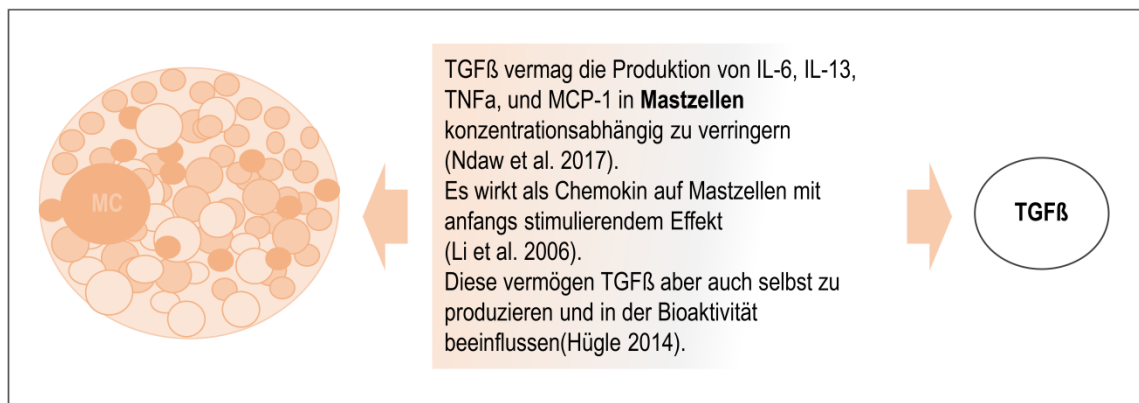


Abbildung 7 zeigt die Interaktion von TGFB und Mastzellen.

TGFB wurde auch im Zusammenhang mit weiteren Autoimmunerkrankungen beschrieben. Im Mausmodell für Rheumatoide Arthritis scheint es ambivalente Rollen innezuhaben (Li et al. 2006). In der EAE, der Modellerkrankung für MS, vermag eine Induktion von TGFB die Symptome der Erkrankung stark zu mindern (L D Johns et al. 1991; M K Racke et al. 1991). Auch in der Inflammatory Bowl Disease (BDI), einer Mausmodellerkrankung für chronisch entzündliche Darmerkrankungen, scheint die Deaktivierung der TGFB Signalwege eine Aggravation der Erkrankung als Konsequenz zu haben (Gorelik und Flavell 2000).

BMP2, BMP6 und BMP7

Die Gene BMP2, BMP6 und BMP7 codieren für Liganden der TGF-beta-Superfamilie. Deren Mitglieder vermögen TGF-Rezeptoren zu binden und führen über den SMAD-Signal-Weg zur Änderung der Gen-Expression. Allgemein tragen sie zur Entwicklung

Einleitung

unterschiedlicher Gewebe bei. So sind alle diese Gene wichtig für die Entwicklung von Knorpel und Knochen. BMP2 ist zusätzlich ein Faktor, der zur Differenzierung von Myelozyten und Fibroblasten beiträgt. BMP6 ist an der Regulation des Eisenhaushaltes, der Entwicklung von Knochen und des Körperfettes und an der Ovulation beteiligt. Zudem sind Expressionsunterschiede von BMP6 möglicherweise mit dem Brust- und Prostatakarzinom assoziiert. BMP7 spielt eine Rolle bei der Entwicklung von Knochen, Nieren und braunem Fettgewebe. Es vermag zudem ektopes Knochenwachstum induzieren (GeneCards Human Gene Database 1998c-2018, 1998a-2018, 1998b-2018). Somit sind alle BMPs an der Entwicklung, aber auch an verschiedenen Reperaturphasen beschädigten Knochenmaterials beteiligt. Auch TGFB ist in diesen Prozess mit eingeschlossen (Carreira et al. 2014). Rekombinante Formen von BMP2 (rh-BMP2) werden in der Orthopädie benutzt um Heilungsprozesse zu stimulieren (Subach et al. 2001). Dies ist allerdings in die Kritik geraten, da unter Operationen mit der zusätzlichen Verwendung von rh-BMP2 zunehmend unerwünschte Nebenwirkungen auftraten. (Carragee et al. 2011). Diese beinhalten überschießendes Knochenwachstum (Haidar et al. 2009), Entzündung des Weichteilgewebes (Tan et al. 2013) und auch ein erhöhtes Risiko für maligne Tumore verschiedenster Gewebe konnte nicht ausgeschlossen werden (Devine et al. 2012). So steht auch für das Prostatakarzinom zur Diskussion inwieweit BMP2 Einfluss ausübt (Tian et al. 2017).

Zielsetzung

In dieser Arbeit sollten folgende Punkte untersucht werden:

- Untersuchung der Mastzellaktivität anhand der Bestimmung der Tryptasekonzentrationen:

Es wird vermutet, dass Mastzellen auf essentielle Weise an der Chronifizierung oder der initialen Triggerung der Entzündung bei CP/CPPS beteiligt sein könnten (Bjerklund Johansen und Weidner 2002; Nesheim et al. 2018). Zudem fanden Done et al. 2012 im Vergleich zu Gesunden erhöhte Tryptasespiegel im Seminalplasma von Patienten mit CP/CPPS. Leider handelte es sich um eine sehr kleine Studie und Seminalplasma ist ungleich schwieriger zur Untersuchung zu bringen als Blutplasma. So stellte sich die Frage ob Patienten mit CP/CPPS erhöhte systemische Tryptasespiegel im Vergleich zu Gesunden aufweisen, die auf eine erhöhte Mastzellaktivität aufgrund ihrer Erkrankung

schließen lassen könnten. Auch erfolgte eine Auswertung der Daten in Bezug auf das Alter um eine mögliche Alters-Korrelation zu zeigen, sowie getrennt nach CP/CPPS 3a und CP/CPPS 3b.

- Korrelation von Entzündungsparametern und Tryptasespiegeln:

Entzündungsparameter wie IL-8, CRP und PSA und auch Östradiol und Testosteron wurden mit den Tryptasespiegeln korreliert, um Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zu finden. Auch erfolgte eine Korrelation der Entzündungsparameter mit der Promoter-Methylierung der Gene TGFB2 und deren Superfamilienmitglieder BMP2, BMP6, und BMP7.

- Epigenetische Regulierung von TGFB2, BMP7, BMP6, und BMP2:

CP/CPPS Patienten wiesen erhöhte Östrogenspiegel im Seminalplasma auf, die vermutlich in Zusammenhang mit der epigenetischen Herunterregulierung der Östrogenrezeptoren 1 und 2 stehen (Nesheim et al. 2018). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Mastzelllinie HMC-1 mit einer Expressionsminderung von BMP7 und BMP2 in HMC-1 auf Estrogenbehandlung reagierte. In der Literatur findet man desweiteren, dass sich unter Östrogeneinfluss die Expression von TGFB2 verändert (Putnik et al. 2012). Da diese Proteine einer Superfamilie angehören wurden im Folgenden Methylierungen von TGFB2, BMP2, BMP6 und BMP7 bei Patienten mit CP/CPPS, in einer gesunden Kontrollgruppe, in den Mastzelllinien HMC-1 und LAD2 unter Östrogenbehandlung und in den Prostatakrebszellen LNCAP, PC3 und DN145 via Pyrosequenzierung untersucht.

Material und Methoden

Material

Proben

Patienten

Es wurden Patienten (n=85, mittleres Alter 42,7 Jahre, medianes Alter 44 Jahre, minimales Alter 17 Jahre, maximales Alter 76 Jahre) aus der Prostatitisprechstunde mit der Diagnose chronische Prostatitis/ chronisches Beckenschmerzsyndrom in dieser Arbeit weitergehend untersucht. Proben aus EDTA Blut dieser Patienten wurden hinsichtlich der Methylierung der Gene BMP2, BMP6, BMP7 und TGFB2 untersucht. Im Blut-Plasma dieser Patienten wurde im klinischen Zentrallabor des Universitätsklinikums Marburg (Direktor: Prof. Dr. H. Renz) der Tryptase-Spiegel bestimmt.

Gesunde Kontrollgruppe

Über einen Emailverteiler der JLU-Gießen wurden gesunde Männer (n=40, mittleres Alter 25,4 Jahre, Medianes Alter 25 Jahre, minimales Alter 19 Jahre, maximales Alter 32 Jahre Spannweite 13 Jahre) für die Kontrollgruppe rekrutiert. Proben aus EDTA Blut dieser Gruppe wurden hinsichtlich der Methylierung der Gene BMP2, BMP6, BMP7 und TGFB2 untersucht. Im Blut-Plasma dieser Gruppe wurde im klinischen Zentrallabor des Universitätsklinikums Marburg der Tryptase-Spiegel bestimmt.

Mastzelllinien

Die Mastzelllinien LAD2 und HMC-1 wurden im Partnerlabor des IRTG, Monash, Australien mit unterschiedlichen Konzentrationen an Östrogen und Ethanol zur Kontrolle behandelt und anschließend geerntet. Dieses Material wurde nach Deutschland, Gießen verschickt, wo es weiter untersucht wurde. Die DNA dieser behandelten Zellen wurde zur Verfügung gestellt.

Prostata-Karzinom-Zelllinien

Die PCa-Linien PC3, DN145 und LNCAP wurden in dieser Arbeit epigenetisch untersucht. Exploratives Interesse lag an den Methylierungsgraden der Gene BMP2, BMP6, BMP7 und TGFB2, da zumindest BMP6 und BMP2 in der Literatur in Assoziation zum Prostata-Karzinom erwähnt werden. Die DNA dieser Zellen wurde zur Verfügung gestellt.

Material und Methoden

Einverständniserklärung und Ethikvotum

Alle Studienteilnehmer gaben ihr schriftliches Einverständnis und die Studie wurde von der Ethik Kommission der JLU Gießen genehmigt. (Anlage ethisches Votum, AZ.: 55/13)

Chemikalien

Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Diethylpyrocarbonate (DEPC)	Sigma-Aldrich, Stenheim
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe
Chloroform	Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Stenheim
Essigsäure	Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe
Ethanol (EtOH)	Sigma-Aldrich, Stenheim
Glykogen	Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Stenheim
Natriumacetat	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS) Lösung, 10% (w/v)	BioRad, Hercules, CA, USA
Nonoxinal 40 (NP40)	Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe
Orange G	Merck, Darmstadt
PeqGold TriFast	PeqLab, Erlangen
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich, Stenheim
Tris	Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe

Reagenzien und Puffer

DNA-Isolation

<i>somatic cell lysis</i> Puffer	0,1% SDS 0,5% TritonX-100 in DEPC-H ₂ O
Proteinase K Puffer	1 M Tris pH 7,5 50 mM EDTA (0,5 M) 25 mM 10% NP40

Material und Methoden

	0,5% SDS (10%)
Proteinase K 20mg/mL	40 mg Proteinase K in 2 mL PBS
10 mM Tris	0,1 mL 1 M Tris 9,9 mL ddH ₂ O

5

Bisulfit- Behandlung und Agarosegel-Elektrophorese

EpiMark Bisulfit Conversion Kit	New England BioLabs
GelRed Nucleid acid gel stain	Biotium, Fremont
Gene Ruler DNA Ladder Mix	Thermo Scientific, Darmstadt
S-Adenosylmethionin	Thermo Scientific, Darmstadt
2% Agarosegel	2g Agarose in 100mL 1x TAE lösen
10x TAE-Puffer (pH 8,0)	48,4g Tris 11,42 mL Essigsäure 22 mL 0,5 M EDTA auf 1L mit ddH ₂ O auffüllen
Orange G-Ladepuffer	50% TAE-Puffer (10x) 50% Glycerin 1 Spatelspitze Orange G 1:1 mit 10x TAE-Puffer für Verbrauch

Pyrosequenzierung und Pyrosequenzierungs-PCR

Pyromark Binding Buffer	Qiagen, Hilden
Pyromark Denaturation Solution	Qiagen, Hilden
Pyromark Annealing Buffer	Qiagen, Hilden
Pyromark Wash Buffer	Qiagen, Hilden
Pyromark Gold Q 24 Reagenzien	Qiagen, Hilden

Material und Methoden

Streptavidin Sepharose High Performance	GE Healthcare, Freiburg
70% Ethanol	350 mL 100% Ethanol auf 500 mL mit ddH ₂ O auffüllen
Denaturierungs Puffer (0,2 M NaOH)	25 ml 4 M NaOH auf 500 mL mit ddH ₂ O auffüllen

Enzyme und Enzym-Puffer

2x MyTaq HS Mix	Bioline, Luckenwalde
Proteinase K	7528.2 Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe

Geräte

Feinwaage Mettler AE 240	Mettler Toledo, Gießen
Gefrierschrank Economic GSL 1202 (-20°C)	Bosch, Stuttgart
Gefrierschrank Economic GSL 3601 (-20°C)	Bosch, Stuttgart
Gefrierschrank (-80°C) HFU500TV	Thermo Scientific, Waltham, USA
Geldokumentation BioDoc Analyze	Biometra, Göttingen
Gelkammer groß	PeqLab, Erlangen
Gelkammer klein Mini-Sub Cell GT	BioRad, Hercules, CA, USA
Heizplatte Präzitherm 28-1	Störk-Tronic, Stuttgart
Kühlschrank (4°C+ -20°C)	Bosch, Stuttgart
Kühlzentrifuge Mikro 220 R	Hettich, Frankenberg
Mikrowelle Intellrowave	LG, Ratingen
Mikrozentrifuge AI 1,5 mL	Fisherbrand, Darmstadt
Mikrozentrifuge AI 0,2 mL	Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe
MilliQ Anlage	Merck Millipore, Darmstadt
Phadia 250 ImmunoCAP	Thermo Scientific, Waltham, USA
Pyrosequenzierer Pyromark Q24	Qiagen, Hilden
Schüttler Vibrax-VXR	IKA, Staufen
Spektrophotometer Nanodrop 1000	PeqLab, Erlangen
Thermocycler C1000 Touch	BioRad, Hercules, CA, USA
Thermocycler T100	BioRad, Hercules, CA, USA

Material und Methoden

Thermocycler Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
Vakuumpumpe 2511 Dry	Welch by Gardner Denver, Niles, USA
Vortexer REAX 2000	Heidolph, Schwabach
ddH2obad	Julabo, Seelbach
Zentrifuge Universal	Hettich, Frankenberg

Gebrauchswaren

Autoklavierbeutel	Nerbe plus, Winsen
Falcon (15mL / 50 mL)	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
Gelelektrophoresekämme	PeqLab, Erlangen
Gelelektrophoreseschlitten	PeqLab, Erlangen
Glaswaren	Schott AG, Mainz
Handschuhe	B Braun, Melsungen, Ansell, Richmond, Australien
Nunc-Immuno Microwell 96 Well Platte	Thermo Scientific, Darmstadt
Parafilm	Bemis, Neenah, USA
Pipetten	Labnet, Edison, NJ, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Nerbe plus, Winsen
Pipettenspitzen	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Pyromark Q24 Kartusche	Qiagen, Hilden
Pyromark Q24 Kamm	Qiagen, Hilden
Pyromark Q24 Platten	Qiagen, Hilden
Pyromark Q24 Plattenhalter	Qiagen, Hilden
Pyromark Q24 kleine Wanne	Qiagen, Hilden
Pyromark Q24 Workstation	Qiagen, Hilden
Rack	Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe
Reagiergefäße (1,5mL / 2mL)	VWR, Darmstadt

Material und Methoden

Pyrosequenzier-Primer

			Produkt-	
Gen	PyroMark Assay ID	Zu analysierende Sequenz nach BS-Behandlung	länge (bp)	Anzahl an CpGs
	Hs_BMP2_01_PM			
BMP	Pyromark CpG	TTYGTTTTTAGAGTTTTTYGYG		
2	Assay	AGGGTTYGGYGYGT	122	6
	Hs_BMP6_01_PM			
BMP	Pyromark CpG	TTYGYGYGTYGTAYGTTTTT		
6	Assay	TTAAGYGGAGGYGGYG	252	7
	Hs_BMP7_02_PM			
BMP	Pyromark CpG	ATATGGGTGTYGAGTTGTGTT		
7	Assay	TGTTTTGGAGGTGYGGGYG	210	5
	Hs_TGFB2_01_PM			
TGF	Pyromark CpG	GTTGGYGAATTGAYGGGAGG		
B2	Assay	GGYGTYGGGAGYGYGGT	119	6

Tryptasemessung

Calibrator / CC-Streifen	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Konjugate	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Entwicklerlösung	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Stopplösung	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Waschlösung	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Diluent	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
ImmunoCAP Tryptase	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Kontrollen	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Methoden

Proben-Sammlung und Aufbau der Biodatenbank

Diagnostische Maßnahmen der Prostatitisprechstunde

Die Probensammlung erfolgte in der Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie der JLU Gießen, Deutschland, bei Patienten, die sich in der Prostatitisprechstunde einfanden. Hier wurden die Patienten mit Verdacht auf Prostatitis/chronischem Beckenschmerzsyndrom untersucht und diagnostiziert und bei positiven Befunden nach den Kriterien des National Instituts of Health (NIH) klassifiziert. (Klassifikation 1-4 siehe unter Einleitung). Die spezielle Diagnostik beinhaltete folgende Punkte: Anamnese und Beschwerdeverifizierung mittels Fragebögen: Internationaler Prostata Symptom Score (IPSS), National Institute of Health - Chronic Prostatitis Symptom Index (NIH-CPSI), der Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS), der Pelvic Pain and Urgency/Frequency Patient Symptom Scale (PUF), der Internationale Index der erektilen Funktion (IIEF) und der Sexual Function Index (SFI) (Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg 2016), Körperliche Untersuchung inklusive einer Prostata-Untersuchung, Sonographie der Urogenitalorgane, Abgrenzung gegenüber einer interstitiellen Zystitis, sowie eine 2-Gläser-Probe (prä- und post Prostatamassage Urin) und Ejakulatuntersuchung. Diese Fluide wurden mikrobiologisch getestet im Institut für medizinische Mikrobiologie JLU Gießen (Direktor: Prof. Dr. T. Chakraborty) und das Ejakulat nach den WHO Richtlinien (World Health Organization 2010) untersucht (Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH 2017).

Probensammlung und primäre Verarbeitung

Es folgen die Blutabnahmen von EDTA-Blut zu 3ml, Plasma und Serum zu je 5ml sowie die 2-Gläser-Probe. Blutplasma und Serum werden bei 3000 RPM zentrifugiert. Der Überstand wird in jeweils 2ml-Reaktionsgefäßen aliquotiert, gekühlt und bei -80°C eingefroren. Die abzentrifugierten Zellkonglomerate der ersten Phase werden verworfen.

Der Erst- und Exprimaturin der 2-Gläser-Probe durchläuft die standardmäßige klinische Untersuchung: Testung auf Glukose, Ketone, Leukozyten Erythrozyten, PH-Wert, Farbe und Proteine via Teststreifen. Eine Teilmenge wird auf Trichomonaden getestet und mikroskopisch untersucht sowie zur Kultur gegeben.

Material und Methoden

Der verbleibende Rest wird bei 4°C gekühlt. Im weiteren Verlauf wird dieser bei 4000 RPM für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird bis auf 1ml abgezogen und das Pellet in dem verbleibenden 1ml resuspendiert. Der Überstand des Erst- und Exprimaturins, sowie -Pellet werden bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Das Ejakulat wird bis zur Abholung durch einen klinikinternen Hol- und Bring-Dienst in einem Brutschrank bei 36°C gelagert und anschließend im klinischen Labor der Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie die IL8-konzentration, sowie die Leukozytenelastase, sowie die Zinkkonzentration, Fruktosekonzentration und die Alpha-Glycosidase mit standardisierten Methoden gemessen (Schagdarsurengin et al. 2017). Die Beurteilung der Spermien erfolgte mikroskopisch nach den WHO-Kriterien 2010 (World Health Organization 2010). Die Infektionsdiagnostik erfolgte im Institut für medizinische Mikrobiologie JLU Gießen (Direktor: Prof. Dr. T. Chakraborty) durch mikrobiologische Kulturen und PCR-Untersuchung von Ersturin, Exprimaturin und Ejakulat. Es wurde eine Kultur für bakterielle Erreger durchgeführt, sowie eine multiplex PCR-Untersuchung auf *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalum*, *M. hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, sowie *Trichomonas vaginalis*. Bei kulturnegativen Proben wurde zusätzlich eine 16S rDNA Amplifikation mit nachfolgender Sequenzierung durchgeführt. Die Blutproben durchliefen eine Routinediagnostik auf das C-reaktive Protein (CRP), das Prostata-Spezifische Antigen (PSA), Östrogen und Gesamt-Testosteron im klinischen Zentrallabor UGKM Giessen (ADIVA, Siemens Health Care, Erlangen, Deutschland).

Eine Übersicht über die in dieser Arbeit benutzten erhobenen Daten zeigt die Tabelle über alle erhobenen Daten im Anhang.

In die Studie wurden Patienten sowohl der Klassifikation chronische Prostatitis/ chronisches Beckenschmerzsyndrom der Typen NIH3b (CP/CPPS 3b), NIH3a (CP/CPPS3a), als auch Patienten mit nicht näher klassifiziertem CPPS mit eingeschlossen. Diese wurden aber auch differenziert betrachtet.

Endgültige Probenlagerung

Die Proben lagern in einem Gefrierschrank chronologisch sortiert nach Untersuchungszeitpunkt zwischen. Der Gefrierschrank ist durchgehend auf -80° Celsius gekühlt.

Material und Methoden

Gesunde Kontrollgruppe

Die Probanden der Kontrollgruppe (n=40, Medianes Alter= 25, Spannweite=13) wurden über einen Email-Aufruf über den Verteiler der Justus-Liebig-Universität rekrutiert. Sie wurden unter den Voraussetzungen keinerlei körperlicher Beschwerden und keinerlei aktuelle Erkrankungen derzeit, sowie keinerlei urogenitaler Erkrankungen bis zum Zeitpunkt der Untersuchung in die Studie aufgenommen. Die Probanden durchliefen dieselben Untersuchungen der Prostatitis-Sprechstunde wie die Patienten: Es erfolgten eine Blutabnahme, eine 2-Gläser-Probe mit Prostata-Massage, das Ausfüllen der Patientenfragebögen und das Anfertigen eines Spermioogrammes. Alle Probanden erhielten eine Aufwandsentschädigung von 50 Euro.

Zelllinien

Für die Messung der Methylierungen der Gene TGFB2, BMP2, BMP6 und BMP7 wurden n=83 Patientenproben aus der Biodatenbank des Labors und n=39 Proben von Gesunden untersucht. Des Weiteren wurden zwei Mastzelllinien (LAD2 und HMC-1) die für 24 Stunden mit verschiedenen hohen Östradiol- und Ethanolkonzentrationen behandelt wurden, und drei Prostata-Ca-Linien: LnCaP, PC3 und DU145 untersucht.

Die Zellreihen LnCaP, PC3 und DU145 wurden von Cell Lines Service (CLS) Eppelheim, Germany bezogen. Die anschließende DNA-Gewinnung erfolgte äquivalent dem anderen Probenmaterial.

Stimulation der Zelllinien HMC-1 und LAD2 mit Östrogen und anschließende DNA-Extraktion

Die Humanen HMC-1 Mastzellen, freundlicherweise von Dr J. Butterfield; Mayo Clinic, USA zur Verfügung gestellt, wurden wie im Vorfeld beschrieben kultiviert (Ellem et al. 2014a). LAD2 Zellen, freundlicherweise von Dr A. Kirshenbaum; National Institutes of Health, USA zur Verfügung gestellt, wurden wie im Vorfeld von (Kirshenbaum et al. 2003) beschrieben gepflegt. Anschließend wurden die Zellen in 10cm Petrischalen bei Dichten von $\sim 0.176 \times 10^6 / \text{cm}^2$ (HMC1, $1 \times 10^7 / \text{dish}$) und $\sim 0.529 \times 10^5 / \text{cm}^2$ eingesetzt. (LAD2, $3 \times 10^6 / \text{dish}$). Die Behandlungen mit 0,1-100 nM Östradiol oder Ethanol erfolgte zweifach (für DNA beziehungsweise RNA) unter denselben Bedingungen.

Die Östrogen- und Ethanolbehandlung der Mastzelllinien LAD2 und HMC1 erfolgte im Partnerlabor des IRTG in Monash in Australien. Dabei wurden für 24 Stunden folgende Konzentrationen angewandt (Tabelle 2):

Material und Methoden

Tabelle 2 Östrogenbehandlung der Mastzellen

	Konzentration von Östrogen in nmol/l					Konzentration von Ethanol in nmol/l			
HMC-1	0	0,1	1	10	100	0,1	1	10	100
LAD2	0	0,1	1	10	100	0,1	1	10	100

Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 5 Minuten bei 400g zentrifugiert. Anschließend wurden sie in 50 µL PBS für die DNA Isolierung oder 100µl RNA-later (Sigma) für die RNA Isolation resuspendiert. Für die DNA Extraktion wurden die Zell-Pellets für eine Stunde mit 0.75 µg/µL Proteinase K (Carl Roth) bei 56° C verdaut. 500 µL Phenol/Chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) wurden hinzugefügt, und die Phasetrennung erfolgte durch Zentrifugation (10 minutes bei 13.000 rpm). Die DNA Proben wurden mit 1 Volumen Isopropanol, 1/10 Volumen Sodium Acetate (3 M) and 5 µg Glycogen gefällt. Die RNA der Zell pellets wurden mit den peqGOLD TriFast™ Reagenzien (Peqlab) nach dem Herstellerprotokoll isoliert. RNA und DNA Konzentrationen wurden am NanoDrop-1000 (Thermo Scientific) gemessen und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

Tryptasemessung

Tryptase allgemein und als Mastzellmarker

Tryptase ist unter anderen Proteasen wie Chymase und bestimmten Zelloberflächenmerkmalen wie CD63 und CD203 sehr spezifisch für Mastzellen (Kabashima et al. 2018). Es ist das dominierende Enzym in den Granula der Mastzelle. Folglich wird ein erhöhter Tryptase-Spiegel im Blut als Indiz für Krankheiten mit vermehrter Mastzelldegranulation gesehen. Darunter sind Mastozytose oder Anaphylaxie zu nennen (Kabashima et al. 2018). Der Referenzwert für Tryptasespiegel im Blut bei Gesunden, der als Basalkonzentration bezeichnete Wert liegt laut Herstellerangaben des ImmunoCap Tryptase, Phadia bei 1-15µg/l (Thermo Scientific 2014).

Die Tryptasespiegel für diese Arbeit wurden im klinischen Zentrallabor der Universitätsklinik Marburg mithilfe des ImmunoCAP Tryptase 250 (Phadia, Thermo Scientific) gemessen. Dies befindet sich dort zur Routinediagnostik bei Anaphylaxie. Anaphylaxie beinhaltet eine hauptsächlich über IgE vermittelte Mastzellaktivierung und

Material und Methoden

Degranulation mit konsekutiver Erhöhung des Tryptasespiegels. Hohe Basalkonzentrationen ($>10\mu\text{g/l}$) werden als Risiko betrachtet, Konzentrationen zwischen $20\mu\text{g/l}$ und größer $200\mu\text{g/l}$ können bei systemischer Mastozytose, hämatologische Neoplasien oder schweren anaphylaktischen Reaktionen entstehen. Diese Werte dürfen nicht ohne zugehörige Klinik interpretiert werden. Die Tryptase Basalkonzentration eines Menschen ist im Verlauf normalerweise unverändert. Bei vorübergehend erhöhter Tryptasekonzentration wird der Spitzenwert zwischen 15 und 120 Minuten erreicht und sinkt anschließend innerhalb der nächsten sechs Stunden ab, bei einer Halbwertszeit von zwei Stunden. Die verwendete Methode misst die Gesamttryptase. Das heißt, die Tryptasevorstufen α - und β -Tryptase, sowie die bei aktivierten Mastzellen ausgeschüttete reife β -Tryptase (Thermo Scientific 2014).

Messtechnik des ImmunoCap Tryptase 250

Das Messprinzip des ImmunoCap Tryptase ist das eines flourometrischen Sandwich-ELISAs. In eine Kapsel, deren Wand mit fest gebundenem Anti-Tryptase Antikörper beschichtet ist, wird das zu untersuchende Material gegeben. Dies wird vom Hersteller als ImmunoCAP-Verfahren bezeichnet. Es bietet, laut Messprotokollen des Zentrallabores des Universitätsklinikums Marburg, ein hydrophiles, weit verzweigtes Polymer als Festphase, das sich besonders gut für die Bindung von Allergenen eignet, ohne deren Struktur zu beeinflussen. Auch bietet das CAP auf der Basis der geeigneten Menge von Zellulose als Festphase die richtige Umgebung für eine hohe Bindungskapazität. Passende Antigene der Probe werden somit nach Inkubation an den wandständigen Anti-Tryptase-Antikörpern und der Festphase gebunden. Es folgt ein Waschgang. Anschließend werden enzymmarkierte, spezifische Antikörper gegen Tryptase zugegeben. Es folgen erneut eine Inkubation und ein weiterer Waschgang bei dem ungebundene, überflüssige Enzym-tragende Antikörper fortgespült werden. Es wird erneut mit einem Entwicklerreagenz inkubiert. Der durch diese enzymatische Reaktion entstandene Floureszenzfarbstoff wird nun mit einer Wellenlänge von 367 nm angeregt und die Intensität des Floureszenzsignals bei 445 nm gemessen. Es erfolgt ein Vergleich und die Quantifizierung mit den Standard-Kontrollen, wobei sich die Floureszenz direkt proportional zur Tryptasekonzentration der Probe verhält (Phadia 2012).

Meine Messung. Anzahl Patienten, Gesunde, Fehlschlagen der Messung im Urin

Es wurden $n=40$ Gesunde und $n=73$ Patientenproben von Blutplasma gemessen. Es folgten sieben weitere Messungen im Exprimaturin von Patienten mit CP/CPPS. Diese

Material und Methoden

waren jedoch alle unter der Nachweisgrenze und die Methode wurde als zu wenig sensitiv für Exprimaturin betrachtet. Weitere Analysen im Exprimaturin wurden daher unterlassen.

Messung der Tryptasespiegel am ImmunoCap Tryptase 250

Um die Proben zur Analyse zu bringen wurde pro ausgewähltem Patienten ein Aliquote des Blutplasmas aus dem -80°C-Gefrierschrank genommen und in einer kälteisolierten Box in Trockeneis gebettet mit dem Auto zum Zentrallabor der Universitätsklinik Marburg gefahren (ca. 25 Minuten Transport). Dort wurden die Proben aus der Box entnommen und erneut bis zur Analyse bei -20°C eingefroren. Diese erfolgte parallel zum klinischen Alltag des Zentrallabors des Universitätsklinikums Marburg, ergänzend in den sonst in der Routine freibleibenden, übrigen Slots des Phadia 250.

Die im -20°C kalten Gefrierschrank gelagerten Proben werden auf Eis aufgetaut. Es werden 190µl Probenmaterial benötigt. Dies setzt sich aus 40µl Probe und 150µl Verdünnungsvolumen zusammen.

Weitere benötigte Reagenzien sind in der folgenden Tabelle gelistet und werden von der Firma Thermo-Scientific über die hausinterne Apotheke bezogen. Alle Reagenzien tragen Barcode-Labels und werden für jeden Lauf dokumentiert. Für die Messung der Tryptase werden spezielle ImmunoCAPS-Tryptase benötigt. Auch diese werden über Thermo-Scientific/fisher bezogen und tragen die Bestellnr. 14-4518-01. Für den Messvorgang benötigte Reagenzien und Materialien listet nachstehende Tabelle (Tabelle 3).

Tabelle 3 Reagenzien Phadia

Reagenzien	Stabilität <i>on-board</i>
Calibrator / CC-Strip	28 Tage bei Raumtemperatur
Konjugate	4 Tage bei 2-8°C
Entwicklerlösung	40 h bei Raumtemperatur
Stopplösung	40 h bei Raumtemperatur
Waschlösung	7 Tage bei Raumtemperatur
Diluent	7 Tage bei Raumtemperatur
ImmuniCAP	Bis zum Verfallsdatum bei 2-8°C
Kontrollen	k.a.

Material und Methoden

Das Protokoll der Messung beginnt mit dem Einschalten des Computers. Die IDM Software (Steuerungs- und Auswertungsprogramm) am PC startet automatisch. Im IDM müssen die Anforderungen importiert werden. Die begrenzte Stop-Lösung limitiert die maximal messbare Anzahl an CAP-Bestimmungen auf 370.

Der Waschtank wird mit der angesetzten Waschlösung befüllt (auf 5L destilliertes Wasser kommen 400ml Waschkonzentrat und 86ml Wash Additive. Die Waschlösung sollte gut gemischt werden und möglichst einen Tag vor Gebrauch zur Vermeidung von Luftblasen angesetzt werden.) Jetzt kann der Waste-Tank entleert werden.

Die Verdünner-Behälter werden eingelesen. Anschließend werden deren Verschlüsse entfernt und die Behälter in das dafür vorgesehene Fach positioniert. Neue Kalibrator- und Kurvenkontrollstreifen werden eingelesen und eingesetzt.

Die Konjugat-Behälter werden eingelesen und die Behälter in das dafür vorgesehene Fach positioniert. Es beginnt die Initialisierung, das Primen und die Blank-Messung. Dies dauert ungefähr 15 Minuten. Bei normalem Verlauf können die *Proben-Racks* geladen werden. Die mit Barcode beklebten und aufgetauten Proben werden in das Rack gestellt.

Pyrosequenzierung

Epigenetik, CpG-Inseln, Promotorregionen und Methylierungen

Die Pyrosequenzierung stellt ein Verfahren dar, in dem mithilfe einer Gensequenzanalyse epigenetisch relevante CpG-Methylierungen gemessen werden können. CpGs befinden sich gehäuft u. a. in Promoterregionen eines Gens, in sogenannten CpG-Inseln. Promotormethylierung in CGIs stellt einen epigenetischen Mechanismus dar, die Transkription von Genen herunterzuregulieren (Deaton und Bird 2011, S. 1010). Für eine Pyrosequenzierung muss die zu untersuchende Probe in mehreren Schritten vorbereitet werden. Diese sind im Folgenden aufgeführt.

DNA-Extraktion

In diesem ersten Schritt wurde die Gesamt-DNA aus EDTA Blut isoliert. Hierfür werden im Blut enthaltene Zellen mit Proteinase K, Proteinase K-Puffer und DTT lysiert. Unter Zugabe von Phenol und Isopropanol wird die DNA anschließend gefällt.

Material und Methoden

Protokoll der DNA Extraktion

Es werden 500µl EDTA-Blut in ein 2 mL Tube gefüllt. Dieses wird mit 1 mL Proteinase K-Puffer, 30µl DTT (0,1 M) und 100µl Proteinase K (20mg/ ml) versetzt. Das Gemisch wird nun mithilfe eines Schüttlers für 2 Minuten gemischt. Die Proben werden nun über Nacht bei 56°C inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wird die Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Die Proben werden erneut auf einem Vortexer gemischt und das Lysat anschließend aufgeteilt: Je 1ml der Probe kommt in ein neues 2ml Röhrchen. Es wird jeweils 1 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) hinzugegeben und auf einem Schüttler gut durchmischt. Die Tubes werden für 5 Minuten bei 13000 RPM bei 4°C zentrifugiert. Der verbleibende Überstand, eine wässrige Phase, wird nun in ein neues 2ml Röhrchen überführt und 1 ml Chloroform hinzugegeben. Durch Zentrifugieren für 5min bei 13000 RPM bei 4°C kommt es erneut zur Phasentrennung. Die obere wässrige Phase wird wieder abgenommen und in ein neues 2ml Tube überführt. Dieser Schritt wird wiederholt: Es wird erneut 1 ml Chloroform hinzugegeben, gut durchmischt und für 5min bei 13000 RPM bei 4°C zentrifugiert. Der wässrige Überstand wird erneut in ein neues 2ml Röhrchen überführt. Durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, sowie einem Volumenanteil 100% Isopropanol und 10µl Glycogen (2mg/ml), anschließendem starken Schütteln, wird die DNA bei -20°C gefällt. Anschließend wird die DNA für 20min bei 13000 RPM bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, und das DNA-Pellet wird mit 150 µl 70% Ethanol gewaschen und für 5min bei 13000 RPM bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das DNA- Pellet wird nun für ca. 10-15 Minuten luftgetrocknet und anschließend in 25µl ddH₂O durch Schnippen und Schütteln für 10 min resuspendiert. Die Konzentration der DNA wurde anschließend am NanoDrop gemessen. Die Lagerung erfolgte für kurze Zeiträume und baldiger Weiterverarbeitung bei -20°C, für längere Aufbewahrung bei -80°C.

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Mithilfe des Nanodrop, einem Spektrophotometer kann mittels Messung der optischen Dichte einer Probe deren Gehalt an Nukleinsäuren bestimmt werden. Hierfür erfolgt als erster Schritt der Nullabgleich gegen das Medium in dem die Nukleinsäure gelöst vorliegt. Anschließend kann in 1 µl der Lösung, ein Tropfen der mittels Pipette auf die Optische Messeinrichtung gebracht wird, bei 260 nm die Dichte der Nukleinsäuren in der Probe bestimmt werden. Dabei muss beachtet werden, dass sich doppelsträngige und

Material und Methoden

einzelsträngige DNA in der Lichtbrechung unterscheiden. Dies muss in den Voreinstellungen des Apparates angegeben werden.

Bisulfit-Konvertierung

Die Bisulfit-Konvertierung macht methylierte Cytosine für die Pyrosequenzierung kenntlich, indem sie unmethylierte Cytosine in Uracil umwandelt (New England Biolabs inc. 2012). Dies geschieht indem zur DNA gegebenes Natriumbisulfit eine hydrolytische Deaminierung unmethylierter Cytosine zu Uracil vollzieht. Methylierte Cytosine, Methycytosine, werden von dieser Reaktion ausgespart (Lottspeich und Engels 2012) (Abbildung 8).

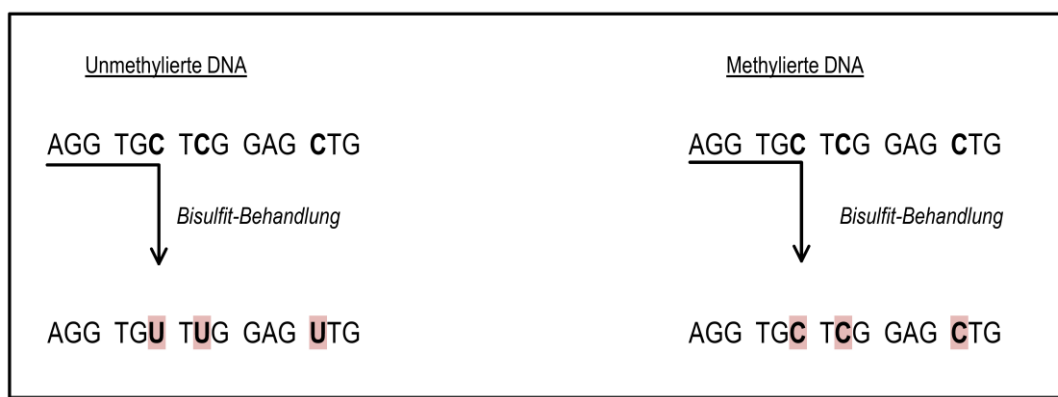


Abbildung 8: nach Manual EpiMark Bisulfite (New England Biolabs inc. 2012, S. 2)

Diese können dann in der Sequenzierung erkannt werden. Bei bekannter Basenabfolge des Genabschnittes lässt sich so rückwirkend auf methylierte Stellen schlussfolgern. Die Bisulfitbehandlung erfolgte mit dem Bisulfit Conversion Kit, Epimark. Laut Herstellerempfehlungen werden die besten Ergebnisse mit 50ng – 20µg DNA erzeugt (New England Biolabs inc. 2012). Aus diesem Grund wurde ein diese Menge (2µg) enthaltendes Volumen aus der jeweiligen Probe entnommen. Die restlichen Schritte erfolgten nach dem Protokoll des Epimark Bisulfit Conversion Kit E3318.

Protokoll der Epimark Bisulfit Conversion

Die verwendeten Materialien stammen aus dem Epimark Bisulfit Conversion Kit E3318, New England Biolabs.

Um die Reagenzien vorzubereiten werden 40 ml Ethanol (96–100%) zu dem konzentrierten Wash Buffer hinzugegeben und bei Raumtemperatur gelagert. Das Behältnis sollte mehrmals geschwenkt werden. Zu dem Desulphonation-Reaction-Buffer werden 27 ml Ethanol (96–100%) gegeben. Dieser kann bei Raumtemperatur 4 Wochen

Material und Methoden

gelagert werden. Bei Temperaturen von 2-8°C ist dieser länger verwendbar. Hier wurde er bei 8° C gelagert. Das Behältnis ist vor Verwendung der Lösung mehrfach zu schwenken. Der Bisulfit-Mix wird aus 650 µl Nuklease freiem Wasser und 250 µl Solubilization Buffer sowie dem mitgeliefertem festem Natrium-Metabisulfit bereitet. Es wird solange gemischt bis sich alles gelöst hat und die Lösung klar ist. Falls sich immer noch Partikel zeigen, kann stärker geschüttelt und die Lösung auf ca. 55-60°C für einige Minuten erhitzt werden. Jedes Fläschchen bietet Material für acht Reaktionen. Überschüssiger Bisulfat-Mix kann eingefroren 6 Monate gelagert werden.

Als erster Schritt der Bisulfit-Konversions-Reaktion werden die folgenden Stoffe in ein 0,2ml-PCR-Röhrchen gegeben und durch vorsichtiges Pipettieren gemischt.

Reagenz	Volumen pro Reaktion
Genomic DNA	10µl (50ng - 2µg)
Bisulfit-Mix	130µl
Gesamtvolumen	140µl

Als zweiter Schritt werden die Röhrchen in einem Thermocycler folgendem Zyklus unterzogen:

Zyklus-schritt	Temperatur	Dauer
Denaturation	95°C	5 Minuten
Inkubation	65°C	30 Minuten
Denaturation	95°C	5 Minuten
Inkubation	65°C	60 Minuten
Denaturation	95°C	5 Minuten
Inkubation	65°C	90 Minuten
Hold	18-20°C	Bis zu 12 Stunden

Als dritter Schritt erfolgen die Desulphonationsreaktion und das Aufreinigen der DNA.

Hierfür wird das jeweilige Reaktionsgemisch in 1,5 ml Zentrifugen-Röhrchen gegeben, mit zusätzlichen 550 µl DNA Bindingbuffer versetzt und kräftig geschüttelt. Jede Probe wird nun in eine EpiMark Spin Column mit anhängendem Sammelröhrchen pipettiert und bei 15.000 x g für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wird entsorgt. Anschließend werden 500 µl Wash Buffer hinzugegeben, bei 15.000 x g für eine Minute zentrifugiert und der Durchfluss wiederum entsorgt. Nun werden in jede Spin-column

Material und Methoden

500 µl Desulphonation Buffer gegeben und bei Raumtemperatur für 15 Minuten mit geschlossenen Deckeln inkubiert. Anschließend werden diese mit 15.000 x g für eine Minute zentrifugiert und der Durchfluss erneut entsorgt. Es folgt die Hinzugabe von 500 µl Wash Buffer und die Zentrifugation mit 15.000 x g für eine Minute. Der dabei gesammelte Durchfluss wird entsorgt. Dieser Waschvorgang wird einmal wiederholt. Als letzter Schritt wird ein letztes Mal mit 15.000 x g für eine Minute zentrifugiert und der Durchfluss entsorgt um verbleibenden Wash Buffer zu entfernen.

Jetzt werden die Spin-Kolumnen in sterile 1.5 ml Zentrifugen-Röhrchen gestellt, 20 µl Elution Buffer hinzugegeben, für eine Minute inkubiert und anschließend mit 15.000 x g für eine Minute zentrifugiert. Nochmals werden 20 µl Elution Buffer hinzugegeben und für 30 Sekunden bei 15.000 x g zentrifugiert. Die DNA ist nun für die Pyrosequenzierungs-PCR bereit. Vom Hersteller des Kits werden 1-6 µl DNA für jede PCR-Reaktion empfohlen. Die Konzentration der fertigen Bisulfit-DNA wurde am NanoDrop gemessen. Die BS-DNA wurde bis zur Weiterverwertung bei -20°C gelagert, bei längerer Aufbewahrungszeit bei -80°C.

Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Pyrosequenzierung

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist eine oftmals benutzte Methode um bestimmte Abschnitte einer zu untersuchenden DNA zu vervielfältigen. Hierbei wird durch Erhitzen der Probe die als Doppelstrang vorliegende DNA aufgetrennt. An die Einzelstränge können nun für den interessierenden Genabschnitt spezifische Primer binden und mittels einer ebenfalls zugegebenen Polymerase und Nukleotiden den Komplementärstrang synthetisieren. Nun liegt die DNA wieder als Doppelstrang vor. Durch weitere Wiederholung dieser Schritte kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation des erwünschten DNA-Abschnittes. Die verwendete Polymerase sollte hitzestabile Eigenschaften besitzen, wie sie die Taq-Polymerasen des Bakteriums *Thermus aquaticus* aufweisen. Auch die Primer arbeiten bei einer spezifischen Temperatur, die durch ihre Basenzusammensetzung determiniert ist (Mullis und Faloona 1987).

Pyrosequencing-PCR

In diesem Schritt wird die zu untersuchende Stelle eines Genes der Bisulfit-DNA vervielfältigt. Es wurden zudem biotinylierte Primer verwendet, an die im nächsten Schritt, der Sequenzierung spezielle Streptavidin-Sepharose-Beads anhaften sollen. Für die PCR wurden Pyromark CpG Assays für folgende Gene benutzt: TGFB2, BMP2,

Material und Methoden

BMP6 und BMP7. Es wurde nach dem Protokoll der Pyromark CpG Assays vorgegangen.

Protokoll der Pyrosequencing PCR

Das jeweilige Pyromark CpG Assay wird mit zwei Primer-Sets geliefert: Den Sequencing Primern und den Pyro-PCR-Primern. Pyro-PCR-Primer werden in TE Buffer gelöst und wurden für jeweils 24 Reaktionen aliquotiert. Die Sequencing Primer sind in Annealing Buffer gelöst und wurden nochmals 10:1 in Annealing Buffer verdünnt und anschließend für jeweils 24 Reaktionen aliquotiert sowie für den Schritt Pyrosequenzierung bei -20°C gelagert.

Verwendet wurden Pyro-PCR Primer aus folgenden Pyromark CPG Assays (Tabelle 4):

Tabelle 4 Pyromark Essay Primer

Name	Hs_BMP2_01_	Hs_BMP6_01_	Hs_BMP7_02_	Hs_TGFB2_01_
	PM PyroMark	PM PyroMark	PM PyroMark	PM PyroMark
	CpG assay	CpG assay	CpG assay	CpG assay
Catalog	PM00196763	PM00123529	PM00079352	PM00000763
ue				
number				
Product	978746	978746	978746	978746
number				
Nachwe	(QIAGEN	(QIAGEN	(QIAGEN	(QIAGEN
is	2013d)	2013a)	2013b)	2013c)

Als Polymerase wurde die Hotstart-Polymerase MyTaq verwendet (Bioline 2017). Die Primer des jeweiligen Qiagen-Kits sind biotinyliert um danach auf den mit Streptavidin ummantelten Beads immobilisiert werden zu können.

Folgender Ansatz wurde für die Pyrosequenzierung-PCR verwendet:

Material und Methoden

Komponente	Menge für ein Sample	Menge für 24 Samples
MyTaq Polymerase	12,5µl	300 µl
Pyro-PCR-Primer	2,5 µl	60 µl
ddH ₂ O	9 µl	216 µl
BS DNA	1 µl	24 µl
Summe	25 µl	600 µl

Der Mastermix wird bis auf die BS-DNA gemischt und auf die 0,2µl Röhrchen verteilt. Da die MyTaq-Polymerasen Hotstart-Polymerasen enthält, kann bei Raumtemperatur pipettiert werden. Nun wird die BS-DNA hinzugefügt und jedes Röhrchen kurz zentrifugiert. Die Röhrchen werden im Cyclyer mit folgendem Programm platziert:

Zyklusschritt	Temperatur	Dauer
1	95°C	3 Minuten
2	95°C	30 Sekunden
3	60°C	30 Sekunden
4	72°C	30 Sekunden
5	Go to step 2	45x
6	72°C	4 Minuten
7	4°C	hold

Die Ergebnisse wurden anschließend via Gel-Elektrophorese überprüft. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die PCR-Produkte bei -20°C gelagert.

Überprüfung der Pyrosequenzierung-PCR auf Agarosegel

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von geladenen Stoffen nach ihrer Größe via Spannungsdifferenz. So wandern auch DNA-Fragmente aufgrund der negativen Ladung der Phosphate von der Anode zur Kathode. Kleinere Fragmente erfahren in den Poren des Gels geringeren Widerstand und wandern aus diesem Grund schneller als größere Fragmente. Bei Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffes kann das Ergebnis nach gewisser Laufzeit mittels UV-Licht sichtbar gemacht werden. Diese Methode eignet sich auch zum Aufreinigen oder zur Identifizierung bestimmter DNA-Fragmente (Voytas 2001).

Agarose-Gele wurden folgendermaßen gefertigt und angewendet:

Material und Methoden

2g Agarose in 100ml TAE Buffer gelöst werden in einer Mikrowelle aufgeköcht. Anschließend wird 5µl Gel-Red hinzugefügt, vermischt, und das Gemisch in einem Gelschlitten zum Trocknen ausgegossen. Der Aushärtungsvorgang dauert ungefähr 30 Minuten. Die Geltaschen werden dabei mit einem Kamm freigehalten. Der Kühlschrank beschleunigt wahlweise den Trocknungsprozess.

Zur Überprüfung der Pyrosequenzierung-PCR wurden jeweils 2 µl des zu untersuchenden PCR-Produktes mit jeweils 1 µl Orange G versehen und in die Geltaschen aufgetragen (Abbildung 9). An den Anfang und an das Ende einer jeden Reihe wurde ein Tracer in die Geltaschen gesetzt. Die Elektrophorese fand nun in einem Wasserbad bei 400mA/ 46W / 170 V für 20 Minuten statt. Anschließend erfolgte die Betrachtung des Gels in einem Transilluminator unter UV-Licht. Hier war ersichtlich, ob die PCR erfolgreich den zu untersuchenden DNA-Abschnitt korrekt vervielfältigen konnte. Ebenfalls wurde auf dem Agarosegel jeweils die negative Kontrolle der PCR (Wasser anstatt DNA zugefügt) mit aufgetragen. PCRs mit kontaminierten Wasserproben wurden von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen. Anhand des mitlaufenden Tracers (100bp Marker) ließ sich die Größe der DNA-Stränge in Basenpaaren (bp) ablesen und nochmals überprüfen.

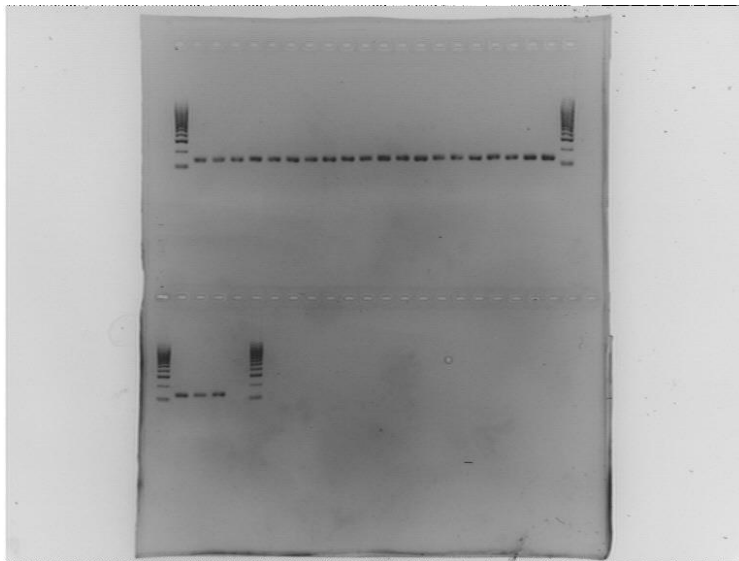


Abbildung 9: Beispielfoto eines Agarosegels mit PCR-Produkten (hier BMP2) unter UV-Licht und anschließender Inversion der Farben. Zudem sind erkennbar die Geltaschen, die Tracer (100bp) zu Beginn und Ende einer jeden Reihe und die negative Wasserprobe an letzter Stelle.

Material und Methoden

Pyrosequenzierung

Prinzip der Pyrosequenzierung

Das Prinzip der Pyrosequenzierung ist eine DNA-Sequenzanalyse während der Synthese. Hierfür werden schrittweise und nacheinander die verschiedenen Nukleotide zugegeben. Ist ein Nukleotid komplementär zur Base im Template-Strang so wird es durch die Polymerasen an den Synthese-Strang angebaut. Die zugegebenen Nukleotide besitzen ein „Pyrophosphatmolekül (PPi)“. Dieses wird bei jedem erfolgreichen Anbau eines Nukleotides freigesetzt (Abbildung 10).

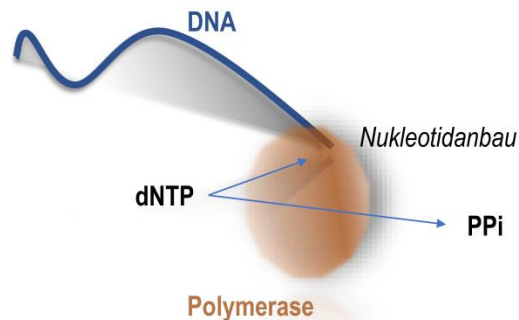


Abbildung 10 gezeichnet nach QIAGEN GmbH (QIAGEN GmbH, QIAGEN-Straße 1, D-40724 Hilden, DEUTSCHLAND und Smythe, Emma)

Dieses PPi wird nun enzymatisch in ATP umgesetzt. Das beteiligte Enzym heißt ATP-Sulphyrolase. Es wird zusätzlich Adenosin-5'-Phosphosulfat benötigt. Das gewonnene ATP dient nun als Energielieferant der Luziferase, ein Enzym das Luziferin in Oxylluziferase umsetzt. Diese Reaktion ist von einer Lichtemission begleitet. Diese Lichtemissionen werden von speziellen Rezeptoren, sogenannten CCD-Detektoren, erfasst, deren Intensität ausgewertet und als Peak dargestellt wird (Abbildung 11).

Material und Methoden

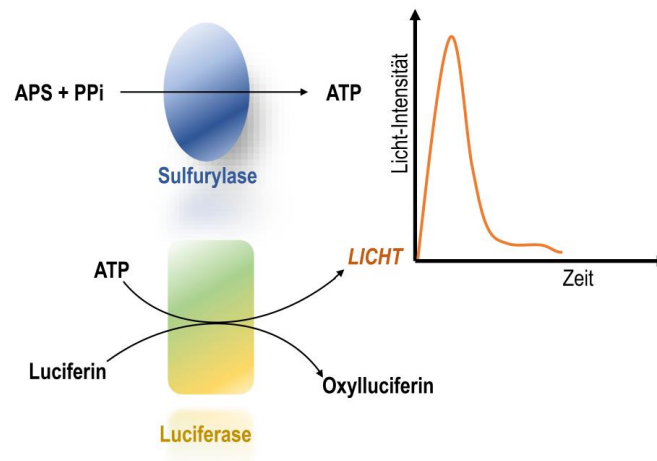


Abbildung 11: gezeichnet nach QIAGEN GmbH (QIAGEN GmbH, QIAGEN-Straße 1, D-40724 Hilden, DEUTSCHLAND und Smythe, Emma)

Nicht eingebaute Nukleotide werden enzymatisch abgebaut. Die nächste Injektion an Nukleotiden erfolgt erst, wenn die Abbaureaktion beendet ist. Somit wird verhindert, dass vormalig unpassende Nukleotide im nächsten Schritt reagieren können und falsche Ergebnisse liefern. Die für den Abbau zuständige Apyrase baut aus gleichen Gründen auch ATP ab (Abbildung 12).

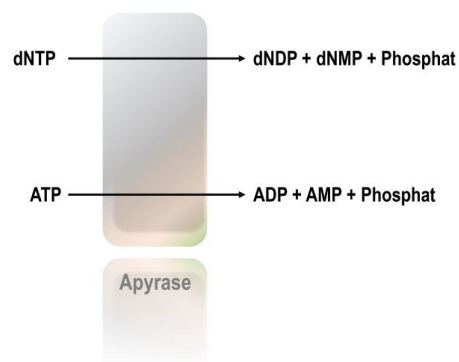


Abbildung 12 nach QIAGEN GmbH (QIAGEN GmbH, QIAGEN-Straße 1, D-40724 Hilden, DEUTSCHLAND und Smythe, Emma)

Damit die Quantität der Lichtemission der Menge eingebauter Nukleotide entspricht, gilt im gesamten Ablauf folgende Voraussetzung: Es wird immer nur eine Art an Nukleotiden in die Lösung gegeben. Mit jedem Einbau eines zugegebenen Nukleotides am Komplementärstrang wird genau ein PPi freigesetzt das enzymatisch zu einem ATP umgewandelt wird. Dieses ATP treibt als Energielieferant die Luziferase, die somit

Material und Methoden

quantisierte Lichtemissionen liefert. Die gemessene Lichtintensität lässt dadurch folglich auf die Menge an eingebauten Nukleotiden schließen (QIAGEN GmbH, QIAGEN-Straße 1, D-40724 Hilden, DEUTSCHLAND und Smythe, Emma) (Abbildung 13).

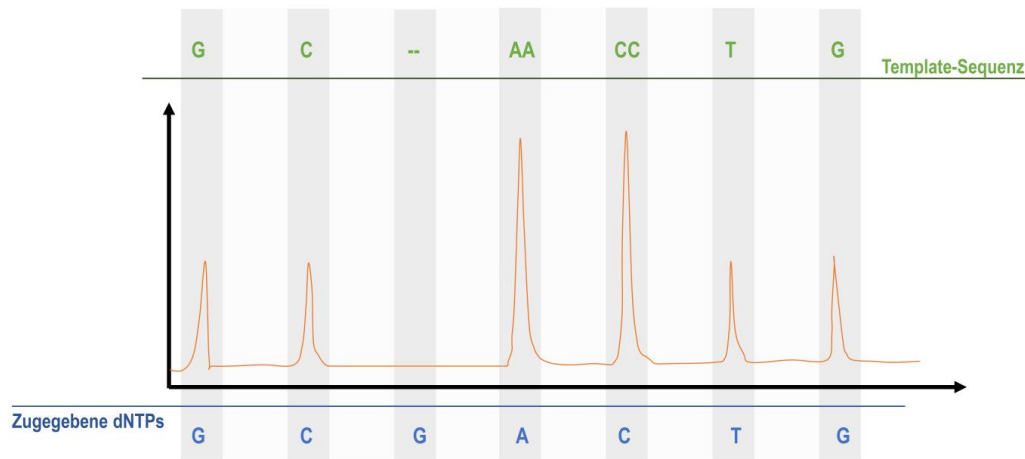


Abbildung 13: nach QIAGEN GmbH (QIAGEN GmbH, QIAGEN-Straße 1, D-40724 Hilden, DEUTSCHLAND und Smythe, Emma)

An der Abbildung ist ersichtlich, dass die Spitzen quantifiziert sind: jeder Einbau eines Nukleotides hat eine bestimmte Peakhöhe zur Folge. Werden in einem Schritt zwei gleiche Nukleotide hintereinander eingebaut, macht sich dies in einer äquivalenten Vergrößerung des Peaks bemerkbar.

Durchführung der Messung

Es wurden insgesamt 83 CP/CPPS Patienten und 39 Gesunde, sowie die Mastzelllinien LAD2 und HMC-1 und die Prostatakarzinom (PCa) Zelllinien PC3, LNCAP, DN145 auf ihre Methylierung hinsichtlich der Gene BMP2, BMP6, BMP7 und TGFB2 untersucht.

Die Durchführung der Messung erfolgte in enger Anlehnung an das PyroMark Q24 MDx User Manual, deutsch (QIAGEN GmbH, QIAGEN-Straße 1, D-40724 Hilden, DEUTSCHLAND und Smythe, Emma).

Nach der Vorbereitung der Pyromark Work Station erfolgt die Erstellung des Sequenzierprogrammes, das speziell auf die zu untersuchenden Gene und Proben zugeschnitten werden muss. Hieraus ergibt sich das für die Kartusche nötige Füllvolumen an Enzym und Substrat sowie der dNTPs. Die Vorbereitung des Mastermixes für die Sequenzier-Reaktion beinhaltet die Primer aus den jeweiligen Pyromark Assays den Pyromark Binding Buffer (Qiagen), ddH₂O und die Streptavidin-Sepharose-Beads. An

Material und Methoden

diesen werden die anschließend pro Vertiefung hinzupipettierten, biotinylierten PCR-Produkte immobilisiert. Das Durchmischen erfolgt auf einem Plattenschüttler. Die so an den Sepharose-Beads fixierten PCR-Produkte werden unter Zuhilfenahme eines Vakuum-Saugkopfes in der Pyromark-Work-Station folgenden Substanzen zugeführt: Ethanol, Denaturation Buffer und Wash Buffer. Anschließend wird eine jede Probe eines PCR-Produkt-Sepharose-Beads-Konglomerates in eine neue Vertiefung übertragen, in der sich bereits der für das zu untersuchende Gen benötigte Sequenzier-Primer befindet. In dieser 24-fachen-Platte, auf einer auf 80°C heißen Heizplatte abgestellt, kann nun die Annealing-Reaktion von PCR-Produkt und Sequenzier-Primer stattfinden. Anschließend wird die Platte in den Pyromark-Q24 gestellt, die mit Enzym, Substrat und dNTPs beladene Kartusche eingesetzt und der Lauf begonnen (QIAGEN GmbH, QIAGEN-Straße 1, D-40724 Hilden, DEUTSCHLAND und Smythe, Emma).

Folgende Reagenzien und Materialien müssen bereit stehen:

- Plattenschüttler (für Immobilisierung an die Beads)
- Heizblock, der bis auf 80 °C temperiert werden kann
- PyroMark Q24 Platte
- 24-Well-PCR-Platte oder -Streifen
- PyroMark Q24 Kartusche (Cartridge)
- Deckelstreifen
- Streptavidin-Sepharose-Beads (Streptavidin Sepharose High Performance; 34 µm, 5 ml; von GE Healthcare, siehe www.gelifesciences.com)
- QIAGEN IVD-markierte Assays für die Pyrosequenzierung
- doppelt destilliertes Wasser (ddH₂O, z. B. Milli-Q, Leitfähigkeit 18,2 MΩ x cm, oder vergleichbare Qualität)
- Ethanol (70 %)
- PyroMark Bindungspuffer ("Binding Buffer")
- PyroMark Denaturierungslösung ("Denaturation Solution")
- PyroMark Waschpuffer-Konzentrat ("Wash Buffer concentrate")

Material und Methoden

- PyroMark Annealing-Puffer (“Annealing Buffer”)

Nach Einschalten der Heizplatte mit dem darauf stehenden Q24 Plate Holder auf eine Zieltemperatur von 80°C werden die Wännchen der PyroMark Q24 MDx workstation folgendermaßen befüllt:

- ca. 50 ml Ethanol (70 %) (1)
- ca. 40 ml Denaturierungslösung (2)
- ca. 50 ml 1x Waschpuffer (3)
- ca. 50 ml hochreines Wasser (4)
- ca. 70 ml hochreines Wasser (5)

Vom Hersteller wird hierfür folgendes Schema vorgeschlagen (Abbildung 14):



Abbildung 14 zeigt die Pyromark work station von oben mit in der Ablage ruhendem Kamm (comb). Das vom Hersteller empfohlene Befüllungsmuster entspricht den Ziffern im Text.

Die Filter-Hohlnadeln des Saugkopfes werden in dem Wännchen mit 70ml hochreinem Wasser gespült.

Nun erfolgt die Vorbereitung des Q24 Programmes, das Konfigurieren einer Laufdatei und das Ausdrucken der *pre run information*, die ein Befüllungsschema für die Kartusche

Material und Methoden

(Cartridge) beinhaltet. Für jedes untersuchbare Gen kann im GENE GLOBE von Qiagen ein Assay Setup geladen werden. Dieser kennt Sequenz und potentielle Methylierungsstellen des Genes. Ein solches Assay wird für jede Probe in das Pyromark-Programm eingefügt. Anhand dieses Musters erfolgt anschließend die Sequenzierung. Für die Untersuchung wurden folgende Assays aus dem GENE GLOBE geladen und benutzt: Hs_BMP2_01_PM_Q24 für Bmp2 (QIAGEN 2013a), Hs_BMP6_01_PM_Q24 für BMP6 (QIAGEN 2013a), Hs_BMP7_02_PM_Q24 für BMP7 (QIAGEN 2013b) und Hs_TGFβ2_PM_Q24 für TGFB2 (QIAGEN 2013c). Jeder Lauf im Sequencer ist vom zu untersuchenden Gen und damit vom geladenen Assay abhängig. Dieses bestimmt die benötigte Menge an Nukleotiden sowie benötigte Primer und ein für das Gen spezifisches Ablaufprogramm.

Weiterhin ist zu beachten, dass jede Kartusche eine eigene Codierung besitzt, die eine für jede Kartusche einzigartige Methode im Sequencer abrufen (sogenannte Instrument Method. Dies beinhaltet unter anderem spezielle Druckverhältnisse für die jeweilige Kartusche. Es muss somit auf Übereinstimmung von Kartusche und Codierung geachtet werden.)

Das jetzt erstellte Programm wird auf einem USB-Speicher gespeichert. Dieser wird in den dafür vorgesehenen Platz im Pyromark Q24 inseriert und die Maschine angeschaltet.

Zur Vorbereitung der Immobilisierung der Proben für die Sequenzierung wurde folgender Ansatz verwendet:

Komponenten	Menge pro Well	Menge für 24 Wells
Binding Buffer	40 µl	960 µl
Streptavidin-Sepharose-Beads	4µl	96 µl
ddH ₂ O	12µl	288 µl
Biotinyliertes PCR Produkt	24µl	576 µl
Gesamtmenge	80µl	1920 µl

Die Streptavidin-Sepharose-Beads müssen unter Umständen durch langsames Drehen des Behältnisses in Lösung gebracht werden. Die biotinylierten PCR-Produkte werden auf diesen Beads immobilisiert.

Material und Methoden

Dieser Ansatz wird in eine 96 Well Mikrotiter-Platte pipettiert. Die belegten Vertiefungen werden mit einer Klebefolie verschlossen, so dass ein Übertritt an Flüssigkeit zwischen den einzelnen Vertiefungen ausgeschlossen ist. Die 96-Well-Mikrotiter-Platte wird nun für 10 min bei 1400 rpm auf einem Plattenschüttler geschüttelt. Da sie bei einem Durchlauf nur zu einem Viertel belegt wird, kann sie dementsprechend für weitere Durchgänge wiederverwendet werden.

In der Zwischenzeit kann die Kartusche mit Enzymgemisch und Substratgemisch, sowie der benötigten Menge an Nukleotiden befüllt werden (Pyromark Gold Q 24 Reagenzien). Dessen Mengen sind Lauf- und Cartridgeabhängig und werden vom Programm vorgegeben. Im Folgenden die Ansicht der Kartusche von oben: Enzymgemisch (E), Substratgemisch (S), Nukleotide (A, T, C, G). Das Befüllungsschema (Abbildung 15) der Kartusche ist Teil der *pre run information*.

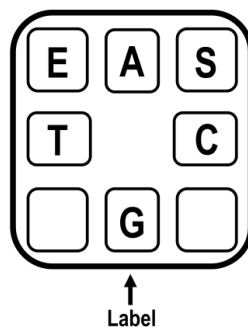


Abbildung 15: nach QIAGEN GmbH (QIAGEN GmbH, QIAGEN-Straße 1, D-40724 Hilden, DEUTSCHLAND und Smythe, Emma) Aufsicht und Befüllungsmuster der Kartusche.

Des Weiteren wird in die Q24 24-Well-Platte jeweils 25µl Sequenzier Primer (1:10 Verdünnung aus dem Primer Stock mit Annealing Buffer) pro Vertiefung vorgelegt.

Nach entsprechender Zeit kann die 96-Well-Mikrotiterplatte vom Plattenschüttler genommen und die Klebefolie entfernt werden. Durch Hochhalten des Saugkopfes der Vakuum-Station wird restliches Wasser aus dem Schlauch entfernt. *Hinweis vom Hersteller: Aufgrund der schnellen Sedimentierung der Sepharose-Beads sollte, falls diese länger als eine Minute stillstanden, erneut 1 Minute geschüttelt werden bevor die Beads angesaugt werden.* Anschließend wird der Saugkopf in die entsprechenden Vertiefungen der 96-Well-Mikrotiterplatte für 15 Sekunden platziert. Die Agarose Beads mit dem PCR-Produkt sollten jetzt am Saugkopf kleben. Dieser wird nun folgendermaßen in den Trögen der Workstation platziert:

Material und Methoden

5 Sekunden in Ethanol

5 Sekunden im Denaturation Buffer

15 Sekunden im Wash Buffer

Der Schlauch wird durch Hochhalten des Saugkopfes vollständig entleert. Daraufhin wird dieser in die entsprechenden Vertiefungen der Q24 24-Well-Platte platziert und das Vakuum ausgeschaltet. Es ist dringend auf die Ausrichtung des Kammes zu achten. Die Beads fallen nun vom Kamm. Dies kann durch leichtes Schütteln unterstützt werden.

Der Kamm sollte im verbleibenden H₂O Trog gespült und anschließend ausgeschaltet werden.

Für das Primer-Annealing wurde der PyroMark Q24 Platten-Halter bereits auf 80°C erhitzt. Hierauf wird nun die 24-Well-Platte für zwei Minuten platziert. Anschließend wird die 24-Well-Platte langsam für 5 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt um möglichst lange eine möglichst perfekte Primerannealing-Temperatur zu erhalten.

Nun wird die 24-Well-Platte in den Sequenzer gestellt, die beladene Cartridge eingesetzt und das vorher geladene Programm vom USB-Speicher gestartet. (QIAGEN GmbH, QIAGEN-Straße 1, D-40724 Hilden, DEUTSCHLAND und Smythe, Emma)

Die Auswertung erfolgte mithilfe der PyroMark Q24 Software. (QIAGEN GmbH, QIAGEN-Straße 1, D-40724 Hilden, DEUTSCHLAND und Smythe, Emma). Zuletzt muss die Kartusche mit ddH₂O gereinigt werden. Dabei ist auf ein gutes Durchspülen der einzelnen Düsen zu achten. Anschließend wird sie zum Trocknen aufgelegt.

Auswertung der Pyrosequenzierung mithilfe der Pyromark Q24 MDX Software

Die während des Pyrosequenzier-Laufes gewonnenen Daten werden wiederum auf dem inserierten USB-Stick gespeichert. Diese können mithilfe der Pyromark Q24 MDX Software ausgelesen werden. Erstellt wird dabei ein sogenanntes Pyrogramm, an dem für jede Probe die Basenfolge, die analysierte Peakhöhe und die ermittelte prozentuale Methylierung abgelesen werden kann. Ein Beispiel eines Pyrogrammes findet sich im Anhang.

Material und Methoden

Auswertung der erhobenen Daten

Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte unter Zuhilfenahme von SPSS Statistics Version 25.0.0.0, IBM. Beratend stand Herr Helge Hudel des Institutes der Medizinischen Informatik der Justus-Liebig-Universität zur Seite.

Die Explorative Datenauswertung umfasste Mittelwerte, Mediane, Standard-Fehler, Spannweite, Minimum und Maximum der Altersverteilung der Gesunden und der Patienten, und der Tryptasewerte. Es folgte ein Test auf Normalverteilung des Alters und der Tryptasewerte. Die konfirmatorische Analyse auf Differenzen der Tryptasewerte zwischen Gesunden und Kranken erfolgte bei nicht gegebener und nicht in die Normalverteilung zu transformierender Daten (logarithmische Transformation, Cox-Vox-Transformation) mit dem Mann-Whitney U-Test (2-seitig). Als Signifikanzniveau gilt generell $p=0,05$.

Die Tryptasewerte wurde hinsichtlich der Fragestellung eines möglichen Zusammenhangs mit in der klinischen Routine erhobenen Parametern (CRP, Leukozyten, IL-8, Testosteron und Östradiol) sowie dem Alter der Untersuchten mittels Spearman Rho korreliert. Als Signifikanzniveau gilt generell $p=0,05$.

Für die Auswertung der Methylierungen wurde über die CpGs eines jeden Genes der Mittelwert und der Median gebildet und diese explorativ ausgewertet (Mittelwerte, Mediane, Standard-Fehler, Spannweite, Minimum und Maximum). Die konfirmatorische Analyse auf Differenzen zwischen Gesund und Krank erfolgte nicht-parametrisch mittels Mann-Whitney U-Test (2-seitig). Als Signifikanzniveau gilt generell $p=0,05$.

Auch die einzelnen CpGs wurden hinsichtlich einer potentiellen Veränderung nur einzelner Stellen miteinander explorativ und konfirmatorisch mittels Mann-Whitney U-Test (2-seitig) verglichen. Als Signifikanzniveau gilt generell $p=0,05$.

Weitere Korrelationen der Methylierung mit dem Alter, dem Depressionswert des HADS, dem Schmerzwert des NIH-CPSI, Korrelationen der Methylierung der Gene untereinander und die Analyse der Methylierungen der Mastzellreihen und der PCa-Linien wurden explorativ untersucht, um gegebenenfalls weitere Fragestellungen in der Zukunft aufzuwerfen.

Ergebnisse

Beschreibung der Gesamt-Kollektives

Insgesamt wurden 83 Patienten mit CP/CPPS (Alter im Mittelwert 42,7 Jahre, Median 44 Jahre) und 40 Gesunde (Alter im Mittelwert 25,4 Jahre, Median 25 Jahre) (Tabelle 5) untersucht. Von den Erkrankten wurden 11 mit „chronische Prostatitis/chronischer Beckenschmerz Typ 3a“ (CP/CPPS3a) und 60 Patienten mit „chronische Prostatitis/chronischer Beckenschmerz Typ 3b“ (CP/CPPS3b) diagnostiziert. 3 Patienten hatten eine chronisch bakterielle Prostatitis (im Folgenden mit „CP“ abgekürzt) und 9 Patienten weisen ein nicht näher klassifiziertes Chronisches Beckenschmerzsyndrom (CPPS) auf. Da diese Krankheiten in der Summe noch unverstanden sind und eventuell auch viele potentielle Gemeinsamkeiten aufweisen, wurde die Kohorte der Erkrankten oftmals erstmals mit der der Gesunden verglichen und anschließend mehr Aufmerksamkeit auf die einzelnen Subdiagnosen gerichtet. Des Weiteren ist die Diagnose CP/CPPS3a oder CP/CPPS3b auch in gewisser Weise eine klinische Diagnose, ohne dass ein Biomarker zur Verfügung steht (Abbildung 16,Abbildung 17).

Tabelle 5 Alter der Gesamtkohorte in Jahren

Alter der Gesamtkohorte	Gesund	Krank	CPPS3a	CPPS3b	CP	CPPS
N	40	83	11	60	3	9
Mittelwert	25,4	42,7	52,5	41,3	49	37,9
Median	25	44	56	42	48	44
Std.- Abweichung	3,3	13,1	15,7	11,8	6,6	14,9
Min	32	17	25	22	43	17
Max	19	76	76	76	56	54

Ergebnisse

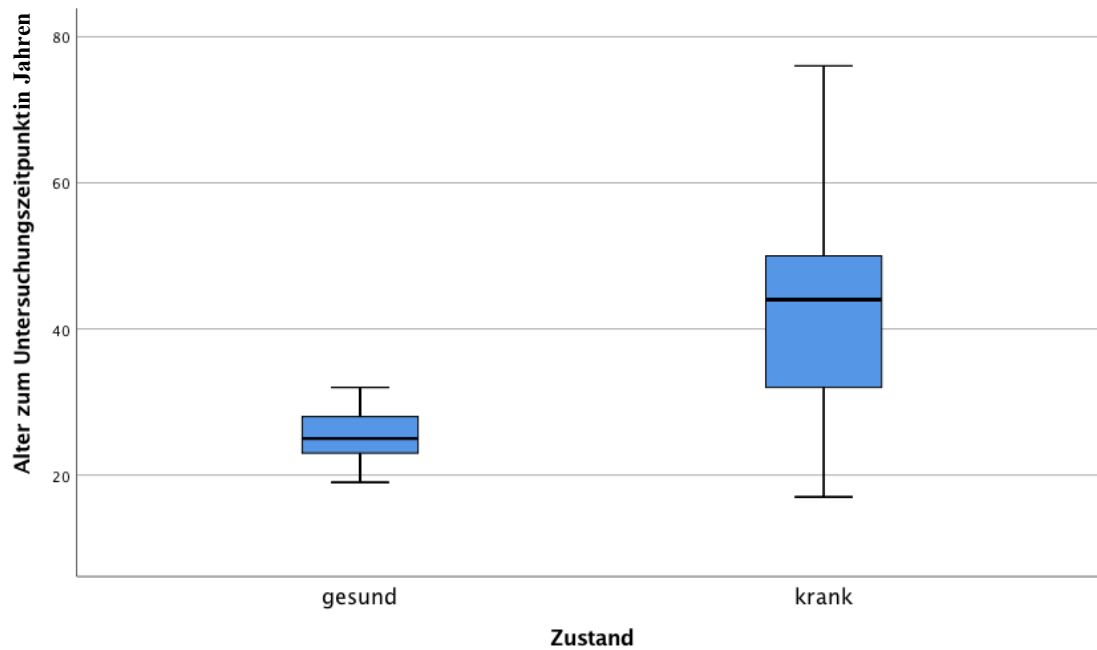


Abbildung 16 Alter zum Untersuchungszeitpunkt

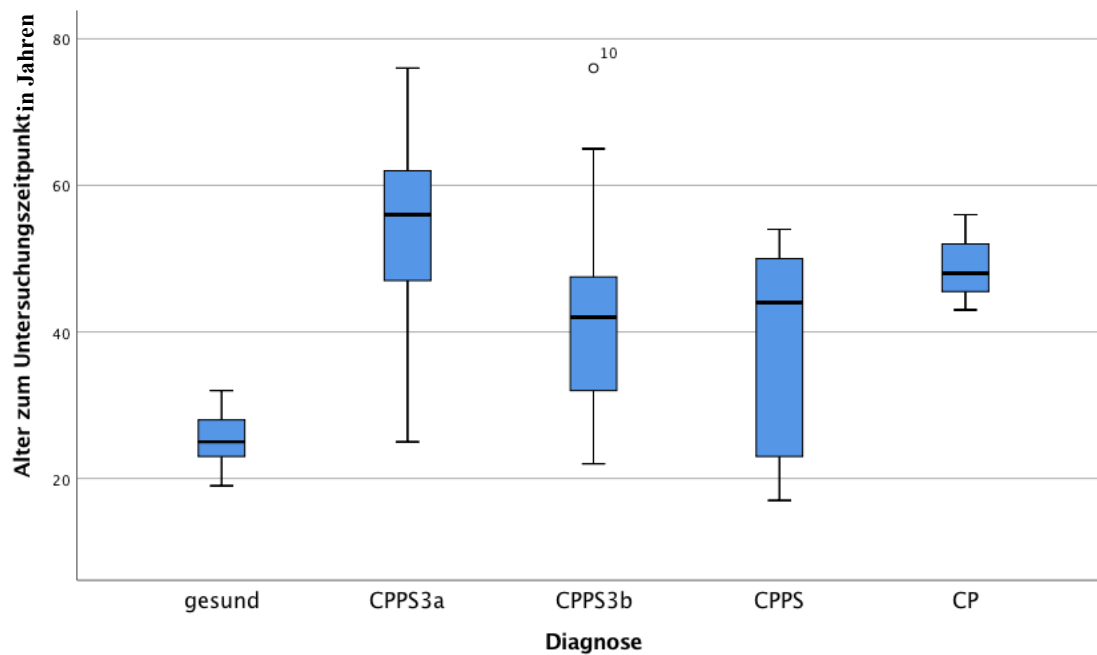


Abbildung 17 Alter zum Untersuchungszeitpunkt

In der Kohorte der Kranken befinden sich Patienten mit folgenden, verschlüsselten zusätzlichen urologischen Nebendiagnosen: So haben acht Patienten zusätzlich „Lower Urinary Tract Symptoms“ (LUTS). Dieser Symptomkomplex beschreibt Miktionsbeschwerden. Vier Patienten weisen eine erektile Dysfunktion (ED) auf, zwei

Ergebnisse

eine Ejaculatio Präcox (EP). Ein Patient hat ein Testosterondefizit, einer eine Nierenbeckenektasie. Zwei Patienten einen Hypogonadismus, einer eine Hydrozele. Vier weisen eine PSA-Erhöhung auf (Tabelle 6). Miktionsbeschwerden und sexuelle Dysfunktion können Teil des Prostatitisyndroms sein und werden mit Hilfe der UPOINTS Phänotypisierung klassifiziert (Shoskes et al. 2009).

Tabelle 6 Nebendiagnosen der Gesamtkohorte

Gesamte Nebendiagnosen	LUTS	Erektile Dysfunktion	Ejaculatio Präcox	Testosterondefizit
Anzahl	8	4	2	1
Gesamte Nebendiagnosen	Nierenbeckenektasie	Hypogonadismus	Hydrozele	PSA-Erhöhung
Anzahl	1	2	1	4

Ergebnisse der Tryptase-Messungen

Die Tryptase ist ein nahezu pathognomonisches Protein für die Mastzellaktivität. Aufgrund der Hypothese, dass Mastzellen allgemein im Entzündungsgeschehen eine tragende Rolle innehaben könnten und dies möglicherweise auch in der Erkrankung CP/CPPS der Fall ist, wurden im Folgenden die Tryptasespiegel des gesunden Kollektives gegen die der Patienten mit chronischer Prostatitis und Chronischen Beckenschmerzsyndrom verglichen.

Es wurden die systemischen Tryptasespiegel im Blut von 65 männlichen Patienten mit chronischer Prostatitis (CP) und 40 Gesunden untersucht. Unter den Patienten mit CP waren 9 mit CPPS3a, 53 mit CPPS3b, 8 mit einer chronischen (bakteriellen) Prostatitis und 3 mit einem nicht näher klassifizierten CPPS (Tabelle 7) (Tabelle 9). Als Nebendiagnosen haben 5 Patienten Lower Urinary Tract Symptoms (LUTS), 4 eine Erektile Dysfunktion (ED), 2 eine Ejaculatio Praecox, einer ein Testosterondefizit, einer eine Nierenbeckenektasie, 2 einen Hypogonadismus, 4 weisen eine PSA-Erhöhung auf und einer eine Hydrozele (Tabelle 8). Im Folgenden wurden die Tryptasewerte aller Patienten mit denen der Gesunden verglichen und anschließend die zwei Hauptdiagnosen CPPS3a und CPPS3b mit den Gesunden und miteinander.

Ergebnisse

Tabelle 7 zeigt die Altersverteilung der Tryptase-Untersuchten in Jahren

Alter(J) Tryptase	Gesunde	Kranke	CPPS3a	CPPS3b	CP
N	40	65	9	53	3
Mittelwert	25,4	44,2	55,6	42	49
Median	25	44	59	43	48
Std.- abweichung	3,3	12,5	14,2	11,4	6,6
Min	19	22	26	22	43
Max	32	76	76	76	56

Tabelle 8 listet die Nebendiagnosen der Tryptase-Untersuchten

Nebendiagnosen	LUTS	Erektile Dysfunktion	Ejaculatio Präcox	Testosterondefizit
Anzahl	5	4	2	1
Nebendiagnosen	Nierenbeckenektasie	Hypogonadismus	Hydrozele	PSA-Erhöhung
Anzahl	0	2	1	4

Tabelle 9 zeigt die explorative Analyse der Tryptasewerte

Tryptasespiegel in µg/ml	Gesunde	Kranke	CPPS3a	CPPS3b	CP
N	40	65	9	53	3
Mittelwert	5,6	5	5,8	4,9	4,9
Median	4	4,1	4,3	4,1	5,08
Std.-abweichung	5	4	4,6	4	1,9
Min	2,3	0,5	1,9	0,5	2,9
Max	30,6	27,6	16,2	27,6	6,8

Vergleich der Tryptasekonzentrationen von Patienten mit CP/CPPS und Gesunden

Hier wurde untersucht, ob sich Patienten mit CP (n=65, Alter: Mittelwert 44,2; Std-Abweichung 12,5; Median 44; Min 22; Max 76) im Vergleich zu Gesunden (n=40; Alter: Mittelwert 25,4; Std-Abweichung 3,3; Median 25,0; Min 19; Max 32) in den

Ergebnisse

Tryptasespiegeln unterscheiden. Die Explorative Analyse der Tryptasewerte zeigt für das gesamte Kollektiv der CP-Patienten: Mittelwert 5,0; Std-Abweichung 3,8; Median 4,1; Min 0,5; Max 27,6 und für Gesunde: Mittelwert 5,6; Std-Abweichung 5,0; Median 4,0; Min 2,3; Max 30,6 (Abbildung 18).

Der Test auf Normalverteilung der Tryptasewerte (Shapiro-Wilk) lieferte in beiden Gruppen $p=0.001$. Die Annahme der Normalverteilung wurde somit verworfen. Für die weitere Untersuchung wurde somit der Man-Whitney-U-Test verwendet

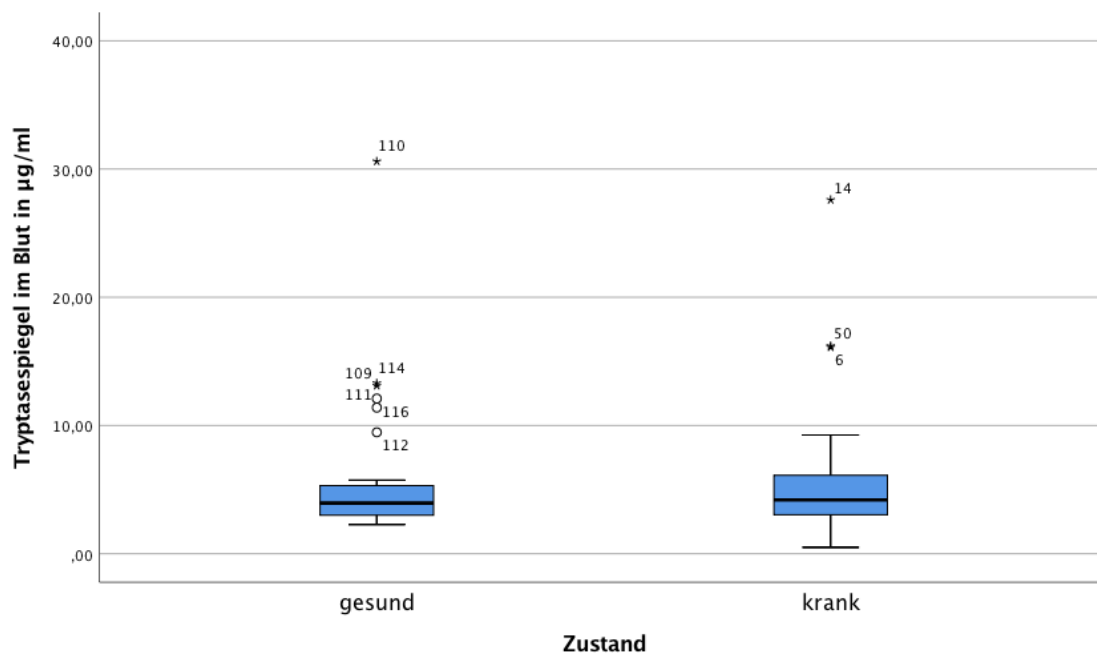


Abbildung 18 Tryptasekonzentrationen im Blut von Patienten mit CP/CPPS und Gesunden

Der Test auf Unterschiede in den Tryptasewerten über die beiden Gruppen Gesund und CP liefert $p=0,916$ (Man-Whitney-U-Test). Somit wird die Nullhypothese, die Mittelwerte der Tryptasespiegel sind über die Kategorien CP und gesund identisch, angenommen. Es konnte kein Unterschied der Tryptasewerte gefunden werden.

Vergleich der Tryptasewerte von Patienten mit CPPS3a und Gesunden

Hier wurde untersucht, ob sich Patienten mit CPPS3a ($n=9$; Alter: Mittelwert 55,6 ; Std-Abweichung 14,2 ; Median 59,0 ; Min 26 ; Max 76; im Vergleich zu Gesunden ($n=40$; Alter: Mittelwert 25,4; Std-Abweichung 3,3; Median 25,0; Min 19; Max 32) in den Tryptasespiegeln unterscheiden. Die Explorative Analyse der Tryptasewerte zeigt für CPPS3a-Patienten-Tryptase: Mittelwert 5,8; Median 4,3; Std-Abweichung 4,6; Min 1,9 ;

Ergebnisse

Max 16,2 und für Gesunde: Mittelwert 5,6; Std-Abweichung 5,0 ; Median 4,0; Min 2,3; Max 30,6. Die Daten erwiesen sich als nicht normalverteilt (Shapiro-Wilk-Test).

Der Test auf Unterschiede in den Tryptasewerten über die beiden Gruppen Gesund und CPPS3a liefert $p=0,949$ (Man-Whitney-U-Test). Somit wird die Nullhypothese, die Mediane der Tryptasespiegel sind über die Kategorien CPPS3b und Gesund identisch, angenommen. Es wurde somit kein Unterschied gefunden.

Vergleich der Tryptasewerte von Patienten mit CPPS3b und Gesunden

Unterscheiden sich Patienten mit CPPS3b ($n=53$; Alter: Mittelwert 42,0 ; Std-Abweichung 11,4 ; Median 43 ; Min 22 ; Max 76 im Vergleich zu Gesunden ($n=40$; Alter: Mittelwert 25,4; Std-Abweichung 3,3 ; Median 25,0 ; Min 19; Max 32) hinsichtlich der Tryptasespiegel? Die Explorative Analyse der Tryptasewerte zeigt für CPPS3b-Patienten-Tryptase: Mittelwert 4,9; Median 4,1; Std-Abweichung 4,0; Min 0,5; Max 27,6; und für Gesunde: Mittelwert 5,6; Std-Abweichung 5,0 ; Median 4,0 ; Min 2,3 ; Max 30,6.

Auch diese Daten waren nicht normalverteilt (Shapiro-Wilk) Der Test auf Unterschiede in den Tryptasewerten über die beiden Gruppen Gesund und CPPS3b liefert $p=0,765$ (Man-Whitney-U-Test). Somit wird die Nullhypothese, die Mediane der Tryptasespiegel sind über die Kategorien CPPS3b und Gesund identisch, angenommen. Es wurde somit kein Unterschied gefunden.

Vergleich der Tryptasewerte von Patienten mit CPPS3a und Patienten mit CPPS3b

Es wurde untersucht, ob sich Patienten mit CPPS3b ($n=53$; Alter: Mittelwert 42,0 ; Std-Abweichung 11,4 ; Median 43 ; Min 22 ; Max 76 im Vergleich zu Patienten mit CPPS3a ($n=9$; Alter: Mittelwert 55,6 ; Std-Abweichung 14,2 ; Median 55,6; Min 26 ; Max 76; hinsichtlich der Tryptasespiegel unterscheiden. Die Explorative Analyse der Tryptasewerte zeigt für CPPS3b-Patienten-Tryptase: Mittelwert 4,9; Std-Abweichung 4,0 ; Median 4,1 ; Min 0,5 ; Max 27,6 und für Patienten mit CPPS3a Tryptase: Mittelwert 5,8; Std-Abweichung 4,6 ; Median 4,3 ; Min 1,9 ; Max 16,2 (Abbildung 19)

Die Annahme der Normalverteilung wurde verworfen (Shapiro-Wilk).

Der Test auf Unterschiede in den Tryptasewerten über die beiden Gruppen Gesund und CPPS3a und b liefert $p=0,757$ (Man-Whitney-U-Test). Somit wird die Nullhypothese, die Mediane der Tryptasespiegel sind über die Kategorien CPPS3b und CPPS3a identisch, angenommen. Auch in diesen Gruppen wurde somit kein Unterschied gefunden.

Ergebnisse

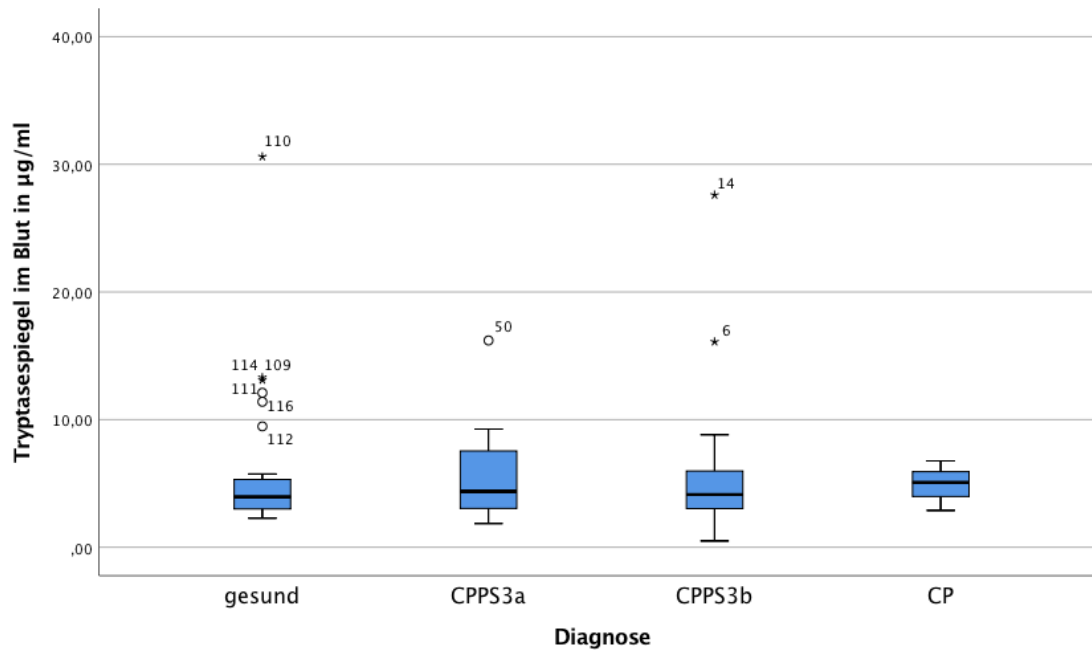


Abbildung 19 Tryptasespiegel im Blut im Vergleich der Subdiagnosen

Vergleich der Tryptasewerte von Patienten mit CPPS und Gesunden

Fasst man die Patienten mit den Subdiagnosen CPPS3a, CPPS3b und die nicht kategorisierten CPPS-Patienten unter dem Begriff Chronisches Beckenschmerzsyndrom zusammen ($n=65$) und vergleicht deren Tryptasespiegel mit den Gesunden ($n=40$), wird ebenfalls kein Unterschied deutlich ($p=0,825$; Man-Whitney-U-Test) (Abbildung 20).

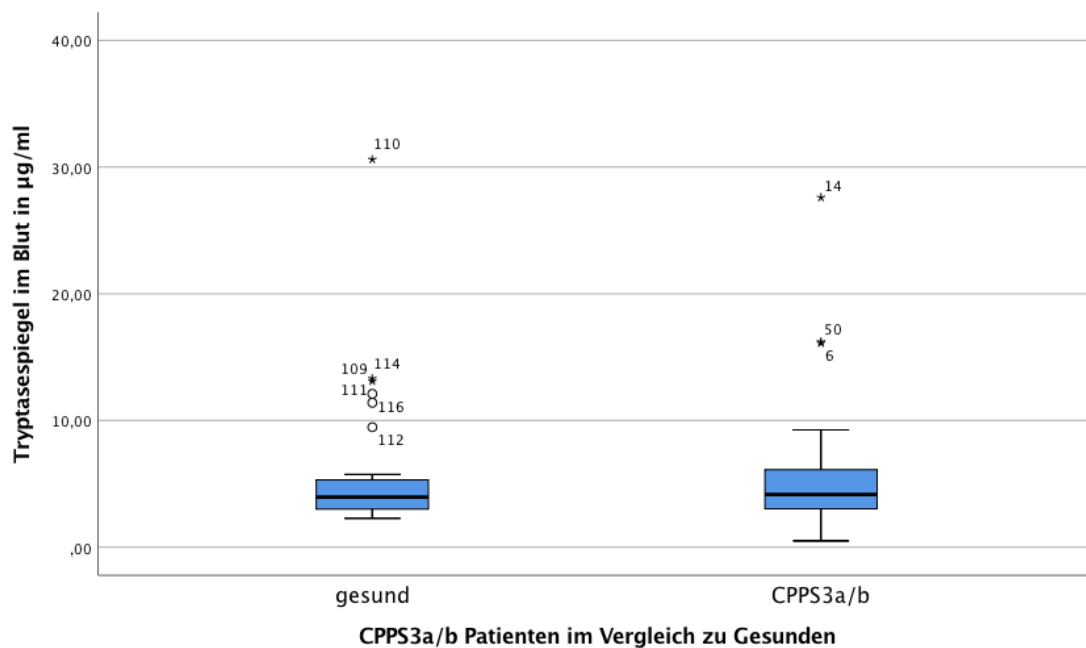


Abbildung 20 zeigt die Verteilung der Tryptasespiegel von Gesunden und Patienten mit CPPS

Korrelationen der Tryptase mit klinischen Parametern

Im folgenden Abschnitt wurde der Tryptasespiegel der Patienten mit in der klinischen Routine erhobenen Parametern korreliert. Darunter sind einerseits typische Entzündungsmarker wie das C-Reaktive Protein (CRP) im Blut, Leukozyten im Ejakulat und IL-8 im Seminalplasma als potentieller Marker für CPPS. Andererseits der Screening Parameter Prostata-Spezifisches Antigen (PSA) im Blut für Prostatakarzinom und BPH, sowie die Hormone Testosteron und Östradiol. Zudem erfolgte eine Korrelation des Alters der Untersuchten mit den Tryptasewerten. Auf eine Untersuchung inwieweit ein Unterschied im Hormonhaushalt zwischen gesunder und kranker Kohorte feststellbar ist wurde in dieser Arbeit, aufgrund des Altersunterschiedes der Kohorten und des potentiellen Einflusses des Alters auf den Hormonhaushalt, unterlassen. (Nesheim et al. 2018).

Korrelation der Tryptasespiegel mit dem Alter zum Untersuchungszeitpunkt

Aufgrund des großen Altersunterschiedes der Gruppen wurde ein möglicher Zusammenhang des Alters der Untersuchten mit den Tryptasespiegeln mittels Spearman Rho Korrelationen untersucht. Diese zeigt allerdings keine Signifikanz bei zudem sehr niedrigem R^2 -Wert (Spearman Rho, 2-seitig, $n=113$ $p=0,69$, $r=0,039$, $R^2 \text{ linear}=0,001$) (Abbildung 21). Diese Ergebnisse bestätigen sich auch in allen Gruppen des Kollektives (Gesunde, CPPS3a/b) bei jeweiliger einzelner Analyse. Eine Beeinflussung oder Abhängigkeit der gemessenen Tryptasewerte vom Alter der Untersuchten ist somit eher unwahrscheinlich.

Ergebnisse

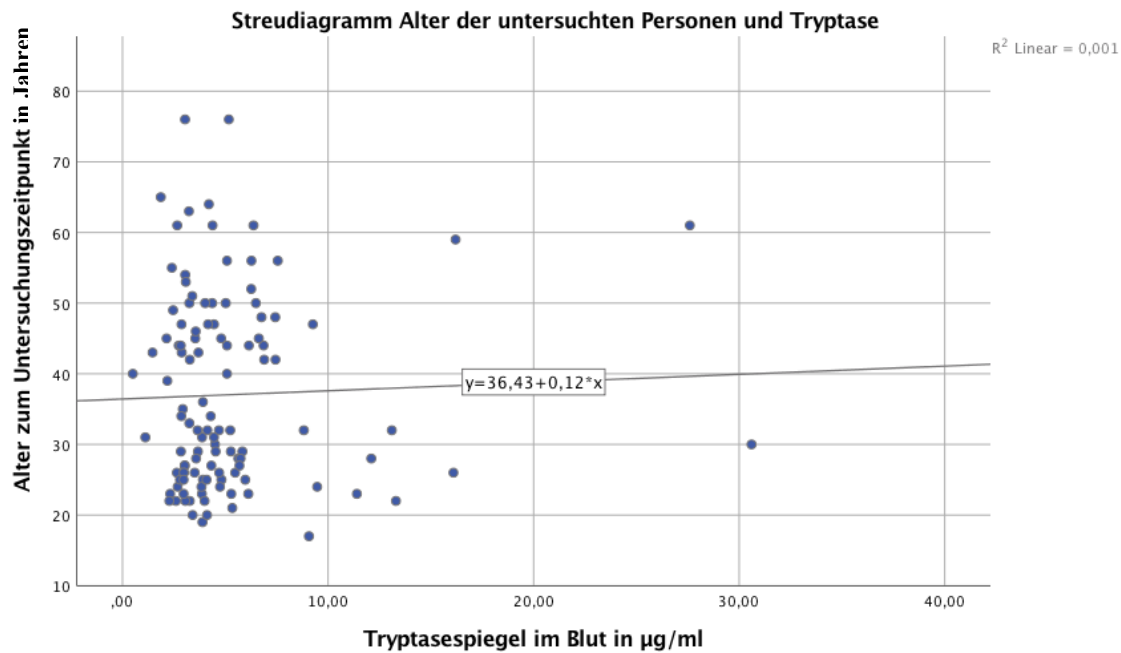


Abbildung 21 zeigt das Streudiagramm von Alter der Untersuchten und deren Tryptasespiegel. Es ist kein Zusammenhang ersichtlich.

Korrelation der Tryptasespiegel mit Entzündungsparametern

Beim Auftragen der Tryptasespiegel der Patienten gegen das klinisch erhobene CRP im Blut (Spearman Rho, 2-seitig, $n=0,15$, $p=0,22$, $r=0,15$, $R^2 \text{ linear}=0,003$) (Abbildung 23) und das IL-8 im Seminalplasma (Spearman Rho, 2-seitig, $n=56$, $p=0,75$, $r=-0,04$, $R^2 \text{ linear}=0,002$) (Abbildung 22) ergibt sich keine Korrelation. Auf eine potentielle Erhöhung des IL-8-Spiegels der CPPS-Patienten im Vergleich zu Gesunden konnte nicht getestet werden, da zum Zeitpunkt der Erhebung dieser Daten eine Bestimmung des IL-8-Spiegels in der Kohorte der Gesunden noch nicht erfolgte.

Auch der Vergleich der Leukozyten im Ejakulat mit den Tryptasespiegeln zeigte keinen Zusammenhang (Spearman Rho, 2-seitig, $n=60$, $p=0,35$, $r=-0,12$, $R^2 \text{ linear}=0,022$), ebenso wenig das PSA (Spearman Rho, 2-seitig, $n=68$, $p=0,11$, $r=-0,2$, $R^2 \text{ linear}=0,078$).

Ergebnisse

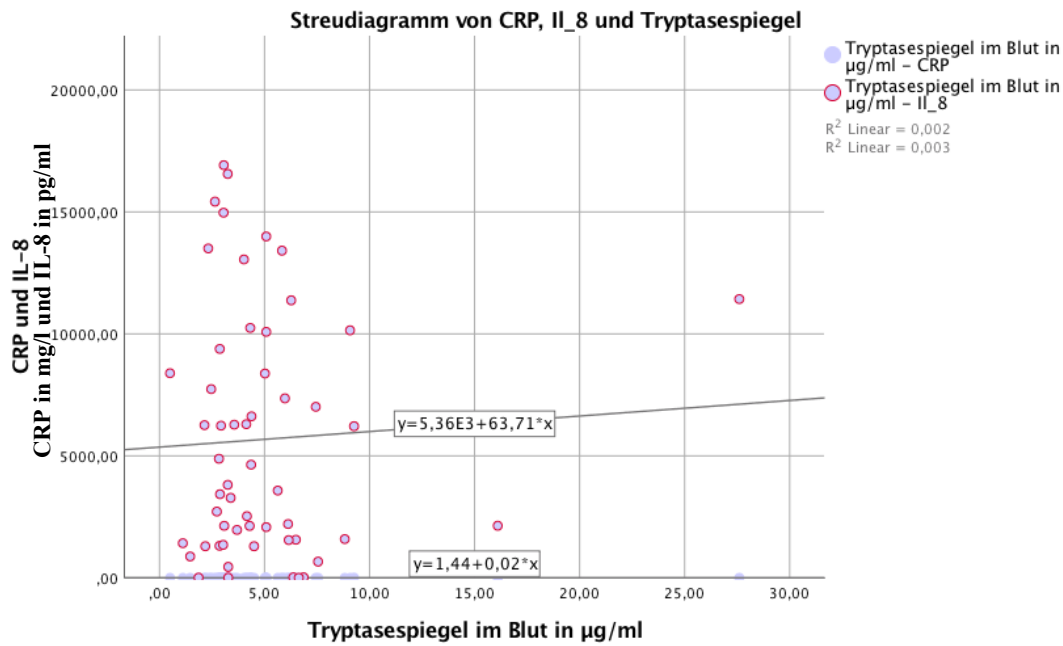


Abbildung 22 zeigt das Streudiagramm der IL-8- und den Tryptasespiegeln.

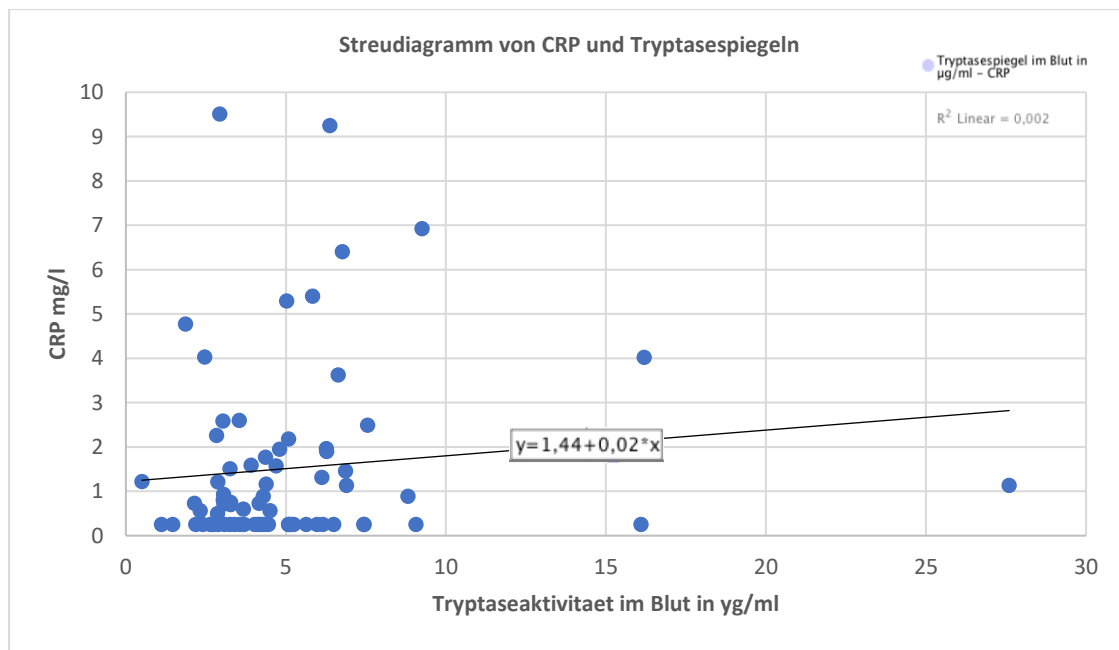


Abbildung 23 zeigt das Streudiagramm der CRP- und der Tryptasespiegel

Die Abbildungen 22 und 23 zeigen die Auftragung von Tryptase gegen CRP (Spearman Rho, 2-seitig, $n=0,15$, $p=0,22$, $r=0,15$, R^2 linear=0,003) und Tryptase gegen IL-8 (Abbildung 16) (Spearman Rho, 2-seitig, $n=56$, $p=0,75$, $r=-0,04$, R^2 linear=0,002). Es besteht kein Zusammenhang und keine Signifikanz.

Ergebnisse

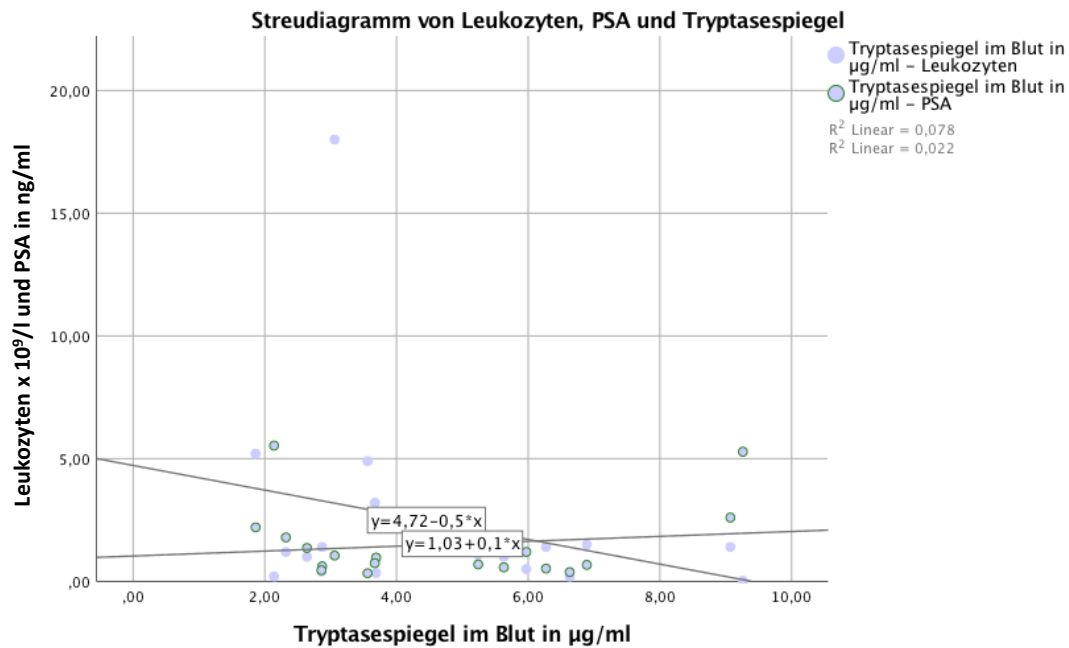


Abbildung 24 zeigt das Streudiagramm von Leukozyten, PSA und den Tryptasespiegeln.

Das Diagramm (Abbildung 24) zeigt die Tryptasespiegel aufgetragen gegen die Leukozyten im Blut (Spearman Rho, 2-seitig, $n=60$, $p=0,35$, $r=-0,12$, R^2 linear=0,022) und die Tryptasespiegel aufgetragen gegen die PSA-Werte (Spearman Rho, 2-seitig, $n=68$, $p=0,11$, $r=-0,2$, R^2 linear=0,078). Die Ergebnisse zeigen einen geringen Zusammenhang der Tryptasespiegel und der Leukozyten im Blut, dieser ist jedoch ohne Signifikanz.

Ergebnisse

Korrelation der Tryptase und Hormone

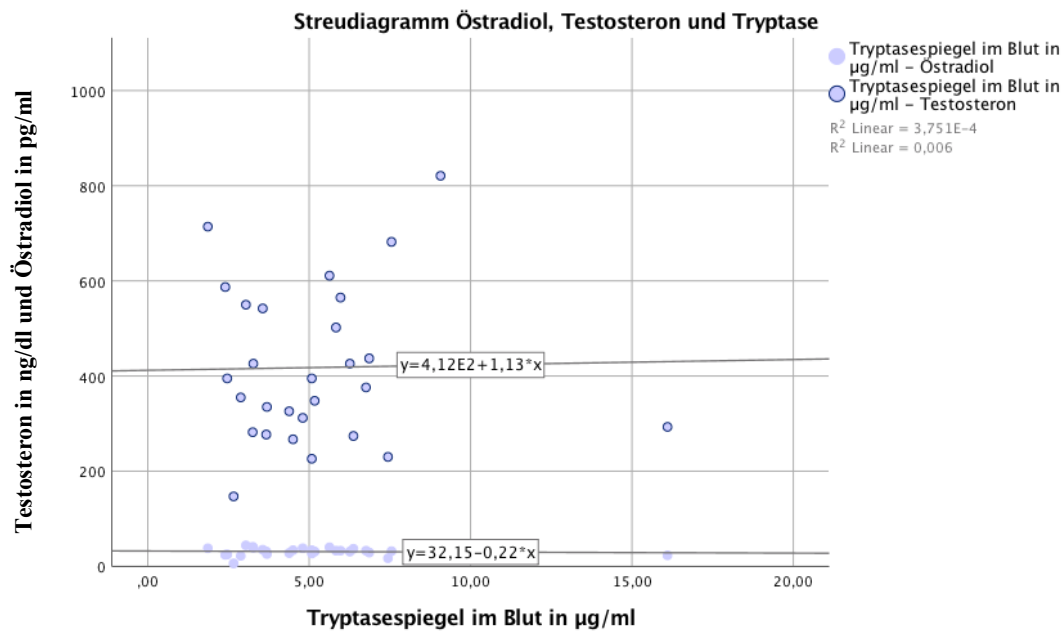


Abbildung 25 zeigt das Streudiagramm der Hormone Östradiol, Testosteron und Tryptase.

Abbildung 25 zeigt Tryptase gegen Testosteron (Spearman Rho, 2-seitig, $n=69$, $p=0,59$, $r = -0,07$, $R^2 \text{ linear}=0,006$) und Tryptase gegen Östradiol (Spearman Rho, 2-seitig, $n=29$, $p=0,59$, $r = -0,07$, $R^2 \text{ linear}=3,75E-4$). Es besteht kein Zusammenhang oder Signifikanz.

Ergebnisse der DNA-Methylierungsanalysen

Allgemeine Messung und Patientendisposition

Die Messung der Methylierung der oben genannten Gene erfolgte, da einerseits Nachweise vorliegen, dass in Patienten mit CP/PPS epigenetische Veränderungen erfolgen und andererseits eine erhöhte Östrogenkonzentration im Seminalplasma von Patienten mit CP/PPS nachgewiesen wurde. Darüberhinaus wurde gezeigt, dass erhöhte Östrogenkonzentrationen auch epigenetische Konsequenzen haben. Dies wurde in der Arbeit von (Putnik et al. 2012) gezeigt, in der auch deutliche Expressionsänderungen von TGFβ2 unter Östrogen gezeigt werden konnten. Des Weiteren zeigten, in der Arbeit von (Nesheim et al. 2018), die Mastzelllinien HMC-1 und LAD2 unter erhöhten Östrogenkonzentrationen Expressionsänderungen; Dies auch in den Genen BMP2 und BMP7. Diese Gene, inklusive TGFβ2 und BMP6, sind Mitglieder einer Proteinsuperfamilie. Sie wurden in dieser Arbeit auf Unterschiede der Methylierungen

Ergebnisse

zwischen Patienten mit CP/CPPS und Gesunden hin untersucht. Auch erfolgte die Untersuchung der Methylierung dieser Gene in den Mastzelllinien HMC-1 und LAD2 nach 24-stündiger Östrogenbehandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen. Zur weiteren Orientierung erfolgte die Analyse der Methylierung dieser Gene auch in den Prostatakrebszelllinien PC3, DN145 und LnCaP. BMP2 und BMP6 werden in der Literatur mit einer möglichen Assoziation zu Prostatakrebs beschrieben (GeneCards Human Gene Database 1998b-2018; Tian et al. 2017).

Die Messung der Patienten und Gesunden erfolgte im EDTA-Blut. Es handelt sich somit um eine systemische Messung. Es erfolgte die DNA-Extraktion aus Vollblut, eine Bisulfit-Behandlung der gewonnenen DNA, eine PCR mit biotinylierten Primern, und anschließend die Pyrosequenzierung.

Ausschluss von 11 Patienten

Von den auf ihre Methylierungen der Gene BMP2, BMP6, BMP7 und TGF β 2 untersuchten Patienten wurden 11 Patienten retrospektiv von der Auswertung ausgeschlossen. Sie zeigten vorwiegend in BMP2 über alle Stellen als Einzige auffällig hohe Methylierungen, die in einer Kontrollmessung bestätigt werden konnten. Jedoch konzentrieren sich diese Patienten auf das früheste Untersuchungsdatum. Dieses zeigt auch eine starke Korrelation mit der Methylierung von BMP2 (R^2 Linear = 0,22) und ist signifikant ($p=0,001$, 2-seitig, Spearman Rho, $r= -0,6$) (Abbildung 26). Es wurde deswegen der Verdacht auf einen frühen Verfahrensfehler oder systemischen Fehler bei der Prozessierung dieser Patientenmaterialien ausgegangen und die Werte als Artefakt behandelt. Der Ausschluss dieser Patienten von der Auswertung erfolgte auch für BMP6, BMP7 und TGF β 2, da hier das gleiche Ausgangsmaterial verwendet wurde.

Ergebnisse

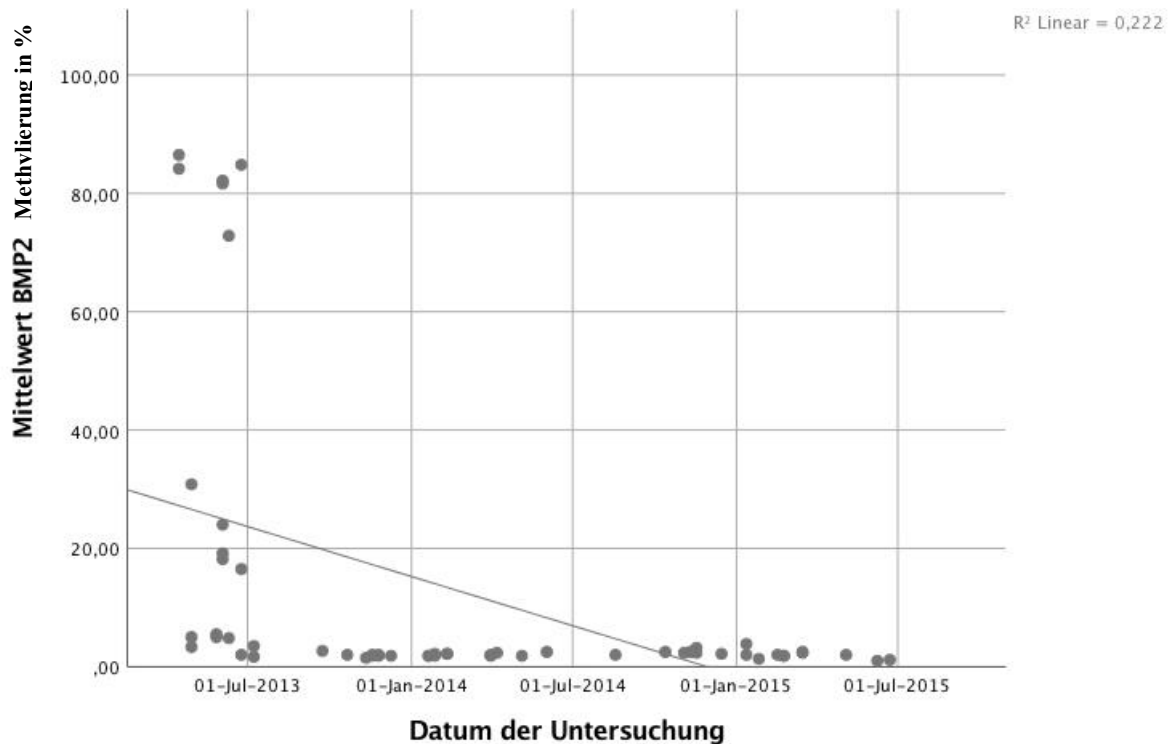


Abbildung 26 zeigt die Akkumulation und Korrelation von Erhebungsdatum und dem Methylierungsgrad von BMP2 in Patienten. Besonders hohe Methylierungsgrade konzentrieren sich auf nahe beieinanderliegende Erhebungsdaten, deren gewonnene Proben zusammen weiter prozessiert wurden. Diese wurden retrospektiv als Artefakte ausgeschlossen.

Die nachfolgenden Zahlenangaben der Methylierung in den Tabellen sind in Prozent auf die maximal mögliche Methylierung zu verstehen. Über den prozentualen Grad der Methylierung der jeweiligen zur Methylierung prädisponierten CpGs des Genes wurde der Mittelwert gebildet und anschließend explorativ untersucht. Mögliche Unterschiede wurden mithilfe des Man-Whitney-U-Testes auf Signifikanz geprüft.

Tabelle 10 Übersicht über Gen-Namen, Anzahl der CpGs und Mittelwerte der Methylierungen.

Gen	Anzahl CpGs	Methylierung in %						
		Gesunde	Kranke	CPPS3a	CPPS3b	CP	HMC-1	LAD2
BMP2	6	2,3	2,4	2	2,5	2,3	89	87,5
BMP6	7	1,9	2,2	1,9	2,2	2,6	3,3	1,9
BMP7	5	6,8	6,8	7,7	6,6	7,8	29	3,4
TGFB2	6	1,5	1,4	1,3	1,4	1,7	90,8	4,3

Methylierung des *BMP2* Promotors

Das Gen Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2) (Abbildung 27) codiert für ein ubiquitär vorkommendes Zytokin das erstmals in der Zelldifferenzierung, speziell von Knochen und Knorpel beschrieben wurde. Es ist Mitglied der TGFB-Superfamilie (GeneCards Human Gene Database 1998a-2018). In der Literatur werden potentielle Assoziationen zum Tumorwachstum beschrieben (Tian et al. 2017).

Für die Analysierung der Methylierungsverhältnisse von BMP2 in Bezug auf den Vergleich Gesunde und Patienten mit CP/CPPS wurden Proben von 39 Gesunden und 45 Erkrankten untersucht und ausgewertet. Das CP/CPPS Kollektiv bildeten hier 3 Patienten mit CPPS3a, 35 Patienten mit CPPS3b und 6 Patienten mit Chronischer bakterieller Prostatitis und ein Patient mit nicht näher klassifiziertem CPPS. Als Nebendiagnosen haben 3 Patienten Lower Urinary Tract Symptoms (LUTS), 2 eine Erektile Dysfunktion (ED), 2 eine Ejaculatio Praecox, einer ein Testosterondefizit, 1 einen Hypogonadismus und 1 weist eine PSA-Erhöhung auf (Tabelle 12).

Die Altersverteilung der Gruppen wird in nachfolgender Tabelle und den zugehörigen beiden Diagrammen beschrieben (Tabelle 11). Es zeigt sich ein auffälliger Altersunterschied zwischen Gesunden und Kranken, sowie den Gesunden und den Subdiagnosen.

Tabelle 11 Alter der BMP2-Untersuchten in Jahren

Alter BMP2	Gesunde	Kranke	CPPS3a	CPPS3b	CP	CPPS
N	39	45	3	35	6	1
Mittelwert	25,3	39,2	32,7	39	41,8	—
Median	25	42	26	40	47	—
Std.- abweichung	3,3	10,9	12,4	10,6	13,2	—
Min	19	22	25	23	22	—
Max	32	64	47	64	54	—

Ergebnisse

Tabelle 12 Nebendiagnosen der BMP2-Untersuchten

BMP2 Nebendiagnosen	LUTS	Erektile Dysfunktion	Ejaculatio Präcox	Testosterondefizit
Anzahl	3	2	1	1
Nebendiagnosen	Nierenbeckenektasie	Hypogonadismus	Hydrozele	PSA-Erhöhung
Anzahl	0	1	0	1

Bei der Pyrosequenzierung von BMP2 im Vollblut wurden 6 CpGs der Promotorregion des Genes auf Methylierung untersucht.

Die Proben aller Kollektive zeigen eine Hypomethylierung dieses Genes. So liegt der Mittelwert der Methylierung der Gesunden bei 2,3%, der der zusammenfassenden Gruppe der Kranken bei 2,4%. Die weiter interessierenden Teilgruppen der Kranken, CPPS3a und CPPS3b, sind zu 2% und 2,5% methyliert. Der Median der Gesunden beträgt 2,2, der der Kranken und der Teilgruppen der Kranken 2% (Abbildung 28) (Tabelle 13). Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen der Gesunden und Kranken (Man-Whitney-U-Test, 2-seitig, $p=0,44$) sowie zwischen den Gruppen der Gesunden und Patienten mit CPPS3a/b (Man-Whitney-U-Test, 2-seitig, $p=0,544$) gefunden.

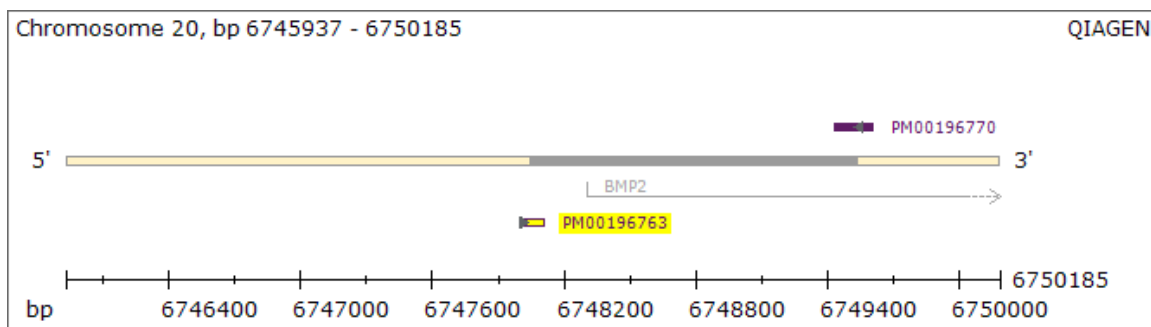


Abbildung 27 zeigt die Promotorregion des Genes und die Lage der untersuchten CpGs: QIAGEN 2013 - PyroMark Cp BMP2 CPG inseln (QIAGEN 2013d)

Ergebnisse

Tabelle 13 explorative Daten der Methylierungslevel von BMP2 in %

Methylierung BMP2	Gesunde	Kranke	CPPS3a	CPPS3b	CP	CPPS
N	39	45	3	35	6	1
Mittelwert	2,3	2,4	2	2,5	2,3	—
Median	2,2	2	2	2	2,3	—
Std.-abweichung	1	1	0,1	1,1	0,7	—
Min	1,17	1	1,8	1	1,5	—
Max	7	5,5	2	5,5	3,5	—

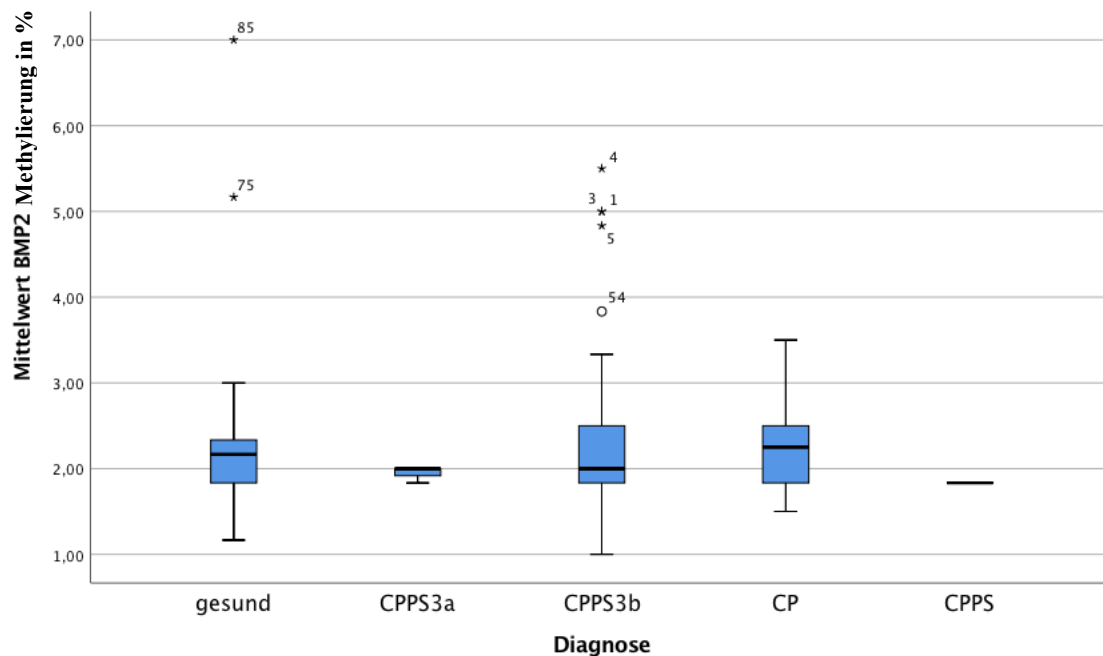


Abbildung 28 zeigt die Methylierungsverhältnisse von BMP2. Ersichtlich sind hier eine höhere Streuung der Werte bei Patienten mit CPPS3b und 2 Ausreißer unter den Gesunden.

Vergleich der einzelnen CpGs von BMP2 von Gesund zu Patienten mit CP/CPPS

Da die Methylierung der CpGs der Promotorregionen eines Genes nicht zwangsläufig an allen Stellen erfolgen muss, wurden im Folgenden die einzelnen CpGs miteinander, in Bezug auf ihre Methylierungen, verglichen. Hierfür wurden die Gruppen der Gesunden (n=39) gegen die Gruppe mit chronischen Beckenschmerzsyndrom (CPPS), also CPPS3a und CPPS3b (n=39), miteinander verglichen (Tabelle 14). Ersichtlich sind hier eine höhere Streuung der Werte bei Patienten mit CPPS3b. Zudem zeigte sich ein signifikanter

Ergebnisse

Unterschied der Stelle 5 der Promotorregion des Genes BMP2 (Man-Whitney-U-Test, 2-seitig, $p=0,035$) (Abbildung 29). Diese ist in Gesunden im Mittelwert zu 1,1% methyliert, Median 1%, in der CPPS-Gruppe im Mittelwert zu 1,36%, Median 1%. Es ergibt sich eine mittlere Effektstärke (Effektstärke $r = |Z|/(n^{0,5}) = 0,24$ (mittlere Effektstärke)). Die mit Östrogen behandelte Mastzelllinie HMC-1 von (Nesheim et al. 2018) zeigte eine Down-Regulation der Expression von BMP2 im RT² Profiler. In Anbetracht des erhöhten Östrogenspiegels in Patienten mit CP/CPPS (Nesheim et al. 2018) fügt sich dieses Ergebnis gut in das Gesamtbild. Im Vergleich hierzu zeigen die Mastzelllinien der nur kurz mit Östrogen stimulierten Mastzellreihen keine nachvollziehbare Änderung der Methylierung, auch nicht isoliert an der 5. Stelle.

Tabelle 14 explorative Daten Methylierungslevel Stelle 5 von BMP2 in %

Stelle 5 BMP2	Gesunde	CPPS3a/b
n	39	39
Mittelwert	1,1	1,36
Median	1	1
Std.-abweichung	1	0,9
min	0	0
max	6	4

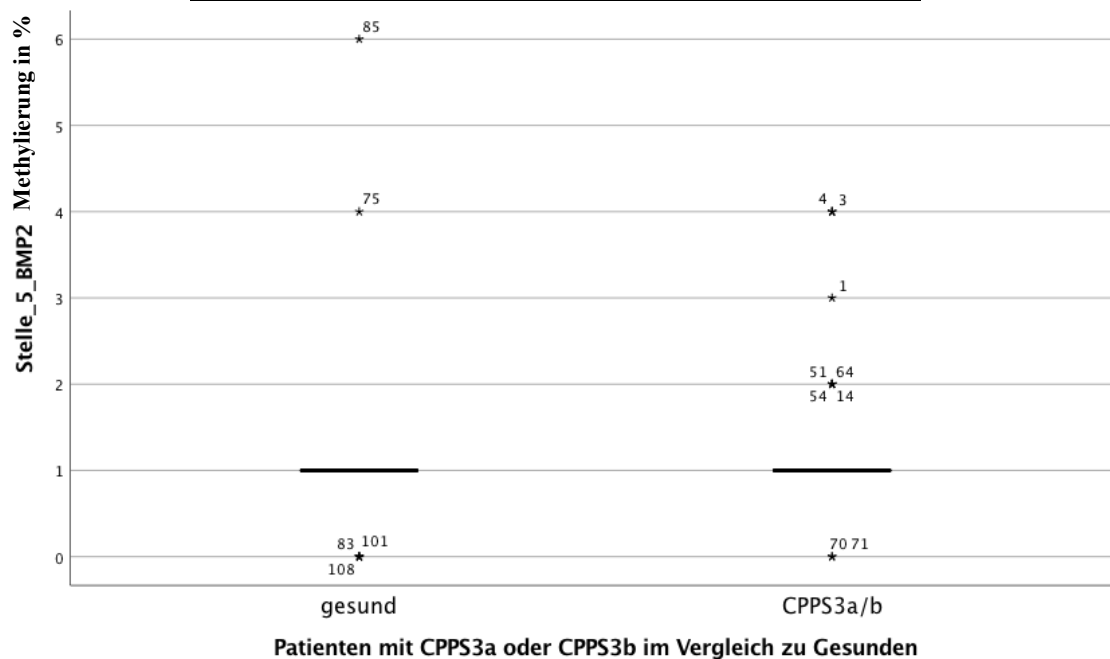


Abbildung 29 zeigt die Methylierungsverhältnisse der 5.Stelle des BMP2 Promotors.

Ergebnisse

Methylierung des *BMP6* Promotors

Das Gen Bone Morphogenetic Proteine 6 (Abbildung 30) codiert für ein ebenso genanntes Protein aus der TGFB-Superfamilie. Auch dieses ist an der Gewebedifferenzierung, speziell von Knochen und Knorpel, beteiligt (GeneCards Human Database 1998c-2018).

Für die Analysierung der Methylierungsverhältnisse von BMP6 in Bezug auf den Vergleich Gesunde und Patienten mit CP/CPPS wurden Proben von 39 Gesunden und 50 Erkrankten untersucht und ausgewertet. Das CP/CPPS Kollektiv bildeten hier 3 Patienten mit CPPS3a, 41 Patienten mit CPPS3b und 5 Patienten mit Chronischer bakterieller Prostatitis und ein Patient mit nicht näher klassifiziertem CPPS (Abbildung 31) (Tabelle 15). Als Nebendiagnosen haben 3 Patienten Lower Urinary Tract Symptoms (LUTS), 2 eine Erektile Dysfunktion (ED), 2 eine Ejaculatio Praecox, einer ein Testosterondefizit, 1 einen Hypogonadismus und 1 weist eine PSA-Erhöhung auf (Tabelle 16).

Die angegebenen Zahlen der Methylierung sind in Prozent auf die maximal mögliche Methylierung zu verstehen. Über den prozentualen Grad der Methylierung der jeweiligen zur Methylierung prädisponierten Stellen des Genes wurde der Mittelwert gebildet und anschließend explorativ und konfirmatorisch untersucht (Tabelle 17). Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen der Gesunden und Kranken (Man-Whitney-U-Test, 2-seitig, $p=0,41$) sowie zwischen den Gruppen der Gesunden und Patienten mit CPPS3a/b (Man-Whitney-U-Test, 2-seitig, $p=0,41$) gefunden. Auffallend ist hingegen die höhere Streuung der Werte der Patienten mit CPPS3b.

Die Altersverteilung der Gruppen wird in nachfolgender Tabelle und den zugehörigen beiden Diagrammen beschrieben. Es zeigt sich ein auffälliger Altersunterschied zwischen Gesunden und Kranken, sowie den Gesunden und den Subdiagnosen.

Tabelle 15 Altersverteilung der BMP6 Untersuchten in Jahren

Alter BMP6	Gesunde	Kranke	CPPS3a	CPPS3b	CP	CPPS
N	39	50	3	41	5	1
Mittelwert	25,3	41,1	32,7	41,6	41,4	—
Median	25	42,5	26	42	50	—
Std.- abweichung	3,3	11,4	12,4	11,1	14,8	—
Min	19	22	25	23	22	—
Max	32	65	47	65	54	—

Ergebnisse

Tabelle 16 Nebendiagnosen der BMP6 Untersuchten

BMP6 Nebendiagnosen	LUTS	Erektile Dysfunktion	Ejaculatio Präcox	Testosterondefizit
Anzahl	3	2	2	1
Nebendiagnosen	Nierenbeckenektasie	Hypogonadismus	Hydrozele	PSA-Erhöhung
Anzahl	0	1	0	1

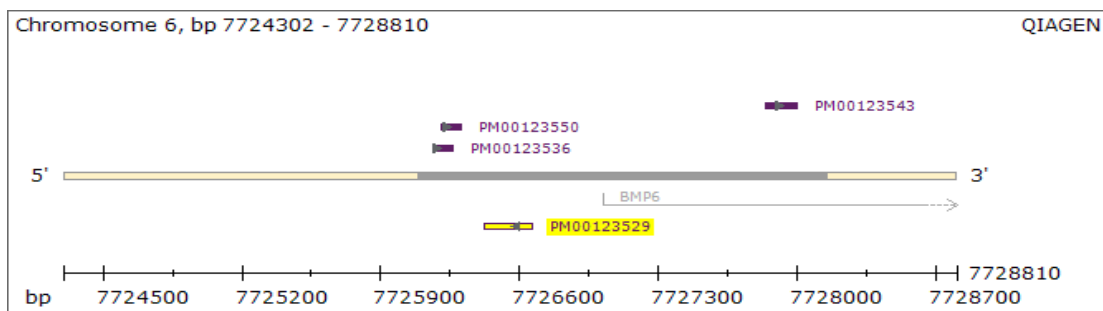


Abbildung 30 zeigt die Promotorregion des Gens und die Lage der untersuchten CpGs: QIAGEN 2013 - PyroMark Cp bmp6 (QIAGEN 2013a).

Tabelle 17 Methylierungsverhältnisse von BMP6 in %

Methylierung BMP6	Gesunde	Kranke	CPPS3a	CPPS3b	CP	CPPS
n	50	39	3	41	5	1
Mittelwert	1,9	2,2	1,9	2,2	2,6	—
Median	1,9	1,5	1,6	1,6	1,4	—
Std.-abweichung	0,2	1,3	0,6	1,3	2,2	—
min	1,6	1	1,6	1	1,1	—
max	2,4	6,6	2,6	6,6	6,4	—

Ergebnisse

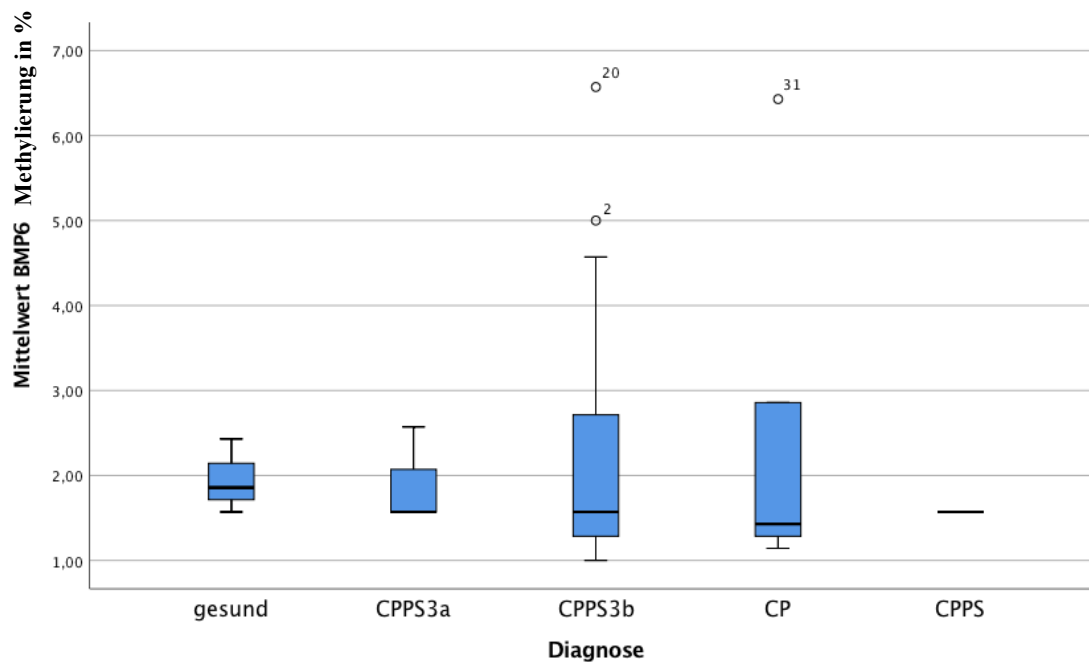


Abbildung 31 zeigt die Methylierungsverhältnisse von BMP6 in %. Auffallend ist die höhere Streuung der Werte der Patienten mit CPPS3b.

Vergleich der einzelnen CpGs von BMP6 von Gesund zu Patienten mit CPPS

Da die Methylierung der CpGs der Promotorregionen eines Genes nicht zwangsläufig an allen Stellen erfolgen muss, wurden im Folgenden die einzelnen CpGs miteinander, in Bezug auf ihre Methylierungen verglichen. Hierfür wurden die Gruppen der Gesunden (n=39) gegen die Gruppe mit chronischen Beckenschmerzsyndrom (CPPS), also CPPS3a und CPPS3b (n=44), miteinander verglichen. Es zeigte sich zudem ein signifikanter Unterschied der Stelle 5 der Promotorregion des Genes BMP6 (Man-Whitney-U-Test, 2-seitig, $p=0,048$) (Abbildung 32) (Tabelle 18). Diese ist in Gesunden im Mittelwert zu 1,2% methyliert, Median 1%, in der CPPS-Gruppe im Mittelwert zu 2%, Median 1%. Es ergibt sich eine mittlere Effektstärke (Effektstärke $r = |Z|/(n^{0,5}) = 0,24$ (mittlere Effektstärke)).

Tabelle 18 Methylierungsverhältnisse der Stelle 5 von BMP6 in %

Stelle 5 BMP6	Gesunde	CPPS3a/b
n	39	45
Mittelwert	1,2	2
Median	1	1
Std.-abweichung	0,5	2,3

Ergebnisse

min	0	0
max	2	14

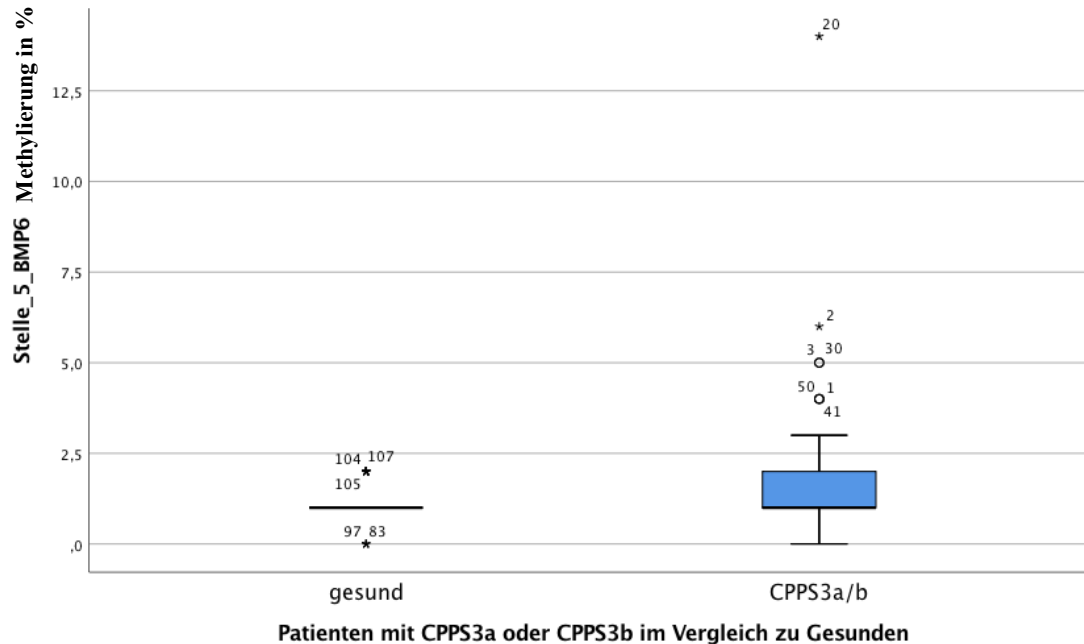


Abbildung 32 zeigt die Methylierungsverhältnisse von Patienten mit CPPS und Gesunden der 5. Stelle des BMP6 Promotors in %.

Methylierung des *BMP7* Promotors

Das Gen Bone Morphogenetic Proteine 7 (Abbildung 33) codiert für ein ebenso genanntes Protein aus der TGF β -Superfamilie. Auch dieses ist an der Gewebedifferenzierung beteiligt (GeneCards Human Gene Database 1998c-2018).

Für die Analysierung der Methylierungsverhältnisse von BMP7 in Bezug auf den Vergleich Gesunde und Patienten mit CP/CPPS wurden Proben von 39 Gesunden und 50 Erkrankten untersucht und ausgewertet. Das CP/CPPS Kollektiv bildeten hier 3 Patienten mit CPPS3a, 41 Patienten mit CPPS3b und 5 Patienten mit Chronischer bakterieller Prostatitis und ein Patient mit nicht näher klassifiziertem CPPS. Als Nebendiagnosen haben 4 Patienten Lower Urinary Tract Symptoms (LUTS), 2 eine Erektile Dysfunktion (ED), 2 eine Ejaculatio Praecox, einer ein Testosterondefizit, 1 einen Hypogonadismus und 1 weist eine PSA-Erhöhung auf (Tabelle 20).

Die angegebenen Zahlen der Methylierung sind in Prozent auf die maximal mögliche Methylierung zu verstehen. Über den prozentualen Grad der Methylierung der jeweiligen

Ergebnisse

zur Methylierung prädisponierten Stellen des Genes wurde der Mittelwert gebildet und anschließend explorativ und konfirmatorisch untersucht (Abbildung 34) (Tabelle 21). Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen der Gesunden und Kranken (Man-Whitney-U-Test, 2-seitig, $p=0,21$) sowie zwischen den Gruppen der Gesunden und Patienten mit CPPS3a/b (Man-Whitney-U-Test, 2-seitig, $p=0,22$) gefunden. Auffallend ist hingegen erneut die erhöhte Streuung der Werte der Patienten mit CPPS3b.

Die Altersverteilung der Gruppen wird in nachfolgender Tabelle und den zugehörigen beiden Diagrammen beschrieben. Es zeigt sich ein auffälliger Altersunterschied zwischen Gesunden und Kranken, sowie den Gesunden und den Subdiagnosen (Tabelle 19).

Tabelle 19 Altersverteilung der BMP7 Untersuchten

Alter BMP7	Gesunde	Kranke	CPPS3a	CPPS3b	CP	CPPS
n	39	50	3	41	5	1
Mittelwert	25,3	41,1	32,7	41,6	41,4	—
Median	25	42,5	26	42	50	—
Std.- abweichung	3,3	11,4	12,4	11,2	14,8	—
min	19	22	25	23	22	—
max	32	65	47	65	54	—

Tabelle 20 Nebendiagnosen der BMP7 Untersuchten

BMP7 Nebendiagnosen	LUTS	Erektile Dysfunktion	Ejaculatio Präcox	Testosterondefizit
Anzahl	4	3	2	1
Nebendiagnosen	Nierenbeckenektasie	Hypogonadismus	Hydrozele	PSA-Erhöhung
Anzahl	0	1	0	1

Ergebnisse

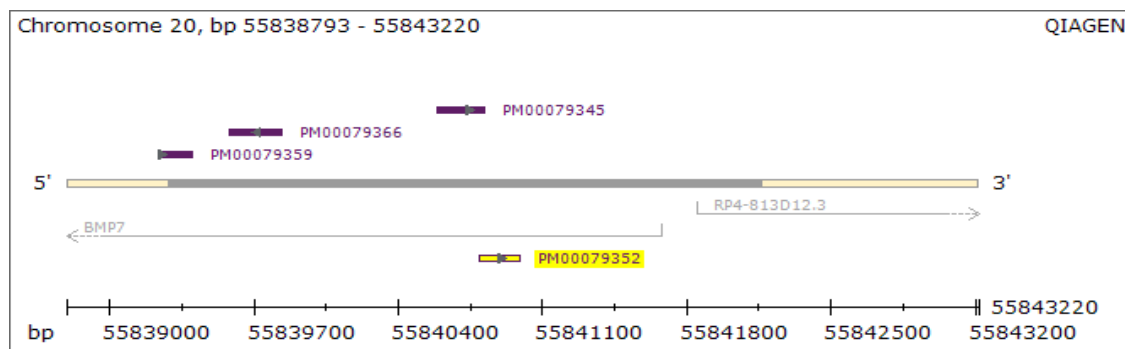


Abbildung 33 zeigt die Promotorregion des Genes und die Lage der untersuchten CpGs: QIAGEN 2013 - PyroMark CpI BMP7 (QIAGEN 2013b)

Tabelle 21 Explorative Methylierungsverhältnisse BMP7 in %

Methylierung BMP7	Gesunde	Kranke	CPPS3a	CPPS3b	CP	CPPS
n	39	50	3	41	5	1
Mittelwert	6,8	6,8	7,7	6,6	7,8	—
Median	6,8	7,2	8,4	7	8	—
Std.-abweichung	0,8	2,3	2,5	2,5	0,8	—
min	5,4	2	5	2	6,6	—
max	8,6	13,2	9,8	13,2	8,8	—

Ergebnisse

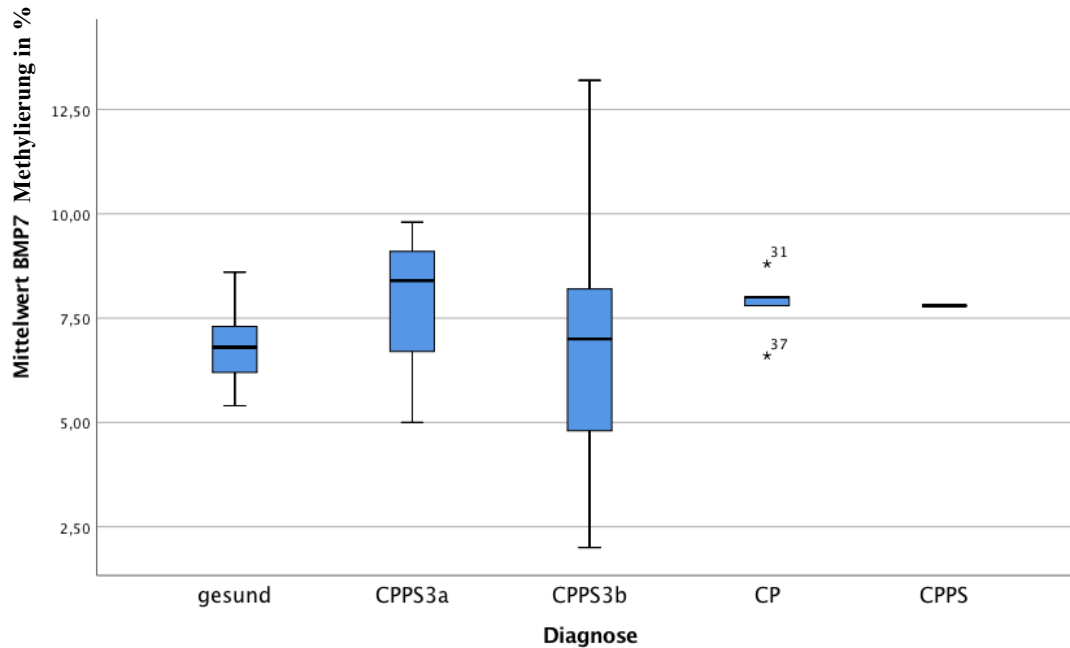


Abbildung 34 zeigt die Methylierungsverhältnisse von BMP7. Erkennbar ist die höhere Streuung der Werte der Patienten mit CPPS3b.

Messung der einzelnen CPGs in BMP7

Da die Methylierung der CpGs der Promotorregionen eines Gens nicht zwangsläufig an allen Stellen erfolgen muss, wurden im Folgenden die einzelnen CpGs miteinander, in Bezug auf ihre Methylierungen, verglichen. Hierfür wurden die Gruppen der Gesunden (n=39) gegen die Gruppe mit chronischen Beckenschmerzsyndrom (CPPS), also CPPS3a und CPPS3b (n=44), miteinander verglichen. Erneut fällt die höhere Streuung der Werte der Patienten mit CPPS3b auf. Es zeigte sich zudem ein signifikanter Unterschied der Stelle 1 der Promotorregion des Gens BMP7 (Man-Whitney-U-Test, 2-seitig, $p=0,003$). Diese ist in Gesunden im Mittelwert zu 5,1% methyliert, Median 5%, in der CPPS-Gruppe im Mittelwert zu 5,76%, Median 6%. Es ergibt sich eine mittlere Effektstärke (Effektstärke $r = |Z|/(n^{0,5}) = 0,24$ (mittlere Effektstärke)) (Abbildung 35) (Tabelle 22).

Die mit Östrogen behandelten Mastzellen von (Nesheim et al. 2018) zeigten eine starke Down-Regulation der Expression von BMP7 im RT² Profiler. In Anbetracht des in vorangegangenen Untersuchungen erhöhten Östrogenspiegels in Patienten mit CP/CPPS (Nesheim et al. 2018) fügt sich dieses Ergebnis gut in das Gesamtbild. Im Vergleich hierzu zeigen die Mastzelllinien die nur kurz mit Östrogen stimulierten Mastzellreihen keine nachvollziehbare Methylierungsänderung, auch nicht isoliert an der 5. Stelle.

Ergebnisse

Tabelle 22 Methylierungsverhältnisse Stelle 1 BMP7 in %

Stelle 1 BMP7	Gesunde	CPPS3a/b
n	39	45
Mittelwert	5,1	5,76
Median	5	6
Std.-abweichung	1,2	1,4
min	4	2
max	9	9

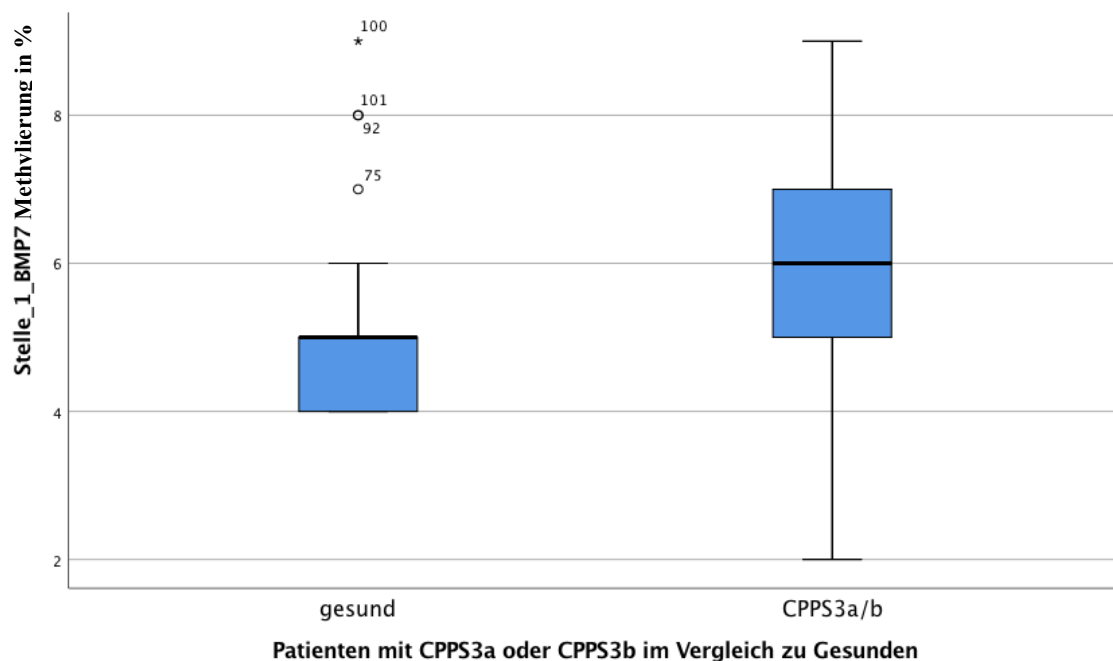


Abbildung 35 zeigt die Methylierungsverhältnisse von BMP7 an Stelle 1 von Patienten mit CPPS und Gesunden.

Methylierung des *TGFB2* Promotors

TGFB2 ist ein ubiquitär vorkommendes Protein (Abbildung 36), das eine Vielzahl an Funktionen ausübt. Es hat das Potential an Entzündungsprozessen maßgeblich beteiligt zu sein.

Für die Analysierung der Methylierungsverhältnisse von TGFB2 in Bezug auf den Vergleich Gesunde und Patienten mit CP/CPPS wurden Proben von 39 Gesunden und 42 Erkrankten untersucht und ausgewertet. Das CP/CPPS Kollektiv bildeten hier 3 Patienten

Ergebnisse

mit CPPS3a, 34 Patienten mit CPPS3b und 4 Patienten mit Chronischer bakterieller Prostatitis und ein Patient mit nicht näher klassifiziertem CPPS. Als Nebendiagnosen haben 4 Patienten Lower Urinary Tract Symptoms (LUTS), 2 eine Erektile Dysfunktion (ED), 2 eine Ejaculatio Praecox, einer ein Testosterondefizit, 1 einen Hypogonadismus und 1 weist eine PSA-Erhöhung auf (Tabelle 24).

Die angegebenen Zahlen der Methylierung sind in Prozent auf die maximal mögliche Methylierung zu verstehen. Über den prozentualen Grad der Methylierung der untersuchten CPG wurde der Mittelwert gebildet und anschließend explorativ und konfirmatorisch untersucht (Abbildung 37) (Tabelle 25). Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen der Gesunden und Kranken (Man-Whitney-U-Test, 2-seitig, $p=0,59$) sowie zwischen den Gruppen der Gesunden und Patienten mit CPPS3a/b (Man-Whitney-U-Test, 2-seitig, $p=0,56$) gefunden.

Die Altersverteilung der Gruppen wird in nachfolgender Tabelle und den zugehörigen beiden Diagrammen beschrieben. Es zeigt sich ein auffälliger Altersunterschied zwischen Gesunden und Kranken, sowie den Gesunden und den Subdiagnosen (Tabelle 23).

Tabelle 23 Altersverteilung der TGFB2 Untersuchten in Jahren

Alter TGFB2	Gesunde	Kranke	CPPS3a	CPPS3b	CP	CPPS
n	39	42	3	34	4	1
Mittelwert	25,3	41,7	32,7	42,1	44,5	—
Median	25	43	26	42,5	51	—
Std.- abweichung	3,3	11,9	12,4	11,8	15,1	—
min	19	22	25	23	22	—
max	32	65	47	65	54	—

Tabelle 24 Nebendiagnosen der TGFB2 Untersuchten

TGFB2 Nebendiagnosen	LUTS	Erektile Dysfunktion	Ejaculatio Präcox	Testosterondefizit
Anzahl	4	2	1	1
Nebendiagnosen	Nierenbeckenektasie	Hypogonadismus	Hydrozele	PSA-Erhöhung
Anzahl	0	1	0	1

Ergebnisse

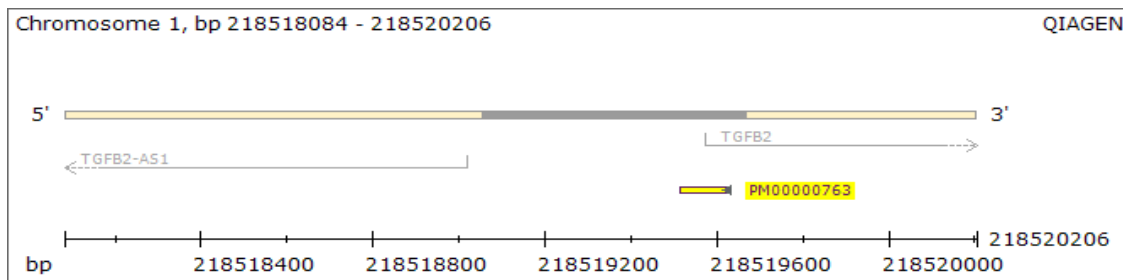


Abbildung 36 zeigt die Promotorregion des Genes und die Lage der untersuchten CpGs: QIAGEN 2013 - PyroMark Cp tgfβ2 CPG Inseln (QIAGEN 2013c)

Tabelle 25 Methylierungsverhältnisse TGFβ2 in %

Methylierung TGFβ2	Gesunde	Kranke	CPPS3a	CPPS3b	CP	CPPS
n	39	42	3	34	4	1
Mittelwert	1,5	1,4	1,3	1,4	1,7	—
Median	1,5	1,3	1,3	1,3	1,7	—
Std.-abweichung	0,4	0,6	0,9	0,6	0,2	—
min	0,5	0,3	0,3	0,7	1,3	—
max	2,5	3,17	2,2	3,2	2,2	—

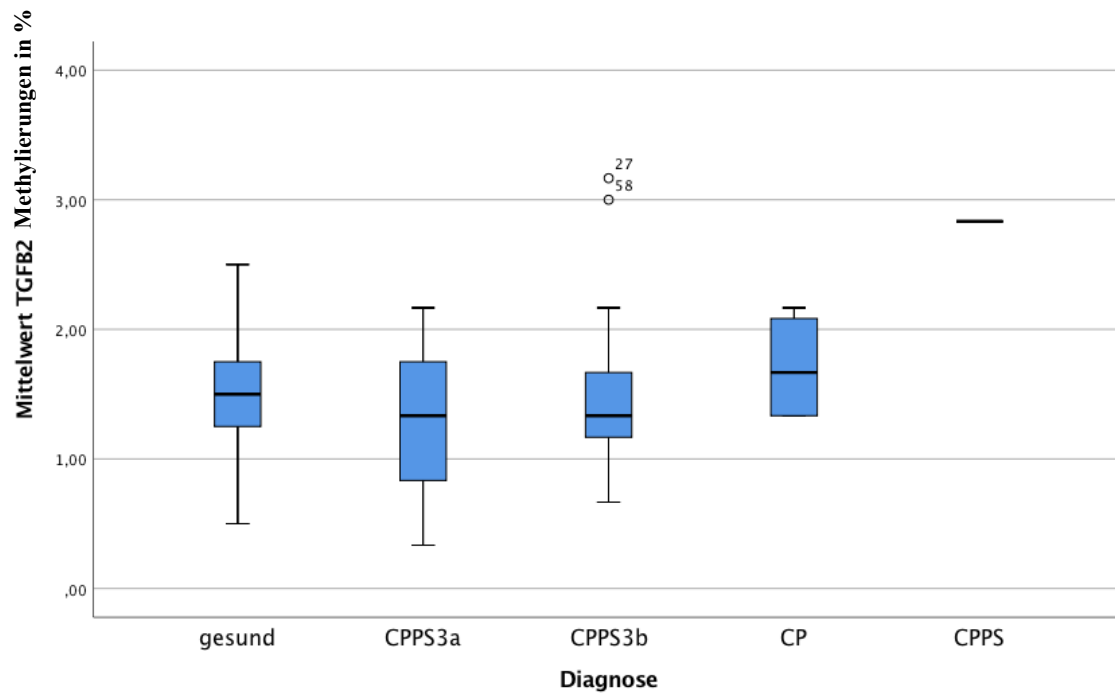


Abbildung 37 zeigt die Methylierungsverhältnisse von TGFβ2

Messung der einzelnen Methylierungenstellen in TGFB2

Auch für TGFB2 wurden die einzelnen Methylierungen der CpGs der Promotorregionen des Genes von Krank zu Gesund verglichen (Abbildung 38) (Tabelle 26). Hierfür wurden die Gruppen der Gesunden (n=39) gegen die Gruppe mit chronischen Beckenschmerzsyndrom (CPPS), also CPPS3a und CPPS3b (n=37), miteinander verglichen. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Stelle 1, 5 und 6 der Promotorregion des Genes TGFB2 (Man-Whitney-U-Test, 2-seitig, 1. Stelle $p=0,006$, 5. Stelle $p=0,001$, 6. Stelle $p=0,001$). Die erste Stelle ist in Gesunden im Mittelwert zu 1,9%, Median 2%, in Patienten mit CPPS zu im Mittelwert 2,4%, im Median zu 2% methyliert. Die 5.Stelle ist in Gesunden im Mittelwert zu 1,3% methyliert, Median 1%, in der CPPS-Gruppe im Mittelwert zu 0,8 %, Median 1%. Auch die 6. Stelle zeigt in Patienten eine leichte Mindermethylierung im Vergleich zu Gesunden. So ist diese Stelle in Gesunden zu im Mittelwert zu 1,8%, Median 2% und in Patienten mit CPPS im Mittelwert zu 1%, Median 1% methyliert. Alle drei beschriebenen Unterschiede zeigen hierbei große Effektstärken: Stelle 1: Effektstärke $r = |Z|/(n^{0,5}) = 0,31$ (große Effektstärke), Stelle 5: Effektstärke $r = |Z|/(n^{0,5}) = 0,36$ (große Effektstärke), Stelle 6: Effektstärke $r = |Z|/(n^{0,5}) = 0,44$ (große Effektstärke). Die Methylierungsgrade weiterer Stellen von TGFB2 zeigen allerdings ebenfalls Korrelationen mit dem Alter: Für Stelle 1 war eine Tendenz festzustellen; (Spearman Rho, 2-seitig, $p=0,053$, $r=0,22$). Auch für die Stelle 2 war eine Tendenz erkennbar; (Spearman Rho, 2-seitig, $p=0,061$, $r=-0,21$). Stelle 3 korreliert signifikant; (Spearman Rho, 2-seitig, $p=0,004$, $r=-0,31$). Da sich die beiden Kohorten, gesund und krank, signifikant im Alter unterscheiden, mögen die Auswirkungen des Alters auch eine mögliche Erklärung für den gemessenen Unterschied sein.

Tabelle 26 beschreibt die Methylierungsverhältnisse von TGF β 2 an den CPI-Stellen 1, 5 und 6 in %

Stelle 1 TGFβ2	Gesunde	CPPS3a/b	Stelle 5 TGFβ2	Gesunde	CPPS3a/b	Stelle 6 TGFβ2	Gesunde	CPPS3a/b
n	39	38	n	39	38	n	39	38
Mittelwert	1,9	2,4	Mittelwert	1,3	0,8	Mittelwert	1,8	1
Median	2	2	Median	1	1	Median	2	1
Std.-abweichung	0,6	1,1	Std.-abweichung	0,7	0,6	Std.-abweichung	1	1
min	1	0	min	0	0	min	0	0
max	3	6	max	3	2	max	4	6

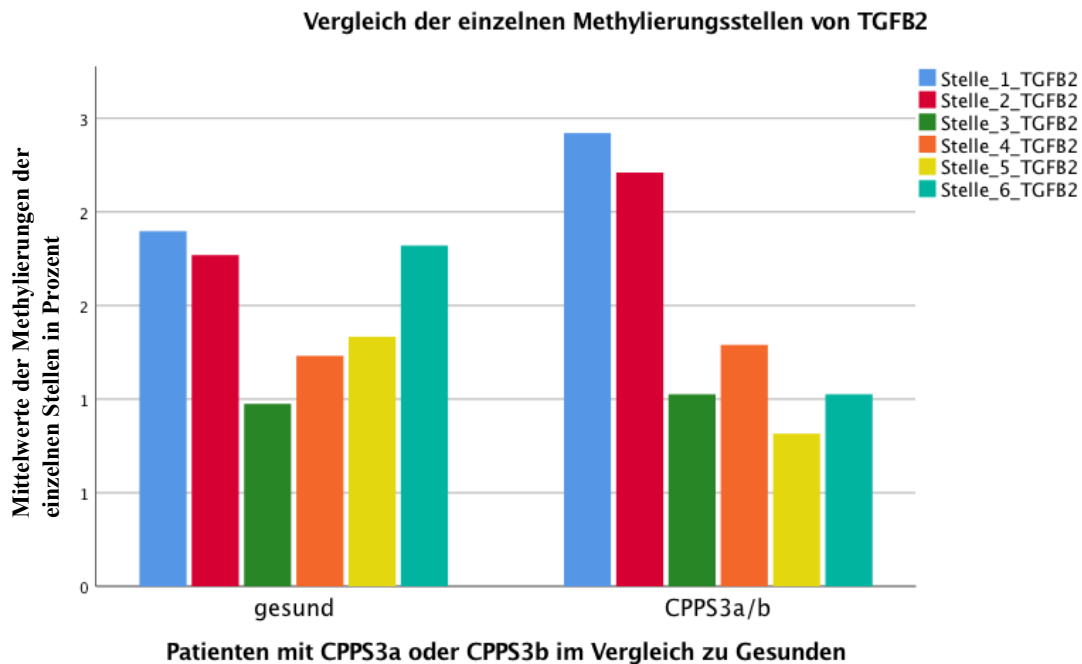


Abbildung 38 zeigt, aufgrund mehrfacher auffälliger Stellen nochmals explizit die Methylierungsverhältnisse von TGFB2 in Patienten mit CPPS und Gesunden an den Einzelstellen der untersuchten CPI.

Auswertung der Median-Werte anstelle der Mittelwerte

Betrachtet und vergleicht man anstelle der errechneten Mittelwerte der Methylierungen der CpGs ihre Mediane ergibt sich ein anderes Bild. Dies ist in Arbeiten um größeren Streuungen zu begegnen bereits praktiziert worden. Hier wird der Unterschied der Gruppe der Gesunden (n=39) im Methylierungsgrad von TGFB2 im Vergleich zu den Patienten mit CPPS (n=38) signifikant (Man-Whitney-U-Test, 2-seitig, $p=0,021$) (Abbildung 38) (Tabelle 27). Dieser Unterschied zeigt eine mittlere Effektstärke. (Effektstärke $r = |Z|/(n^{0,5}) = 0,26$ (mittlere Effektstärke)).

Tabelle 27 Methylierungsverhältnisse von TGFB2 anhand der Mediane.

Mediane TGFB2	Gesunde	CPPS3a/b
n	39	45
Mittelwert	1,5	1,2
Median	1,5	1
Std.-abweichung	0,5	0,5
min	0	0
max	2,5	3

Ergebnisse

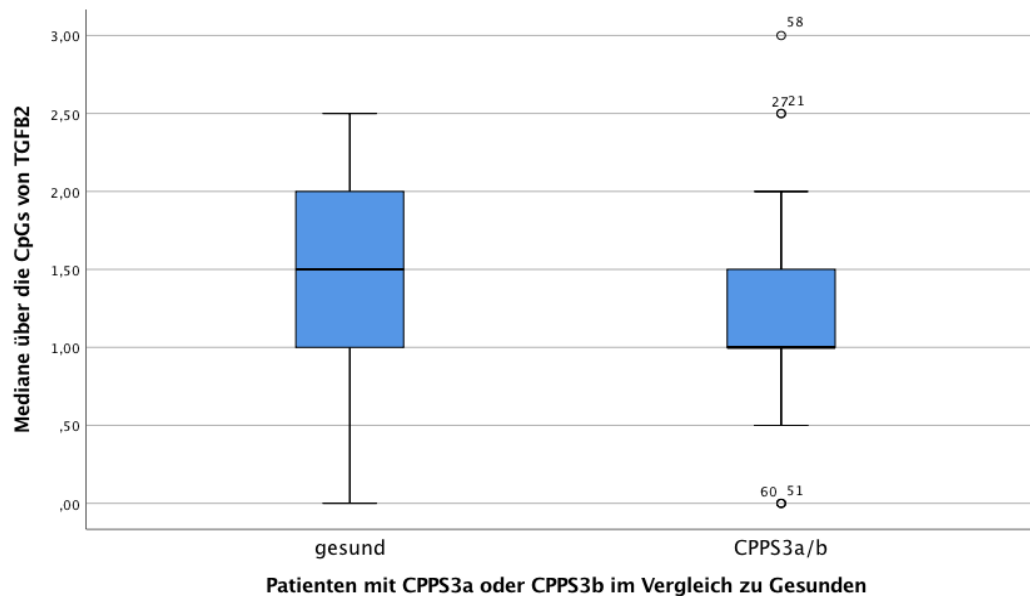


Abbildung 38 beschreibt die Methylierungsverhältnisse von TGFB2 anhand der Mediane.

Vergleich der Mediane von BMP7

Auch die Mediane der Methylierungsgrade von BMP7 zeigten einen Unterschied zwischen den Gruppen Gesund (n=39) und Patienten mit CPPS (n=38) (

Tabelle 28). Dieser ist nicht signifikant (Man-Whitney-U-Test, 2-seitig, $p=0,89$) aber die Tendenz geht in die Richtung einer höheren Methylierung der Erkrankten (Abbildung 39). Dies fügt sich gut in das Bild der signifikant höher methylierten ersten Stelle von BMP7 in Erkrankten, die nachweislich erhöhte Östrogenwerte zeigen (Nesheim et al. 2018), sowie in die Reaktion der Expression von BMP7 der Mastzellreihe HMC-1 auf die Östrogenbehandlung (Nesheim et al. 2018). Allerdings konnte in dieser Arbeit in den Mastzellreihen unter Östrogenbehandlung keine eindeutige Methylierungsänderung gezeigt werden.

Tabelle 28 Methylierungsverhältnisse von BMP7 anhand der Mediane.

Mediane BMP7	Gesunde	CPPS3a/b
n	39	38
Mittelwert	6,2	6,4
Median	6	7
Std.-abweichung	1,2	2,9
min	3	1
max	9	15

Ergebnisse

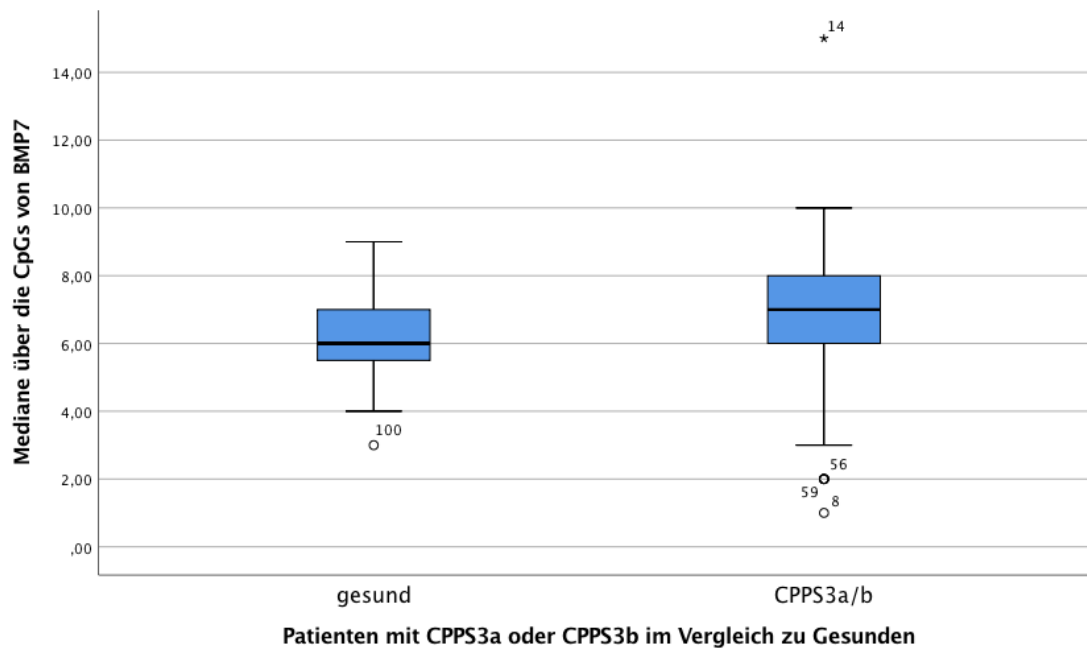


Abbildung 39 beschreibt die Methylierungsverhältnisse von BMP7 anhand der Mediane.

Korrelationen und Assoziationen der Methylierungen

Die Methylierung der Gene der Proteinsuperfamilie TGFB2, BMP6, BMP2, BMP7 zeigen größtenteils positive Korrelationen. So korreliert BMP2 mit BMP6 (Spearman Rho, sign. 2-seitig, $p=0,039$, $r=0,2$). BMP2 mit BMP7 (Spearman Rho sign. 2-seitig $p=0,001$, $r=0,35$) und BMP2 mit TGFB2 (Spearman Rho, sign. 2-seitig, $p=0,001$, $r=0,6$). Des Weiteren korreliert BMP7 mit BMP6 (Spearman Rho sign. 2-seitig $p=0,001$, $r=0,34$) sowie mit TGFB2 (Spearman Rho, sign. 2-seitig, $p=0,001$, $r=0,33$). Auffällig ist, dass BMP6 Korrelation mit dem Alter der Patienten aufzeigt (Spearman Rho, sign. 2-seitig, $p=0,001$, $r=-0,4$), im Gegensatz zu allen anderen Methylierungen der Gene.

Auch das PSA der Patienten zeigt einen möglichen Zusammenhang mit der Methylierung der Proteinsuperfamilie. So zeigen BMP2 (Spearman Rho, sign. 2-seitig, $p=0,003$, $r=-0,43$), BMP6 (Spearman Rho, sign. 2-seitig, $p=0,003$, $r=-0,36$) eine signifikante und TGFB2 (Spearman Rho, sign. 2-seitig, $p=0,063$, $r=-0,3$) eine Tendenz zur Korrelation.

Eine mögliche Erklärung bietet eine im Alter zunehmende Prostatahyperplasie oder sogar ein Prostatakarzinom mit möglicher konsekutiver Zunahme des PSA-Wertes.

Ergebnisse

Sehr plastisch und einleuchtend scheinen hingegen einige subjektive Werte der Patienten, die mittels der Fragebögen erhoben wurden. So korreliert das Alter der untersuchten Patienten stark mit dem im HADS erhobenen Depressionswert (Spearman Rho, sign. 2-seitig, $p=0,001$, $r=0,4$) und mit den im NIH-CPSI angegebenen Schmerzwert (Spearman Rho, sign. 2-seitig, $p=0,001$, $r=0,56$).

Für die explorative Auswertung ist interessant, dass das Alter knapp nicht signifikant aber negativ mit dem Testosteronwert korreliert (Spearman Rho, sign. 2-seitig, $p=0,085$, $r=-0,21$).

Korrelationen mit dem Alter

Die Mediane und die Mittelwerte von BMP6 korrelieren in allen Untersuchten signifikant negativ mit dem Alter der Untersuchten (Pearson, $p=0,034$, $r=-0,23$), (Pearson, 2-seitig, $p=0,024$, $r=-0,24$), (Spearman Rho, 2-seitig, $p=0,034$, $r=-0,23$) (Spearman Rho, 2-seitig, $p=0,021$, $r=-0,24$). Dies heißt, je älter die gemessene Person, desto niedriger der gemessene Methylierungsgrad. Da die Gruppe der Erkrankten ein wesentlich höheres Durchschnittsalter als die Kohorte der Gesunden aufweist, könnte eine potentielle Altersabhängigkeit der Methylierung von BMP6 potentielle Unterschiede der Methylierung in der Krankheit CPPS verschleiern.

Ähnliches zeigt sich für BMP7: Die Mediane von BMP7 korrelieren ebenfalls mit dem Alter (Spearman Rho, 2-seitig, $p=0,041$, $r=-0,22$).

Die Methylierungen der Stellen eins, fünf und sechs von TGFB2 zeigen ebenfalls Korrelationen mit dem Alter: Stelle 1 knapp nicht signifikant; (Spearman Rho, 2-seitig, $p=0,053$, $r=0,22$). Stelle 2 knapp nicht signifikant; (Spearman Rho, 2-seitig, $p=0,061$, $r=-0,21$). Stelle 3 signifikant; (Spearman Rho, 2-seitig, $p=0,004$, $r=-0,31$).

Methylierungsanalysen in den Zelllinien

Methylierungen der Prostata-Krebszelllinien

Die Methylierungen der Gene BMP2, BMP6, BMP7 und TGFB2 in den Zellreihen LnCaP, PC3 und DU145 zeigt nachfolgende (Tabelle 29).

Ergebnisse

Tabelle 29 Methylierungslevel der PCa- Zellreihen in %.

	BMP2	BMP6	BMP7	TGFB2
LnCaP	4,2	3,4	24,4	62
PC3	17,7	20,7	19,6	3,7
Dn145	21,7	6,7	14,2	1,7

Die Darstellung der Methylierungen soll einen Anhaltspunkt oder eine Referenz zeigen. Kausale Schlussfolgerungen sind hieraus nicht möglich.

Die Werte sind im Kontext weiterer Untersuchungen interessant, da manche Autoren über eine mögliche Verbindung der Krankheiten chronische Prostatitis, BPH und PCa spekulieren, aber auch da zumindest BMP2 und BMP6 im Verdacht stehen gewissen Einfluss bei der Entwicklung von Prostatakrebszellen zu haben (Tian et al. 2017; GeneCards Human Gene Database 1998b-2018).

Methylierungen der Mastzelllinien

Auch die mit unterschiedlichen Konzentrationen von Östrogen oder Ethanol behandelten Mastzelllinien HMC-1 und LAD2 wurden hinsichtlich der Methylierung der Gene BMP2, BMP6, BMP7 und TGFB2 untersucht. Ergebnisse zeigt die folgende Chloropethentabelle (Tabelle 30).

Tabelle 30 Methylierungsänderung der Mastzelllinien unter verschiedenen Estrogenkonzentrationen

HMC1	non-treated	0,1 Estrogen	1 Estrogen	10 Estrogen	100 Estrogen	0,1 Ethanol	1 Ethanol	10 Ethanol	100 Ethanol
BMP2 Mittelwert	89	88,8	87,1	88,5	84,3	90,3	84,6	87,3	89,3
BMP6 Mittelwert	3,2	1,7	1,9	1,7	1,9	1,4	1,6	1,3	1,3
BMP7 Mittelwert	29	30,2	28,8	30	28,6	29,9	27,6	30,8	28,4
TGFβ2 Mittelwert	90,8	87,8	91,8	87,5	92,5	89,5	91,1	91,8	91,6
LAD2	non-treated	0,1 Estrogen	1 Estrogen	10 Estrogen	100 Estrogen	0,1 Ethanol	1 Ethanol	10 Ethanol	100 Ethanol
BMP2 Mittelwert	87,5	87,3	87,2	83,7	86,3	87,3	81,5	85,8	84,8
BMP6 Mittelwert	1,9	2,3	1,9	2,1	1,9	1,7	2	1,7	1,7
BMP7 Mittelwert	3,4	5	3,8	4	6,2	4	8,6	3,4	4,4
TGFβ2 Mittelwert	4,3	3,8	4,3	12,5	4	5,3	5,5	4	4,5

Chlorophetentabelle: Die Farbänderung dient der Visualisierung und bezieht sich jeweils auf den ersten Wert der Reihe: den Methylierungswert in Prozent der unbehandelten Zelle. Je höher die Methylierung desto intensiver die Färbung. Siehe auch die nachfolgende Legende:

In Relation hohe Methylierung	in Relation niedrige Methylierung

Die Änderung der Methylierungsverhältnisse den Änderungen der Konzentrationsverhältnisse gegenübergestellt, fallen allenfalls sehr gering aus. Eine

Ergebnisse

lineare Abhängigkeit von Östrogen lässt sich mutmaßlich bei HMC-1 in BMP2 und bei LAD2 in BMP7 vermuten. Ein gewisser Einfluss der Östrogenkonzentration auf die Methylierung lässt sich in der HMC-1 Zellreihe in BMP6 und in der LAD2 Zellreihe in TGF β 2 vermuten. Die Ethanolwerte dienen der Kontrolle. Nachfolgend wurden die Methylierungswerte mit den Konzentrationen korreliert. Hieraus ergibt sich für HMC-1 eine negative Korrelation von Ethanol und dem Methylierungsgrad von BMP6 (Spearman Rho, 2-seitig, $p=0,054$, $r=-0,87$) aber keine Abhängigkeit für Östrogen. Dies bedeutet eine sehr fragwürdige Abhängigkeit von der Trägersubstanz Ethanol, die schließlich auch in den Östrogenbehandelten Mastzellen vorhanden ist, hier aber keinen Effekt zeigt. Der Methylierungsgrad von BMP2 der HMC-1-Zellen und der Konzentration von Östrogen zeigt eine signifikante Korrelation (Spearman Rho, 2-seitig, $p=0,014$, $r=-0,9$). Dies ist nicht signifikant und mit weitaus geringerem Korrelationskoeffizienten, auch in der Kontrolle mit Ethanol zu sehen. (Spearman Rho, 2-seitig, $p=0,87$, $r=-0,1$). Somit ist hier von einem möglichen konzentrationsabhängigen Einfluss von Östrogen auf die Methylierungsgrade von BMP2 der HMC-1-Zellen auszugehen.

Auch für die LAD2-Zellen findet sich eine signifikante Korrelation der Methylierungsgrade von BMP2 und der Östrogenkonzentration (Spearman Rho, 2-seitig, $p=0,037$, $r=-0,9$). In der Kontrolle mit Ethanol ist ein hoher Korrelationsfaktor zu sehen aber nur geringe Signifikanz (Spearman Rho, 2-seitig, $p=0,188$, $r=-0,7$). Dies lässt auf einen möglichen Einfluss der Östrogenkonzentration auf die Methylierungsgrade von BMP2 der LAD2-Zellen schließen.

Korreliert man statt der Mittelwerte der Methylierungsstellen die Mediane ebendieser mit der Konzentration von Östrogen ergibt sich für BMP2 in HMC-1-Zellen eine signifikante Korrelation (Spearman Rho, 2-seitig, $p=0,014$, $r=-0,95$). Diese findet sich gerade eben nicht signifikant auch in LAD2 (Spearman Rho, 2-seitig, $p=0,054$, $r=-0,87$).

Eine höhere Konzentration von Östrogen korreliert vermutlich also mit einer verminderten Methylierung dieses Genes in beiden Mastzelllinien.

Vergleich der einzelnen Stellen der Methylierung in Mastzellen

Die Änderung der Methylierung der Gene BMP2, BMP6, BMP7 und TGF β 2 en Detail an den einzelnen Stellen betrachtet lässt so, im Vergleich zu den Östrogenbehandelten Mastzelllinien, keine Gemeinsamkeiten erkennen. Weder zeigen diese Änderungen der Methylierung wie sie aus den Änderungen des Expressionsverhaltens aus der Arbeit von

Ergebnisse

(Nesheim et al. 2018) zu erwarten wären, noch lassen sich Äquivalenzen zu den Methylierungsänderungen der Patienten im Vergleich zu den Gesunden finden in Anbetracht der Hochmethylierung der Stellen BMP2 Stelle 5, BMP6 Stelle 5, BMP7 Stelle 1 oder TGFB2 Stellen 1, 5 und 6 (Abbildung 40).

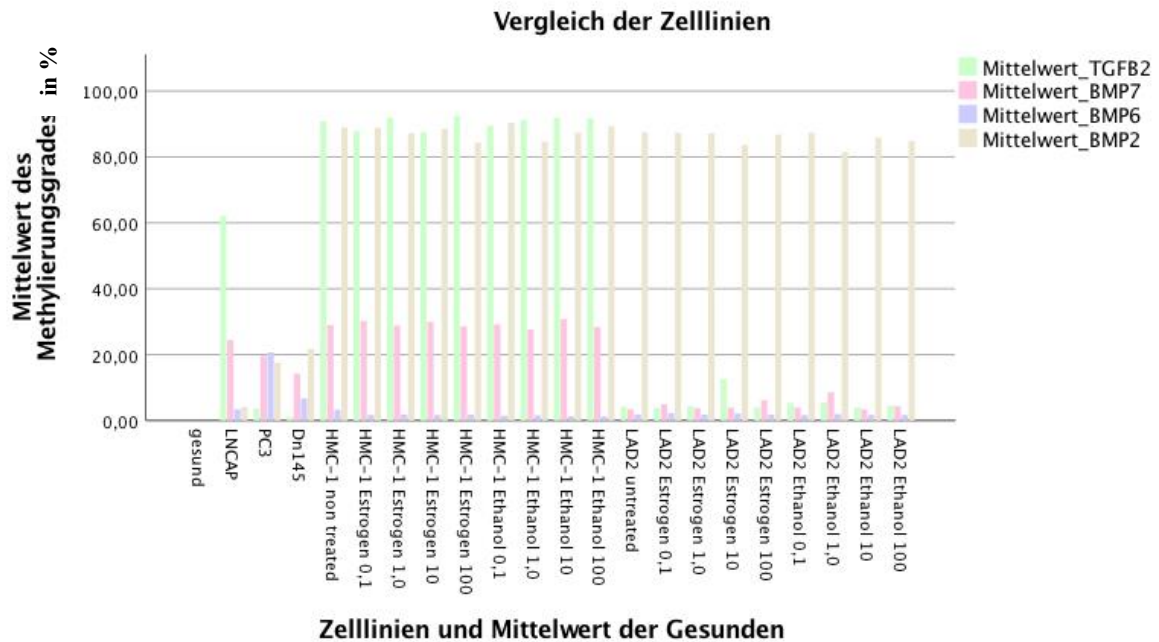


Abbildung 40 zeigt die Methylierungslevel der mit Östrogen behandelten Mastzelllinien LAD2 sowie HMC-1.

Diskussion

Die Mastzelle wird zunehmend als eine Entzündung initiierende und modulierende Zelle beschrieben. So häufen sich die Hinweise, dass sie auch für die Entzündungs- und Schmerzentwicklung der Chronischen Prostatitis und des Chronischen Beckenschmerzsyndromes (CP/CPPS) mit verantwortlich ist. Zudem wurden bei Patienten mit CP/CPPS erhöhte Östrogenspiegel im Seminalplasma festgestellt (Nesheim et al. 2018). Änderungen im Östrogenhaushalt ziehen Änderung der Genexpression und der epigenetischen Regulierung nach sich. Dies zeigte sich unter anderem in Mastzelllinien für BMP2 und BMP7 sowie in Brustkrebszelllinien für TGFB2 (Putnik et al. 2012). Epigenetische Inaktivierung und konsekutive Herunterregulierung bestimmter Gene wie ER1, ER2 und CXCR4 wurden auch bereits bei Patienten mit CP/CPPS nachgewiesen (Schagdarsurengin et al. 2017).

In dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob sich bei Patienten mit CP/CPPS systemisch veränderte Tryptasewerte als Mastzellmarker nachweisen lassen, und inwieweit diese einen möglichen Zusammenhang mit klinischen Entzündungsparametern, dem PSA und den Hormonen Testosteron und Östradiol zeigen. Auf der epigenetischen Ebene wurde untersucht, inwieweit CP/CPPS-assoziierte Veränderungen in den Methylierungen der CGIs in Promotoren der Gene BMP2, BMP6, BMP7 und TGFB2 bewirkt. Auch wurden die mit unterschiedlichen Konzentrationen von Östrogen behandelten Mastzelllinien HMC-1 und LAD2 auf Änderungen der Methylierungen der Promotorregionen dieser Gene hin untersucht.

Untersuchungen zu Tryptasespiegel in CP/CPPS Patienten und Kontrollen

Systemische Messung der Tryptase

Die Tryptasespiegel wurden im Blutplasma gemessen, ohne dass ein Unterschied zwischen Krank und Gesund gefunden wurde. Auch wurden die einzelnen Diagnosen CPPS3a und CPPS3b berücksichtigt und mit den Gesunden bzw. miteinander verglichen. Auch diese Analysen zeigten keinen Unterschied. Mögliche Gründe hierfür sind: Die Tryptasespiegel wurden im Blutplasma der Patienten und der Gesunden gemessen. Möglicherweise ist diese Methode für die potentielle Mastzell-Aktivität bei Patienten mit CP/CPPS nicht geeignet: Die in der Einleitung beschriebenen systemischen Faktoren, oder die tryptaserelevanten Mechanismen dieser eher lokalen Erkrankung finden

Diskussion

möglicherweise in zu geringen Umfang statt, sodass sie in systemischen Messwerten keine ausreichende Ausprägung finden konnten. Die Mastzellaktivität könnte zu gering sein und die Tryptase der Prostata wird im Gesamtblut unmessbar verdünnt. Auch ist denkbar, dass die Tryptase der Prostata aus bestimmten und unbekannten Gründen nicht in den systemischen Blutkreislauf gelangt. Die Messung im Blutplasma wurde durchgeführt, da es eine sehr einfache klinische Erhebungsmöglichkeit geboten hätte. Auch ist die Prostata ein sehr gut durchblutetes Organ, was auch einen lokalen Effekt gut systemisch hätte messbar machen können.

Korrelation der Tryptasespiegel mit Entzündungsparametern und Hormonen

Die Untersuchung der Korrelationen der Tryptasespiegel mit den klinisch erhobenen Parametern Testosteron, Östrogen, CRP, PSA und IL-8 unterliegt natürlich den gleichen Überlegungen. Falls die Theorie der Entzündungsgeschehen-orchestrierenden Mastzelle zutrifft, wäre eine Korrelation der Entzündungsparameter mit den Tryptasespiegeln durchaus denkbar. In dieser Arbeit wurde jedoch kein Hinweis auf einen Zusammenhang gefunden.

Tryptasemessung im Exprimaturin

Ob nun die Messmethode nicht sensitiv genug oder die Tryptasespiegel bei CP/CPPS nicht erhöht ausfallen, gilt auch bei weiteren Untersuchungen im Urin und Exprimat-Urin zu bedenken: Hier wurden versuchsshalber je sechs Patientenproben gemessen, die jedoch alle unter der Nachweisgrenze der gewählten Messmethode, des Phadia 250 ImmunoCAP Tryptase, Thermo Scientific waren.

CP/CPPS und Tryptase in der Literatur und weiterer Ausblick

Insgesamt liegen derzeit viele Hinweise auf ein Entzündungsgeschehen der Prostata mit Mastzellaktivität bei Patienten mit CP/CPPS vor (Done et al. 2012; Bjerklund Johansen und Weidner 2002; Breser et al. 2017)). Dies schließt auch einige Mausmodelle der chronischen Prostatitis mit ein (Breser et al. 2017; Done et al. 2012). Die Ergebnisse dieser Arbeit können das in Bezug auf Involvierung von Mastzellen nicht bestätigen und schließen eine systemische Reaktion der Mastzellen in dieser Erkrankung oder eine Messbarkeit der Tryptaseaktivität im Blut als Marker nahezu aus. Für weitere Untersuchungen sollte deswegen „näher am Organ“ gemessen werden: Seminalplasma oder Exprimaturin bietet sich wegen des Inhalts von Prostatabestandteilen an, jedoch sollte mit einem anderen Verfahren gemessen werden, da der Phadia 250 hierfür

Diskussion

anscheinend nicht sensitiv genug ist. Von erfolgreiche Messungen der Tryptase im Seminalplasma mit dem *mast cell degranulation kit*, Millipore berichten u.a. (Done et al. 2012). Arbeitsspezifische Aspekte und Einschränkungen werden im Folgenden erläutert.

Systemische Tryptasewerte weisen ein breites Referenzspektrum auf

Tryptase wird vorwiegend als Marker für Neigung zu anaphylaktischen und allergischen Reaktionen gemessen (Thermo Scientific 2014). Da ein erhöhter Tryptasewert alleine zunächst einmal keinen Krankheitswert im klassischen Sinn besitzt, erscheinen möglicherweise Betroffene in beiden Kollektiven „unbemerkt“ und verzerren möglicherweise das Ergebnis. Dagegen spricht, dass die Ausreißer verhältnismäßig hoher Tryptasewerte in beiden Gruppen nahezu gleich verteilt sind und zudem nicht parametrisch getestet wurde. Außerdem befinden sich nur zwei Ausreißer über der Marke von 20 Mikrogramm pro Milliliter, einem Wert der durchaus auch in einem vollkommen gesunden Menschen gemessen werden kann (siehe Abschnitt potentielle Mastzellmarker). Auch diese beiden Ausreißer sind gleich verteilt. Hinzukommend unterliegt die Tryptase von Gesunden zu Gesunden größeren Schwankungen. Dies ist am vom Hersteller des Messgerätes angegebenen Referenzwerten ersichtlich: 2 bis 12 Mikrogramm/Milliliter. Werte von bis zu 20 Mikrogramm/Milliliter deuten auf eine Mastzellanhäufung hin, sind aber auch im Gesunden möglich (Thermo Scientific 2014). Dies verursacht natürlich auch in den Messergebnissen eine breite Streuung, aus der theoretisch durch die große Varianz nur erschwert eine Tendenz herausgelesen werden kann.

Tryptasewerte und die Altersverteilung der Kohorten

Um den Einfluss der deutlichen Altersdifferenz zwischen den Gruppen Gesund und Krank genauer beurteilen zu können erfolgte eine Korrelationsanalyse des Alters gegen die Tryptasewerte in Gesunden, in Kranken und beiden Gruppen zusammen. Es wurde in keiner Gruppierung eine Korrelation gefunden (siehe Auswertung). Somit ist eine Verzerrung der Messwerte eher ausgeschlossen. Auch gibt es vom Hersteller des Messgerätes eine Untersuchung über die Konsistenz der Tryptasewerte in Individuen über vier Jahre, die stabile Ergebnisse zeigen (Thermo Scientific 2014).

DNA-Methylierungsanalysen im Vergleich

Systemische Messung der DNA-Methylierung

Die Messungen der Methylierungen von BMP6, BMP7, und TGFB2 erfolgte ebenso systemisch aus EDTA-Blut. Anschließend wurden alle an CP/CPPS Erkrankte mit den Gesunden verglichen. Die gefundenen Differenzen fallen eher gering aus. Allerdings muss, da Veränderungen auch nur in einem bestimmten Zelltypus wie Entzündungszellen zu finden sein könnten, den gefundenen Differenzen erhöhte Aufmerksamkeit gewidmet werden. In weiteren Folgeuntersuchungen des Labors wurden daraus folgende Konsequenzen gezogen: In der Arbeit von (Nesheim et al. 2018) wurden Leukozyten und Epithelzellen aus dem Ejakulat extrahiert und die Methylierungen speziell in diesen Zellpopulationen gemessen.

Unterschiede zwischen gesunden Kontrollen und CP/CPPS Patienten

Signifikante Unterschiede in den über die CpGs gemittelten Methylierungsgraden der Gene BMP2, BMP6, BMP7 und TGFB2 zwischen Patienten mit CP/CPPS und Gesunden wurden nicht gefunden. Auffallend waren jedoch große Streuungen der Methylierungswerte von BMP6 und BMP7 in Patienten mit CPPS3b. Dies kann ein Hinweis auf einen Zuwachs von einzelnen, fehlregulierten Zellen sein.

Im Vergleich der Medianwerte in einzelnen CpGs im TGFB2-Promotor von Patienten mit CP/CPPS und Gesunden wurden hingegen signifikante Differenzen auffällig (Mann-Whitney-U-Test, 2-seitig, $p=0,021$). Diese zeigen eine, in der Summe leichte Hypomethylierung von TGFB2 in Patienten mit CP/CPPS. In TGFB2 zeigten sich auch signifikante Unterschiede der CpGs der Stellen 1, 5 und 6. Stelle 1 ist im Vergleich zu Gesunden etwas höher methyliert, die Stellen 5 und 6 etwas geringer. Allerdings korrelieren diese Veränderungen auch mit dem Alter der Patienten und somit ist eine Einflussnahme des Alters auf die Messergebnisse nicht auszuschließen und ist eine mögliche Erklärung für den gemessenen Unterschied. TGFB wird allerdings im Allgemeinen eine Entzündungshemmende Funktion zugeschrieben (Gorelik und Flavell 2000). Allerdings korrelieren keine weiteren Entzündungswerte mit dem Methylierungsgraden von TGFB2.

Auch der Vergleich der Mediane der Methylierungsgrade von BMP7 von Gesunden und Patienten mit CP/CPPS zeigt Auffälligkeiten, ist aber nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test, 2-seitig, $p=0,89$). Die Tendenz zeigt allerdings höhere Methylierungen bei Patienten

Diskussion

mit CP/CPPS. Die Mediane von BMP7 korrelieren aber zudem negativ mit dem Alter (Spearman Rho, 2-seitig, $p=0,041$, $r=-0,22$). Da die Patientengruppe signifikant älter ist als die der Gesunden, kann dies an dieser Stelle auch ein möglicher Krankheitseffekt (BMP7 ist tendenziell höher methyliert in Kranken als in Gesunden) in der Messung abgeschwächt worden sein.

Detaillierte Betrachtung einzelner Stellen der untersuchten Promoter und möglicher Zusammenhang mit Estrogen

Da einzelne CpGs regulatorische Bindemotive, also Bindungsstellen für Regulatorproteine beeinflussen können, wurden in dieser Arbeit auch einzelne Methylierungsstellen der untersuchten Promotorenregionen detaillierter betrachtet.

Die CpGs der Stelle 5 des Genes BMP2 der Patienten mit CP/CPPS zeigen im Vergleich zu Gesunden erhöhte Methylierungen. Die Methylierung von BMP2 fügt sich somit in das von (Nesheim et al. 2018) gezeichnete Bild: Die Behandlung mit Östrogen der Mastzellreihe HMC-1 hatte eine Minderexpression von BMP2 zur Folge. Dies kann mit einer Hochregulation der Methylierung erklärt werden. Der Methylierungsgrad von BMP2 der HMC-1-Zellen und der Konzentration von Östrogen zeigt eine signifikante Korrelation (Spearman Rho, 2-seitig, $p=0,037$, $r=-0,9$). Somit ist hier ein möglicher, konzentrationsabhängigen Einfluss von Östrogen auf die Methylierungsgrade von BMP2 der HMC-1-Zellen zu vermuten. Dies kann auch isoliert am CpG der 5. Stelle der HMC-1 Mastzelllinie in BMP2 nachvollzogen werden.

Ähnliches kann auch in der LAD2-Zelllinie unter Östrogen beobachtet werden: Auch für die LAD2-Zellen findet sich eine signifikante negative Korrelation der Methylierungsgrade von BMP2 und der Östrogenkonzentration (Spearman Rho, 2-seitig, $p=0,037$, $r=-0,9$). Dies lässt auf einen möglichen Einfluss der Östrogenkonzentration auf die Methylierungsgrade von BMP2 der LAD2-Zellen schließen. Im Expressionsassay von Nesheim et al. 2018 findet sich aber keine Äquivalenz der Expression.

Auch das CpG an Stelle 5 von BMP6 zeigte signifikante, aber gering höhere Methylierungen bei Patienten mit CP/CPPS. Hinzu kommt jedoch, dass die Mediane und die Mittelwerte von BMP6 bei allen Untersuchten signifikant negativ mit dem Alter der Untersuchten korrelieren (Spearman Rho, 2-seitig, $p=0,034$, $r=-0,23$) (Spearman Rho, 2-seitig, $p=0,021$, $r=-0,24$). Dies heißt, je älter die gemessene Person, desto niedriger der gemessene Methylierungsgrad. Da die Gruppe der Erkrankten ein wesentlich höheres

Diskussion

Durchschnittsalter als die Kohorte der Gesunden aufweist, könnte eine potentielle Altersabhängigkeit der Methylierung von BMP6 potentielle Unterschiede der Methylierung in der Krankheit CP/CPPS verschleiern.

Auch für das Gen BMP7 wurden am CpG der ersten Stelle im Mittel signifikant höhere Methylierungen bei Patienten mit CP/CPPS als bei Gesunden gefunden (Man-Whitney-U-Test, 2-seitig, $p=0,003$). Die mit Östrogen behandelten Mastzellen (Nesheim et al. 2018) zeigten eine starke Down-Regulation der Expression von BMP7 im RT² Profiler. In Anbetracht des erhöhten Östrogenspiegels bei Patienten mit CP/CPPS fügt sich dieses Ergebnis gut in das Gesamtbild. Im Vergleich hierzu zeigen die mit Östrogen stimulierten Mastzellreihen in BMP7 keine nachvollziehbare Methylierungsänderung, auch nicht isoliert am CpG der 1. Stelle, wie hier in Patienten mit CP/CPPS beobachtet.

Auch der Vergleich der Mediane der Methylierungsgrade von BMP7 von Gesunden und Patienten mit CP/CPPS zeigt wie bereits oben erwähnt Auffälligkeiten, ist aber nicht signifikant (Man-Whitney-U-Test, 2-seitig, $p=0,89$). Die Tendenz zeigt allerdings höhere Methylierungen bei Patienten mit CP/CPPS. Auch dies fügt sich gut in das bisherige Bild (Nesheim et al. 2018) der Erkrankung, die einen etwaigen Östrogeneinfluss nahe legt. So zeigte die Mastzellreihe HMC-1 eine stark verminderte BMP7-Expression unter Östrogenbehandlung. Allerdings konnte in meiner Arbeit in den Mastzellreihen unter Östrogenbehandlung keine eindeutige Methylierungsänderung von BMP7 gezeigt werden.

Korrelationen und Assoziationen der Methylierungen

Die Methylierung der Gene der Proteinsuperfamilie TGFB2, BMP6, BMP2, BMP7 zeigen größtenteils positive Korrelationen. So korreliert BMP2 mit BMP6 (Spearman Rho, sign. 2-seitig, $p=0,039$, $r=0,2$). BMP2 mit BMP7 (Spearman Rho sign. 2-seitig $p=0,001$, $r=0,35$) und BMP2 mit TGFB2 (Spearman Rho, sign. 2-seitig, $p=0,001$, $r=0,6$). Des Weiteren korreliert BMP7 mit BMP6 (Spearman Rho sign. 2-seitig $p=0,001$, $r=0,34$) sowie mit TGFB2 (Spearman Rho, sign. 2-seitig, $p=0,001$, $r=0,33$).

Für die explorative Auswertung ist interessant, dass das Alter knapp nicht signifikant aber negativ mit dem Testosteronwert korreliert (Spearman Rho, sign. 2-seitig, $p=0,085$, $r=-0,21$). Dieser eher schwache Effekt schließt ein Gegenspieler-Prinzip der Hormone Testosteron und Östrogen, was in dieser Krankheit möglicherweise überexprimiert wird (siehe oben) nicht aus.

Diskussion

Auch das PSA der Patienten zeigt einen möglichen Zusammenhang mit der Methylierung der Proteinsuperfamilie. So zeigen BMP2 (Spearman Rho, sign. 2-seitig, $p=0,003$, $r=-0,43$), BMP6 (Spearman Rho, sign. 2-seitig, $p=0,003$, $r=-0,36$) eine signifikante und TGFB2 (Spearman Rho, sign. 2-seitig, $p=0,063$, $r=-0,3$) eine Tendenz zur Korrelation.

Eine mögliche Erklärung bietet eine im Alter zunehmende Prostatahyperplasie oder sogar ein Prostatakarzinom mit möglicher konsekutiver Zunahme des PSA-Wertes. Dieser weist unter den Patienten ebenfalls knapp keine Signifikanz in der Korrelation mit dem Alter der Patienten auf (Spearman Rho, sign. 2-seitig, $p=0,053$, $r=0,23$) was nun auch den möglichen Zusammenhang von Alter und Methylierung von BMP6 erklären könnte.

Methylierungen der untersuchten Gene in PCa-Zellreihen PC3, DU145, LnCaP

In der Arbeit von (Nesheim et al. 2018) wurde ein möglicher Zusammenhang der Erkrankungen der Prostata, CP/CPPS, BPH und PCa angedacht. Dieser Gedanke kann noch nicht verworfen werden und der hier gezeigte Ansatz könnte weiter verfolgt werden. Die Messung der Methylierung dieser Zellen ist als explorative Untersuchung, auch für den möglichen Zusammenhang der Gene der TGFB-Superfamilie und dem Prostata-Krebs, gedacht. Zudem zeigt in dieser Arbeit das PSA der Patienten eine signifikante Korrelation mit überwiegenden Teilen der Methylierungen der Proteinsuperfamilie.

Methylierungen der mit Östrogen behandelten Mastzelllinien HMC-1 und LAD2

Die Änderung der Methylierungsverhältnisse, den Änderungen der Konzentrationsverhältnisse gegenübergestellt, fallen allenfalls sehr gering aus. Eine lineare Abhängigkeit der Methylierung von der Östrogenkonzentration lässt sich bei HMC-1 in BMP2 und bei LAD2 in BMP7 vermuten. Ein gewisser Einfluss der Östrogenkonzentration auf die Methylierung lässt sich in der HMC-1 Zellreihe in BMP6 und in der LAD2 Zellreihe in TGFβ2 vermuten. Zu beachten ist, dass diese beiden Zelllinien unterschiedliche Reifegrade einer Mastzelle widerspiegeln: LAD2 gilt im Gegensatz zu HMC-1 als ausgereift. Auch spielen die hier untersuchten Gene eine nicht unwesentliche Rolle in der Gewebsdifferenzierung.

Signifikante Korrelationen zwischen Östrogenkonzentration und dem Methylierungsgrad ergab sich für BMP2 der HMC-1-Zellen (Spearman Rho, 2-seitig, $p=0,014$, $r=-0,9$). Auch für die LAD2-Zellen findet sich eine signifikante Korrelation der Methylierungsgrade von BMP2 und der Östrogenkonzentration (Spearman Rho, 2-seitig, $p=0,037$, $r=-0,9$). Diese reagierte wie die HMC-1 Zelllinie mit einer Mindermethylierung.

Zusammenfassung

Die Zelllinien wurden für 24h im IRTG Partnerlabor in Monash, Australien mit unterschiedlichen Konzentrationen von Östrogen und Ethanol als Kontrolle behandelt. Möglicherweise reagieren Zellen nur auf physiologisch realistische Konzentrationen. Dann sollten die Änderungen im Detail auch in Betracht gezogen werden und ein besonderes Augenmerk auf TGFB2 der LAD2 mit einer sehr großen Änderung der Methylierung unter der zweithöchsten Östrogenkonzentration gelenkt werden. Denkbar ist auch, dass die Änderung der Methylierung erst in größerem Maßstab erfolgt, wenn die Zellen den neuen Bedingungen einem längeren Zeitraum ausgesetzt werden. Die Zelllinien wurden aber nur für 24 Stunden mit den Östrogenkonzentrationen behandelt. In der Arbeit von (Nesheim et al. 2018) konnte gezeigt werden, dass CP/CPPS-Patienten im Seminalplasma erhöhte Östrogenwerte aufzeigen. Deswegen sollte die Idee dieses Ansatzes nicht verworfen werden.

Erkenntnisse aus den Fragebögen

Sehr plastisch und einleuchtend erscheinen einige subjektive Werte der Patienten, die mittels der Fragebögen erhoben wurden. So korreliert das Alter der untersuchten Patienten stark mit dem im HADS erhobenen Depressionswert (Spearman Rho, sign. 2-seitig, $p=0,001$, $r=0,4$) und mit den im NIH-CPSI angegebenen Schmerzwert (Spearman Rho, sign. 2-seitig, $p=0,001$, $r=0,56$). Dies lässt darauf schließen, dass ältere Patienten unter dieser Erkrankung mehr leiden, sie eventuell weiter fortgeschritten ist, oder, dass Depression im Alter Einfluss auf Schmerzwahrnehmung oder gar Krankheitsentwicklung haben könnte. Dies bestätigt aber auch, dass bei älteren Patienten auf Depressionen geachtet werden sollte (Ackermann 2018).

Zentrale Schwäche der Arbeit: Aufbau der Patienten-und Kontroll-Kohorten

Die Kohorten, Gesunde und Kranke, die in dieser Arbeit untersucht wurden, weisen einen statistisch signifikanten Altersunterschied auf. Die Auswirkungen des Alters auf den Tryptasespiegel sollten gering bis nicht relevant sein (siehe Tryptasewerte und Altersverteilung der Kohorten), allerdings ist eine Beeinflussung der Methylierungen, speziell bei BMP6 und TGFB2 gut denkbar.

Zusammenfassung

Die Mastzelle wird zunehmend als eine Entzündung initiierende und modulierende Zelle beschrieben. So häufen sich die Hinweise, dass sie auch für die Entzündungs- und Schmerzentwicklung der Chronischen Prostatitis und des Chronischen

Zusammenfassung

Beckenschmerzsyndromes (CP/CPPS) mit verantwortlich ist. Zudem wurden bei Patienten mit CP/CPPS erhöhte Östrogenspiegel im Seminalplasma festgestellt. Änderungen im Östrogenhaushalt ziehen Änderung der Genexpression und der epigenetischen Regulierung nach sich. Dies zeigte sich unter anderem in Mastzelllinien für die Gene BMP2 und BMP7, sowie in Brustkrebszelllinien für TGFB2 (Putnik et al. 2012). Änderungen der Epigenetik und der Expression bestimmter Gene wie ER1, ER2 und CXCR4 wurden auch bereits bei Patienten mit CP/CPPS nachgewiesen.

In dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob sich bei Patienten mit CP/CPPS systemisch erhöhte Tryptasewerte als Mastzellmarker nachweisen lassen, und inwieweit diese einen möglichen Zusammenhang mit klinischen Entzündungsparametern, dem PSA und den Hormonen Testosteron und Östradiol zeigen. Epigenetisch wurde untersucht, inwieweit CP/CPPS Änderungen in den Methylierungen der CPIs der Gene BMP2, BMP6, BMP7 und TGFB2 bewirkt. Auch wurden die mit unterschiedlichen Konzentrationen von Östrogen behandelten Mastzelllinien HMC-1 und LAD2 auf Änderungen der Methylierungen der Promotorregionen dieser Gene hin untersucht.

Es wurden Proben von 85 Patienten mit CP/CPPS sowie von 40 gesunden Kontrollen untersucht. Die Messung der Tryptasespiegel erfolgte im Blutplasma. Die Messung der Promotormethylierung erfolgte im EDTA-Blut und in den mit Östrogen vorbehandelten Mastzelllinien HMC-1 und LAD2 via Pyrosequenzierung.

Systemisch ließen sich mit der gewählten Methode keine Unterschiede zwischen Patienten und Gesunden in den Tryptasespiegeln im Blut aufzeigen. Für Messungen im Exprimaturin war die gewählte Methode offensichtlich nicht sensitiv genug und die Versuche wurden deswegen nicht weitergeführt. Es wurden keine Zusammenhänge der Tryptasewerte und den klinischen Parametern gefunden.

Es konnten jedoch epigenetische Signale systemisch nachgewiesen werden. Hier wurde auch geringen Unterschieden der Methylierungen zwischen Gesunden und Erkrankten aufgrund der systemischen Messungen erhöhte Aufmerksamkeit geschenkt: So zeigten die fünften Stellen der untersuchten CPIs von BMP2 und BMP6 eine signifikant höhere Methylierung bei Erkrankten verglichen mit Gesunden. Auch die erste Stelle von BMP7 bei Patienten war signifikant höher methyliert als bei Gesunden. Dies deckt sich mit den in dieser Arbeitsgruppe gemessenen Expressionen der mit Östrogen behandelten Mastzelllinie HMC-1: BMP2 und BMP7 wurden hier minderexprimiert. Auch konnte für

Summary

die Methylierungen der Mastzelllinie HMC-1 eine Korrelation mit der behandelnden Östrogenkonzentration gefunden werden.

Auch für TGFB2 wurden signifikante Unterschiede zwischen Gesunden und Erkrankten in den Methylierungen des untersuchten CPIs an den Stellen 1, 5 und 6 gefunden. Jedoch zeigen diese eine positive Korrelation mit dem Alter der Patienten und eine Altersabhängigkeit ist somit nicht auszuschließen.

Summary

Mast Cells are increasingly seen as inflammation-triggering and -orchestrating immune cells. As well in CP/CPPS they are described as the possible link between acute and chronic inflammation of the prostate on the one hand and the development of the pain on the other hand. Furthermore, elevated estrogen levels in the seminal plasma of patients with CP/CPPS have been described recently. These changes in the estrogen household can result in variation of gene expression, as reported in mast cell lines (HMC-1, LAD2) for BMP2, BMP7, and in breast cancer lines for TGFB2. In addition epigenetic changes in form of changes in promotor methylation as well as its associated gene expression have been found in patients with CP/CPPS: Elevated estrogen levels have been found to accompany methylated and downregulated ER1 and ER2, as well as a downregulation of CXCR4.

We aimed to detect elevated tryptase levels, a protein useable as mast cell marker, in the blood of patients with CP/CPPS and possible correlation with inflammation markers like CRP and leukocytes as well as PSA and hormones like testosterone and estradiol. Furthermore, we investigated if there are differences in promotor methylation of the genes BMP2, BMP6, BMP7 and TGFB2 in patients with CP/CPPS, compared to the healthy control group, detectable. Since there have been found changes in expression of BMP2, BMP7 und TGFB2 in estrogen treated Mast cell lines HMC-1 and LAD2 in this group, promotor methylation of these mast cell lines has been examined as well.

85 patients with chronic prostatitis and 40 healthy probands in total have been examined. Tryptase levels have been measured in plasma. Analysis of promotor methylation for BMP2, BMP6, BMP7 and TGFB2 has been performed in EDTA-blood from patients and volunteers as well as estrogen-treated mast cell lines HMC-1 and LAD2 via pyrosequencing.

Summary

There have been no differences detected in tryptase levels of patients with CP/CPPS and the healthy control group. Tryptase levels did not correlate neither with inflammation markers, nor PSA, nor the examined hormones estradiol and testosterone. Local measurements of tryptase in post prostatic massage urine have not been successful due to the lack of sensitivity of the chosen procedure of measurement.

Epigenetic variation has been found for promotor methylation of BMP2 and BMP6 at CpGs no. 5 and BMP7 CpG no. 1. That finding fits to the predescribed downregulation of BMP2 and BMP7 of the estrogene pretreated mast cell line HMC-1. There has been a correlation of estrogen concentration and promotor methylation of BMP2 in HMC-1. Promotor methylation of CpGs no.1, 5 and 6 of TGFB2 showed differences in patients compared to the control group. There was however a correlation with the age of the examined men, which could point to an age-related influence.

Literaturverzeichnis

Ackermann, Richard J. (2018): Issues in Geriatric Care. Maintaining Health and Vigor. In: *FP essentials* 468, S. 11–17.

Adcock, Ian M.; Ford, Paul; Ito, Kazuhiro; Barnes, P. J. (2006): Epigenetics and airways disease. In: *Respiratory research* 7 (7), S. 2–21. DOI: 10.1186/1465-9921-7-21.

Afonina, Inna S.; Müller, Christina; Martin, Seamus J.; Beyaert, Rudi (2015): Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines. Variations on a Common Theme. In: *Immunity* 42 (6), S. 991–1004. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.06.003.

Andrews, Paul V.; Helme, Robert D.; Thomas, Karen L. (1989): NK-1 receptor mediation of neurogenic plasma extravasation in rat skin. In: *British Journal of Pharmacology* 97 (4), S. 1232–1238. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1989.tb12583.x.

Apkarian, A. Vania; Baliki, Marwan N.; Geha, Paul Y. (2009): Towards a theory of chronic pain. In: *Progress in neurobiology* 87 (2), S. 81–97. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2008.09.018.

Barnes, Peter J. (2011): Pathophysiology of allergic inflammation. In: *Immunological reviews* (242), S. 31–50. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2011.01020.x.

Batstone, G. R. D.; Doble, A.; GASTON, J. S. H. (2002): Autoimmune T cell responses to seminal plasma in chronic pelvic pain syndrome (CPPS). In: *Clinical & Experimental Immunology* 128 (2), S. 302–307. DOI: 10.1046/j.1365-2249.2002.01853.x.

Bell, Joshua S. K.; Vertino, Paula M. (2017): Orphan CpG islands define a novel class of highly active enhancers. In: *Epigenetics* 12 (6), S. 449–464. DOI: 10.1080/15592294.2017.1297910.

Berry, S. J.; Coffey, D. S.; Walsh, P. C.; Ewing, L. L. (1984): The development of human benign prostatic hyperplasia with age. In: *The Journal of urology* 132 (3), S. 474–479.

Bienenstock, J.; Tomioka, M.; Matsuda, H.; Stead, R. H.; Quinonez, G.; Simon, G. T. et al. (1987): The role of mast cells in inflammatory processes. Evidence for nerve/mast cell interactions. In: *International archives of allergy and applied immunology* 82 (3-4), S. 238–243.

Bioline (2017): MyTaq™ DNA Polymerase - Bioline. Hg. v. Bioline. Online verfügbar unter <https://www.bioline.com/mytaq-dna-polymerase.html>, zuletzt geprüft am 22.03.2018.

Bjerkklund Johansen, Truls E.; Weidner, Wolfgang (2002): Understanding chronic pelvic pain syndrome. In: *Current Opinion in Urology* 12 (1), S. 63–67. DOI: 10.1097/00042307-200201000-00012.

Blobe Gerard C.; Schiemann William P.; Lodish Harvey F. (2000): Role of Transforming Growth Factor β in Human Disease. In: *the New England Journal of Medicine* (342), S. 1350–1358. DOI: 10.1056/NEJM200005043421807.

Bonnekoh, Hanna; Scheffel, Jörg; Kambe, Naotomo; Krause, Karoline (2018): The role of mast cells in autoinflammation. In: *Immunological reviews* 282 (1), S. 265–275. DOI: 10.1111/imr.12633.

Brabletz, T.; Pfeuffer, I.; Schorr, E.; Siebelt, F.; Wirth, T.; Serfling, E. (1993): Transforming growth factor beta and cyclosporin A inhibit the inducible activity of the interleukin-2 gene in T cells through a noncanonical octamer-binding site. In: *Molecular and cellular biology* 13 (2), S. 1155–1162.

Breser, María L.; Salazar, Florencia C.; Rivero, Virginia 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.

Buhner, Sabine; Schemann, Michael (2012): Mast cell-nerve axis with a focus on the human gut. In: *Biochimica et biophysica acta* 1822 (1), S. 85–92. DOI: 10.1016/j.bbdis.2011.06.004.

Burd, P. R.; Rogers, H. W.; Gordon, J. R.; Martin, C. A.; Jayaraman, S.; Wilson, S. D. et al. (1989): Interleukin 3-dependent and -independent mast cells stimulated with IgE and antigen express multiple cytokines. In: *The Journal of experimental medicine* 170 (1), S. 245–257. DOI: 10.1084/jem.170.1.245.

Carragee, Eugene J.; Hurwitz, Eric L.; Weiner, Bradley K. (2011): A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery. Emerging safety concerns and lessons learned. In: *The spine journal : official journal of the North American Spine Society* 11 (6), S. 471–491. DOI: 10.1016/j.spinee.2011.04.023.

Carreira, A. C.; Lojudice, F. H.; Halcsik, E.; Navarro, R. D.; Sogayar, M. C.; Granjeiro, J. M. (2014): Bone morphogenetic proteins. Facts, challenges, and future perspectives. In: *Journal of dental research* 93 (4), S. 335–345. DOI: 10.1177/0022034513518561.

Chen, Hongming; Xu, Yanwen; Yang, Guanbin; Zhang, Qianqian; Huang, Xun; Yu, Liming; Dong, Xianglin (2017): Mast cell chymase promotes hypertrophic scar fibroblast proliferation and collagen synthesis by activating TGF- β 1/Smads signaling pathway. In: *Experimental and therapeutic medicine* 14 (5), S. 4438–4442. DOI: 10.3892/etm.2017.5082.

Chen, Yong; Song, Bo; Jin, Xi-Yu; Xiong, En-Qing; Zhang, Jian-Hua (2005): Possible mechanism of referred pain in the perineum and pelvis associated with the prostate in rats. In: *The Journal of urology* 174 (6), S. 2405–2408.

Cheung, Peter; Lau, Priscilla (2005): Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 19 (3), S. 563–573. DOI: 10.1210/me.2004-0496.

Chi, David S.; Fitzgerald, S. Matthew; Pitts, Shannon; Cantor, Karen; King, Ellis; Lee, Steven A. et al. (2004): MAPK-dependent regulation of IL-1- and beta-adrenoreceptor-induced inflammatory cytokine production from mast cells. Implications for the stress response. In: *BMC immunology* 5 (22), S. 12. DOI: 10.1186/1471-2172-5-22.

Christophers, E.; Metzler, G.; Röcken, M. (2014): Bimodal immune activation in psoriasis. In: *The British journal of dermatology* 170 (1), S. 59–65. DOI: 10.1111/bjd.12631.

Dagli, Aditi I.; Mueller, Jennifer; Williams, Charles A. (1993): GeneReviews®. Angelman Syndrome. Hg. v. Margaret P. Adam, Holly H. Ardinger, Roberta A. Pagon, Stephanie E. Wallace, Lora J. H. Bean, Karen Stephens und Anne Amemiya. Seattle (WA).

Daniel A Shoskes; Scott I Zeitlin; Asha Shahed; Jacob Rajfer (1999): Quercetin in men with category III chronic prostatitis: a preliminary prospective, double-blind, placebo-controlled trial. In: *Urology* 54 (6), S. 960–963.

Daniel Shoskes MD (2009): UPOINT Clinical Phenotype for Chronic Pelvic Pain Syndrome. Hg. v. Daniel Shoskes MD. Online verfügbar unter <http://www.upointmd.com/>, zuletzt geprüft am 16.04.2018.

- David M. Lee; Daniel S. Friend; Michael F. Gurish; Christophe Benoist; Diane Mathis; Michael B. Brenner (2002): Mast Cells: A Cellular Link Between Autoantibodies and Inflammatory Arthritis. In: *science* 297 (5587), S. 1689–1692. DOI: 10.1126/science.1073176.
- Deaton, Aimée M.; Bird, Adrian (2011): CpG islands and the regulation of transcription. In: *Genes & development* 25 (10), S. 1010–1022. DOI: 10.1101/gad.2037511.
- Derynck, Rik; Zhang, Ying E. (2003): Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. In: *Nature* 425 (6958), S. 577–584. DOI: 10.1038/nature02006.
- Devine, John G.; Dettori, Joseph R.; France, John C.; Brodt, Erika; McGuire, Robert A. (2012): The use of rhBMP in spine surgery. Is there a cancer risk? In: *Evidence-based spine-care journal* 3 (2), S. 35–41. DOI: 10.1055/s-0031-1298616.
- Doble, A.; Walker, M. M.; Harris, J. R.; Taylor-Robinson, D.; Witherow, R. O. (1990): Intraprostatic antibody deposition in chronic abacterial prostatitis. In: *British Journal of Urology* 65 (6), S. 598–605.
- Done, Joseph D.; Rudick, Charles N.; Quick, Marsha L.; Schaeffer, Anthony J.; Thumbikat, Praveen (2012): Role of mast cells in male chronic pelvic pain. In: *The Journal of urology* 187 (4), S. 1473–1482. DOI: 10.1016/j.juro.2011.11.116.
- Driscoll, Daniel J.; Miller, Jennifer L.; Schwartz, Stuart; Cassidy, Suzanne B. (1993): GeneReviews®. Prader-Willi Syndrome. Hg. v. Margaret P. Adam, Holly H. Ardinger, Roberta A. Pagon, Stephanie E. Wallace, Lora J. H. Bean, Karen Stephens und Anne Amemiya. Seattle (WA).
- Dunphy, Edward J.; Eickhoff, Jens C.; Muller, Charles H.; Berger, Richard E.; McNeel, Douglas G. (2004): Identification of antigen-specific IgG in sera from patients with chronic prostatitis. In: *Journal of clinical immunology* 24 (5), S. 492–502. DOI: 10.1023/B:JOCL.0000040920.96065.5a.
- Edwards, John R.; Yarychkivska, Olya; Boulard, Mathieu; Bestor, Timothy H. (2017): DNA methylation and DNA methyltransferases. In: *Epigenetics & chromatin* 10, S. 23. DOI: 10.1186/s13072-017-0130-8.

- Eklund, Kari K. (2007): Mast cells in the pathogenesis of rheumatic diseases and as potential targets for anti-rheumatic therapy. In: *Immunological reviews* 217, S. 38–52. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2007.00504.x.
- Ellem, Stuart J.; Taylor, Renea A.; Furic, Luc; Larsson, Ola; Frydenberg, Mark; Pook, David et al. (2014a): A pro-tumourigenic loop at the human prostate tumour interface orchestrated by oestrogen, CXCL12 and mast cell recruitment. In: *The Journal of pathology* 234 (1), S. 86–98. DOI: 10.1002/path.4386.
- Ellem, Stuart J.; Taylor, Renea A.; Furic, Luc; Larsson, Ola; Frydenberg, Mark; Pook, David et al. (2014b): A pro-tumourigenic loop at the human prostate tumour interface orchestrated by oestrogen, CXCL12 and mast cell recruitment. In: *The Journal of pathology* 234 (1), S. 86–98. DOI: 10.1002/path.4386.
- Farmer, Melissa A.; Chanda, Mona L.; Parks, Elle L.; Baliki, Marwan N.; Apkarian, A. Vania; Schaeffer, Anthony J. (2011): Brain functional and anatomical changes in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. In: *The Journal of urology* 186 (1), S. 117–124. DOI: 10.1016/j.juro.2011.03.027.
- Feinberg, Andrew P.; Vogelstein, Bert (1983): Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. In: *Nature* 301 (5895), S. 89–92. DOI: 10.1038/301089a0.
- Frossi, Barbara; Mion, Francesca; Sibilano, Riccardo; Danelli, Luca; Pucillo, Carlo E. M. (2018): Is it time for a new classification of mast cells? What do we know about mast cell heterogeneity? In: *Immunological reviews* 282 (1), S. 35–46. DOI: 10.1111/imr.12636.
- 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.
- Galli, Stephen J.; Borregaard, Niels; Wynn, Thomas A. (2011): Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity. Macrophages, mast cells and neutrophils. In: *Nature immunology* 12 (11), S. 1035–1044. DOI: 10.1038/ni.2109.
- GeneCards Human Gene Database (1998a-2018): BMP2 Gene - GeneCards | BMP2 Protein | BMP2 Antibody. Hg. v. Weizmann Institute of Science. Online verfügbar unter

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BMP2&keywords=bmp2>, zuletzt geprüft am 07.05.2018.

GeneCards Human Gene Database (1998b-2018): BMP6 Gene - GeneCards | BMP6 Protein | BMP6 Antibody. Hg. v. Weizmann Institute of Science. Online verfügbar unter <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BMP6&keywords=bmp6#diseases>, zuletzt geprüft am 07.05.2018.

GeneCards Human Gene Database (1998c-2018): BMP7 Gene - GeneCards | BMP7 Protein | BMP7 Antibody. Hg. v. Weizmann Institute of Science. Online verfügbar unter <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BMP7&keywords=bmp7>, zuletzt geprüft am 07.05.2018.

Gordon, J. R. (1994): Promotion of mouse fibroblast collagen gene expression by mast cells stimulated via the Fc epsilon RI. Role for mast cell-derived transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha. In: *J Exp Med* 180 (6), S. 2027–2037. DOI: 10.1084/jem.180.6.2027.

Gorelik, Leonid; Flavell, Richard A. (2000): Abrogation of TGF β Signaling in T Cells Leads to Spontaneous T Cell Differentiation and Autoimmune Disease. In: *Immunity* 12 (2), S. 171–181. DOI: 10.1016/S1074-7613(00)80170-3.

Grabbe, Jürgen; Welker, P.i.a.; Möller, Annelie; Dippel, Edgar; Ashman, Leonie K.; Czarnetzki, Beate M. (1994): Comparative Cytokine Release from Human Monocytes, Monocyte-Derived Immature Mast Cells, and a Human Mast Cell Line (HMC-1). In: *Journal of Investigative Dermatology* 103 (4), S. 504–508. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12395649.

Gruber, B. L.; Marchese, M. J.; Kew, R. R. (1994): Transforming growth factor-beta 1 mediates mast cell chemotaxis. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 152 (12), S. 5860–5867.

Guarner, Francisco; Bourdet-Sicard, Raphaëlle; Brandtzaeg, Per; Gill, Harsharnjit S.; McGuirk, Peter; van Eden, Willem et al. (2006): Mechanisms of disease. The hygiene hypothesis revisited. In: *Nature clinical practice. Gastroenterology & hepatology* 3 (5), S. 275–284. DOI: 10.1038/ncpgasthep0471.

Guhl, Sven; Babina, Magda; Neou, Angelos; Zuberbier, Torsten; Artuc, Metin (2010): Mast cell lines HMC-1 and LAD2 in comparison with mature human skin mast cells--

- drastically reduced levels of tryptase and chymase in mast cell lines. In: *Experimental dermatology* 19 (9), S. 845–847. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2010.01103.x.
- Guo, H.; Xu, Y-M; Ye, Z-Q; Yu, J-H; Fu, Q.; Sa, Y-L et al. (2010): Heat-shock protein 70 expression in the seminal plasma of patients with chronic bacterial prostatitis and chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. In: *Prostate cancer and prostatic diseases* 13 (4), S. 338–342. DOI: 10.1038/pcan.2010.22.
- Gupta, Kalpna; Harvima, Ilkka T. (2018): Mast cell-neural interactions contribute to pain and itch. In: *Immunological reviews* 282 (1), S. 168–187. DOI: 10.1111/imr.12622.
- Haidar, Ziyad S.; Hamdy, Reggie C.; Tabrizian, Maryam (2009): Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part A. Current challenges in BMP delivery. In: *Biotechnology letters* 31 (12), S. 1817–1824. DOI: 10.1007/s10529-009-0099-x.
- Herpin, Amaury; Lelong, Christophe; Favrel, Pascal (2004): Transforming growth factor-beta-related proteins. An ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. In: *Developmental and comparative immunology* 28 (5), S. 461–485. DOI: 10.1016/j.dci.2003.09.007.
- Hogaboam, C. M.; Befus, A. D.; Wallace, J. L. (1993): Modulation of rat mast cell reactivity by IL-1 beta. Divergent effects on nitric oxide and platelet-activating factor release. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 151 (7), S. 3767–3774.
- Holliday, R. (1987): The inheritance of epigenetic defects. In: *science* (238), S. 163–170. Online verfügbar unter <http://science.sciencemag.org/content/238/4824/163/tab-pdf>, zuletzt geprüft am 31.03.2018.
- Hügler, Thomas (2014): Beyond allergy. The role of mast cells in fibrosis. In: *Swiss medical weekly* 144, w13999. DOI: 10.4414/smw.2014.13999.
- Hültner, L.; Kölsch, S.; Stassen, M.; Kaspers, U.; Kremer, J. P.; Mailhammer, R. et al. (2000): In activated mast cells, IL-1 up-regulates the production of several Th2-related cytokines including IL-9. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164 (11), S. 5556–5563.
- Jasmin, L.; Janni, G.; Ohara, P. T.; Rabkin, S. D. (2000): CNS induced neurogenic cystitis is associated with bladder mast cell degranulation in the rat. In: *The Journal of urology* 164 (3 Pt 1), S. 852–855. DOI: 10.1016/S0022-5347(05)67326-0.

Literaturverzeichnis

- Jenny Hallgren, Michael F. Gurish (2007): Pathways of murine mast cell development and trafficking: tracking the roots and routes of the mast cell. In: *Immunological reviews* 2007 (217), S. 8–18.
- Jin, Bilian; Li, Yajun; Robertson, Keith D. (2011): DNA methylation. Superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? In: *Genes & cancer* 2 (6), S. 607–617. DOI: 10.1177/1947601910393957.
- John, H.; Barghorn, A.; Funke, G.; Sulser, T.; Hailemariam, S.; Hauri, D.; Joller-Jemelka, H. (2001): Noninflammatory chronic pelvic pain syndrome. Immunological study in blood, ejaculate and prostate tissue. In: *European urology* 39 (1), S. 72–78. DOI: 10.1159/000052415.
- Kabashima, Kenji; Nakashima, Chisa; Nonomura, Yumi; Otsuka, Atsushi; Cardamone, Chiara; Parente, Roberta et al. (2018): Biomarkers for evaluation of mast cell and basophil activation. In: *Immunological reviews* 282 (1), S. 114–120. DOI: 10.1111/imr.12639.
- Kim, Geun-Young; Lee, Jin-Wook; Ryu, Ho-Cheol; Wei, Jun-Dong; Seong, Chu-Myong; Kim, Jae-Hong (2010): Proinflammatory cytokine IL-1 β stimulates IL-8 synthesis in mast cells via a leukotriene B₄ receptor 2-linked pathway, contributing to angiogenesis. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184 (7), S. 3946–3954. DOI: 10.4049/jimmunol.0901735.
- Kinet, Jean-Pierre (2007): The essential role of mast cells in orchestrating inflammation. In: *Immunological reviews* 217, S. 5–7. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2007.00528.x.
- Kirshenbaum, Arnold S.; Akin, Cem; Wu, Yalin; Rottem, Menachem; Goff, Julie P.; Beaven, Michael A. et al. (2003): Characterization of novel stem cell factor responsive human mast cell lines LAD 1 and 2 established from a patient with mast cell sarcoma/leukemia; activation following aggregation of Fc ϵ RI or Fc γ RI. In: *Leukemia Research* 27 (8), S. 677–682. DOI: 10.1016/S0145-2126(02)00343-0.
- Kitani, Atsushi; Fuss, Ivan; Nakamura, Kazuhiko; Kumaki, Fumiyuki; Usui, Takashi; Strober, Warren (2003): Transforming growth factor (TGF)- β 1-producing regulatory T cells induce Smad-mediated interleukin 10 secretion that facilitates coordinated immunoregulatory activity and amelioration of TGF- β 1-mediated fibrosis. In: *J Exp Med* 198 (8), S. 1179–1188. DOI: 10.1084/jem.20030917.

Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg (2016): Prostatitis-Fragebogen_2016. Prostatitis - Sprechstunde. Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie Universitätsklinikum Giessen und Marburg GmbH -Standort Giessen-. Hg. v. Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH. Online verfügbar unter http://ukgm.de/ugm_2/deu/ugi_uro/PDF/Prostatitis-Fragebogen_2016.pdf, zuletzt geprüft am 21.03.2018.

Kono, Hajime; Orłowski, Gregory M.; Patel, Zubin; Rock, Kenneth L. (2012): The IL-1-dependent sterile inflammatory response has a substantial caspase-1-independent component that requires cathepsin C. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 189 (7), S. 3734–3740. DOI: 10.4049/jimmunol.1200136.

Korkmaz, Selda; Karadağ, Mert Ali; Hamamcioglu, Kemal; Sofikerim, Mustafa; Aksu, Murat (2015): Electrophysiological Identification of Central Sensitization in Patients with Chronic Prostatitis. In: *Urology journal* 12 (4), S. 2280–2284. DOI: 10.22037/uj.v12i4.2873.

Kouliavskaia, Diana V.; Southwood, Scott; Berard, Carla A.; Klyushnenkova, Elena N.; Alexander, Richard B. (2009): T-cell recognition of prostatic peptides in men with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. In: *The Journal of urology* 182 (5), S. 2483–2489. DOI: 10.1016/j.juro.2009.07.067.

Krieger, J. N.; Nyberg, L.; Nickel, J. C. (1999): NIH consensus definition and classification of prostatitis. In: *JAMA* 282 (3), S. 236–237.

Krystel-Whittemore, Melissa; Dileepan, Kottarappat N.; Wood, John G. (2015): Mast Cell. A Multi-Functional Master Cell. In: *Frontiers in immunology* 6, S. 620–632. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00620.

Kulka, Marianna; Sheen, Cecilia H.; Tancowny, Brian P.; Grammer, Leslie C.; Schleimer, Robert P. (2008): Neuropeptides activate human mast cell degranulation and chemokine production. In: *Immunology* 123 (3), S. 398–410. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2007.02705.x.

L D Johns; K C Flanders; G E Ranges; S Sriram (1991): Successful treatment of experimental allergic encephalomyelitis with transforming growth factor-beta 1. In: *Journal of Immunology* 147 (6), S. 1792–1796.

Literaturverzeichnis

- L. J. Rosenwasser; C. A. Dinarello (1981): Ability of human leukocytic pyrogen to enhance phytohemagglutinin induced murine thymocyte proliferation. In: *Cellular Immunology* 63 (1), S. 134–142.
- Ley, Timothy J.; Ding, Li; Walter, Matthew J.; McLellan, Michael D.; Lamprecht, Tamara; Larson, David E. et al. (2010): DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. In: *the New England Journal of Medicine* 363 (25), S. 2424–2433. DOI: 10.1056/NEJMoa1005143.
- Li, Ming O.; Wan, Yisong Y.; Sanjabi, Shomyseh; Robertson, Anna-Karin L.; Flavell, Richard A. (2006): Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. In: *Annual review of immunology* 24, S. 99–146. DOI: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090737.
- Loeser, John D.; Melzack, Ronald (1999): Pain. An overview. In: *The Lancet* 353 (9164), S. 1607–1609. DOI: 10.1016/S0140-6736(99)01311-2.
- Lottspeich, Friedrich; Engels, Joachim W. (Hg.) (2012): Bioanalytik. 3. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
- Ludwig, M.; Steltz, C.; Huwe, P.; Schäffer, R.; Altmannsberger, M.; Weidner, W. (2001): Immunocytological analysis of leukocyte subpopulations in urine specimens before and after prostatic massage. In: *European urology* 39 (3), S. 277–282. DOI: 10.1159/000052453.
- M K Racke; S Dhib-Jalbut; B Cannella; P S Albert; C S Raine; D E McFarlin (1991): Prevention and treatment of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis by transforming growth factor-beta 1. In: *Journal of Immunology* 146 (9), S. 3012–3017.
- 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; Wagenlehner, Florian; Perletti, Gianpaolo; Schneider, Sebastian; Marras, Emanuela; Naber, Kurt G.; Weidner, Wolfgang (2010): Use of the UPOINT chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome classification in European patient

- cohorts. Sexual function domain improves correlations. In: *The Journal of urology* 184 (6), S. 2339–2345. DOI: 10.1016/j.juro.2010.08.025.
- Malykhina, A. P. (2007): Neural mechanisms of pelvic organ cross-sensitization. In: *Neuroscience* 149 (3), S. 660–672. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2007.07.053.
- Marshall, Jean S. (2004): Mast-cell responses to pathogens. In: *Nature reviews. Immunology* 4 (10), S. 787–799. DOI: 10.1038/nri1460.
- Martino, Luisa; Masini, Matilde; Bugliani, Marco; Marselli, Lorella; Suleiman, Mara; Boggi, Ugo et al. (2015): Mast cells infiltrate pancreatic islets in human type 1 diabetes. In: *Diabetologia* 58 (11), S. 2554–2562. DOI: 10.1007/s00125-015-3734-1.
- Mary Mcnaughton Collins; Randall S. Stafford; Michael P. O’Leary; Michael J. Barry (1998): How common ist prostatitis? A national survey of physician visits. In: *The Journal of urology* 159 (4), S. 1224–1228. DOI: 10.1016/S0022-5347(01)63564-X.
- Massagué, J.; Wotton, D. (2000): Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. In: *The EMBO journal* 19 (8), S. 1745–1754. DOI: 10.1093/emboj/19.8.1745.
- Maurer, Marcus; Metz, Martin (2005): The status quo and quo vadis of mast cells. In: *Experimental dermatology* 14 (12), S. 923–929. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2005.00369.x.
- Maurer, Marcus; Pucillo, Carlo (2018): What we know (and don't know) about the biology and functions of mast cells and basophils. In: *Immunological reviews* 282 (1), S. 5–7. DOI: 10.1111/imr.12645.
- Metz, Martin; Maurer, Marcus (2007): Mast cells--key effector cells in immune responses. In: *Trends in immunology* 28 (5), S. 234–241. DOI: 10.1016/j.it.2007.03.003.
- Meyer-Siegler, Katherine L.; Vera, Pedro L. (2004): Intraluminal antibodies to macrophage migration inhibitory factor decrease substance P induced inflammatory changes in the rat bladder and prostate. In: *The Journal of urology* 172 (4 Pt 1), S. 1504–1509.
- Möller; Henz; Grützkau; Lippert; Aragene; Schwarz; Krüger-Krasagakes (1998): Comparative cytokine gene expression. Regulation and release by human mast cells. In: *Immunology* 93 (2), S. 289–295. DOI: 10.1046/j.1365-2567.1998.00425.x.

Mullis, Kary B.; Faloona, Fred A. (1987): [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: Ray Wu (Hg.): *Recombinant DNA*, Bd. 155. San Diego, Calif.: Academic Press (Methods in Enzymology, 155), S. 335–350.

Naghitorabi, M.; Mohammadi Asl, J.; Mir Mohammad Sadeghi, H.; Rabbani, M.; Jafarian-Dehkordi, A.; Javanmard, Haghjooye S. (2013): Quantitative evaluation of DNMT3B promoter methylation in breast cancer patients using differential high resolution melting analysis. In: *Research in pharmaceutical sciences* 8 (3), S. 167–175.

Nakamura, Yuumi; Kambe, Naotomo; Saito, Megumu; Nishikomori, Ryuta; Nishikomori, Ryuta; Kim, Yun-Gi et al. (2009): Mast cells mediate neutrophil recruitment and vascular leakage through the NLRP3 inflammasome in histamine-independent urticaria. In: *The Journal of experimental medicine* 206 (5), S. 1037–1046. DOI: 10.1084/jem.20082179.

National Institute of Health; U.S. Department of Health and Human Services; National Cancer Institute (2018): Prostate Cancer - Cancer Stat Facts. Hg. v. National Cancer Institute. National Cancer Institute. Online verfügbar unter <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/prost.html>, zuletzt aktualisiert am 13.04.2018, zuletzt geprüft am 20.04.2018.

Ndaw, Victor S.; Abebayehu, Daniel; Spence, Andrew J.; Paez, Patrick A.; Kolawole, E. Motunrayo; Taruselli, Marcela T. et al. (2017): TGF- β 1 Suppresses IL-33-Induced Mast Cell Function. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 199 (3), S. 866–873. DOI: 10.4049/jimmunol.1601983.

Nesheim; Stuart Ellem; Temuujin Dansranjavin; Christina Hagenkötter; Elena Berg; Rupert Schambeck et al. (2018): Elevated seminal plasma estradiol and epigenetic inactivation of ESR1 and ESR2 is associated with CP/CPPS. In: *Oncotarget* 9 (28), S. 19623–19639. DOI: 10.18632/oncotarget.24714.

New England Biolabs inc. (2012): Instruction Manual EpiMark Bisulfite Conversion Kit E3318 (Version 1.1).

Nickel, J. Curtis; Shoskes, Daniel A.; Wagenlehner, Florian M. E. (2013): Management of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome (CP/CPPS). The studies, the evidence, and the impact. In: *World journal of urology* 31 (4), S. 747–753. DOI: 10.1007/s00345-013-1062-y.

Olsson, Niclas; Piek, Ester; Dijke, Peter ten; Nilsson, Gunnar (2000): Human mast cell migration in response to members of the transforming growth factor- β family. In: *J Leukoc Biol* 67 (3), S. 350–356. DOI: 10.1002/jlb.67.3.350.

Orhan, Irfan; Onur, Rahmi; Ilhan, Necip; Ardicoglu, Arslan (2001): Seminal plasma cytokine levels in the diagnosis of chronic pelvic pain syndrome. In: *Int J Urol* 8 (9), S. 495–499. DOI: 10.1046/j.1442-2042.2001.00358.x.

Passavanti, Maria Beatrice; Pota, Vincenzo; Sansone, Pasquale; Aurilio, Caterina; Nardis, Lorenzo de; Pace, Maria Caterina (2017): Chronic Pelvic Pain. Assessment, Evaluation, and Objectivation. In: *Pain research and treatment* 2017, S. 9472925. DOI: 10.1155/2017/9472925.

Penna, Giuseppe; Mondaini, Nicola; Amuchastegui, Susana; Degli Innocenti, Selene; Carini, Marco; Giubilei, Gianluca et al. (2007): Seminal plasma cytokines and chemokines in prostate inflammation. Interleukin 8 as a predictive biomarker in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and benign prostatic hyperplasia. In: *European urology* 51 (2), 524-33;. DOI: 10.1016/j.eururo.2006.07.016.

Pennington, D. W.; Lopez, A. R.; Thomas, P. S.; Peck, C.; Gold, W. M. (1992): Dog mastocytoma cells produce transforming growth factor beta 1. In: *The Journal of clinical investigation* 90 (1), S. 35–41. DOI: 10.1172/JCI115853.

Phadia (2012): Testprinzip ImmunoCAP Tryptase - Phadia - Setting the Standard - Phadia.com. Hg. v. Phadia. Online verfügbar unter <http://www.phadia.com/de/4/Produkte/Tests/ImmunoCAP-Tryptase/Testprinzip-ImmunoCAP-Tryptase/#>, zuletzt geprüft am 19.03.2018.

Polackwich AS, Shoskes DA. (2016): Chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: a review of evaluation and therapy. In: *Prostate Cancer Prostatic Diseases* (19), S. 132–138.

Potts, Jeannette; Payne, Richard E. (2007): Prostatitis. Infection, neuromuscular disorder, or pain syndrome? Proper patient classification is key. In: *Cleveland Clinic journal of medicine* 74 Suppl 3, S63-71.

Putnik, Milica; Zhao, Chunyan; Gustafsson, Jan-Åke; Dahlman-Wright (2012): Global identification of genes regulated by estrogen signaling and demethylation in MCF-7

breast cancer cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* 426 (1), S. 26–32. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.08.007.

QIAGEN (2013a): PyroMark CpG Assays - QIAGEN Online Shop. Hg. v. QIAGEN GmbH, QIAGEN-Straße 1, D-40724 Hilden, DEUTSCHLAND. Online verfügbar unter <https://www.qiagen.com/us/shop/automated-solutions/sequencers/pyromark-cpg-assays/?catno=PM00123529#geneglobe>, zuletzt aktualisiert am 2018, zuletzt geprüft am 02.04.2018.

QIAGEN (2013b): PyroMark CpG Assays - QIAGEN Online Shop. Hg. v. QIAGEN GmbH, QIAGEN-Straße 1, D-40724 Hilden, DEUTSCHLAND. Online verfügbar unter <https://www.qiagen.com/us/shop/automated-solutions/sequencers/pyromark-cpg-assays/?catno=PM00079352#geneglobe>, zuletzt aktualisiert am 2018, zuletzt geprüft am 02.04.2018.

QIAGEN (2013c): PyroMark CpG Assays - QIAGEN Online Shop. Hg. v. QIAGEN GmbH, QIAGEN-Straße 1, D-40724 Hilden, DEUTSCHLAND. Online verfügbar unter <https://www.qiagen.com/us/shop/automated-solutions/sequencers/pyromark-cpg-assays/?catno=PM00000763#geneglobe>, zuletzt aktualisiert am 2018, zuletzt geprüft am 02.04.2018.

QIAGEN (2013d): PyroMark CpG Assays - QIAGEN Online Shop. Hg. v. QIAGEN GmbH, QIAGEN-Straße 1, D-40724 Hilden, DEUTSCHLAND. Online verfügbar unter <https://www.qiagen.com/us/shop/automated-solutions/sequencers/pyromark-cpg-assays/?catno=PM00196763#geneglobe>, zuletzt aktualisiert am 2018, zuletzt geprüft am 02.04.2018.

QIAGEN GmbH, QIAGEN-Straße 1, D-40724 Hilden, DEUTSCHLAND; Smythe, Emma (Hg.): PyroMark Q24 MDx User Manual, deutsch Januar 2016.

Reik, Wolf; Dean, Wendy (2001): DNA methylation and mammalian epigenetics. In: *Electrophoresis* 22 (14), S. 2838–2843. DOI: 10.1002/1522-2683(200108)22:14<2838::AID-ELPS2838>3.0.CO;2-M.

Richard B.Alexander; Francine Brady; Sathibalan Ponniah (1997): Autoimmune prostatitis: Evidence of T cell reactivity with normal prostatic proteins. In: *Urology* Volume 50 (6), S. 893–899. DOI: 10.1016/S0090-4295(97)00456-1.

Rivera, Juan (2006): Adaptors discriminate mast-cell cytokine production from eicosanoid production and degranulation. In: *Trends in immunology* 27 (6), S. 251–253. DOI: 10.1016/j.it.2006.04.001.

Rivero, Virginia Elena; Motrich, Ruben Darío; Maccioni, Mariana; Riera, Clelia María (2007): Autoimmune etiology in chronic prostatitis syndrome. An advance in the understanding of this pathology. In: *Critical reviews in immunology* 27 (1), S. 33–46.

Robert B. Nadler; Alisa E. Koch; Elizabeth A. Calhoun; Philip L. Campbell; Densie L. Pruden; Charles L. Benett et al. (2000): IL-1 β and TNF- α in prostatic secretions are indicators in the evaluation of men with chronic prostatitis. In: *The Journal of urology* 164 (1), 214–218. DOI: 10.1016/S0022-5347(05)67497-6.

Robertson, Keith D. (2005): DNA methylation and human disease. In: *Nature reviews. Genetics* 6 (8), S. 597–610. DOI: 10.1038/nrg1655.

Rose, Aldo Franco de; Gallo, Fabrizio; Giglio, Matteo; Carmignani, Giorgio (2004): Role of mepartricin in category III chronic nonbacterial prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. A randomized prospective placebo-controlled trial. In: *Urology* 63 (1), S. 13–16. DOI: 10.1016/j.urology.2003.08.006.

Russi, Abigail E.; Walker-Caulfield, Margaret E.; Brown, Melissa A. (2018): Mast cell inflammasome activity in the meninges regulates EAE disease severity. In: *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 189, S. 14–22. DOI: 10.1016/j.clim.2016.04.009.

S J Newfeld; R G Wisotzkey; S Kumar (1999): Molecular evolution of a developmental pathway: phylogenetic analyses of transforming growth factor-beta family ligands, receptors and Smad signal transducers. In: *Genetics* 152 (2), S. 783–795.

Salari, H.; Chan-Yeung, M. (1989): Interleukin-1 potentiates antigen-mediated arachidonic acid metabolite formation in mast cells. In: *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 19 (6), S. 637–641.

Sayed, Blayne A.; Christy, Alison; Quirion, Mary R.; Brown, Melissa A. (2008): The master switch. The role of mast cells in autoimmunity and tolerance. In: *Annual review of immunology* 26, S. 705–739. DOI: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090320.

Literaturverzeichnis

Schagdarsurengin, Undraga; Paradowska, Agnieszka; Steger, Klaus (2012): Analysing the sperm epigenome. Roles in early embryogenesis and assisted reproduction. In: *Nature reviews. Urology* 9 (11), S. 609–619. DOI: 10.1038/nrurol.2012.183.

Schagdarsurengin, Undraga; Teuchert, Lisa M.; Hagenkötter, Christina; Nesheim, Nils; Dansranjav, Temuujin; Schuppe, Hans-Christian et al. (2017): Chronic Prostatitis Affects Male Reproductive Health and Is Associated with Systemic and Local Epigenetic Inactivation of C-X-C Motif Chemokine 12 Receptor C-X-C Chemokine Receptor Type 4. In: *Urologia internationalis* 98 (1), S. 89–101. DOI: 10.1159/000452251.

Schemann, Michael; Camilleri, Michael (2013): Functions and imaging of mast cell and neural axis of the gut. In: *Gastroenterology* 144 (4), 698-704.e4. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.01.040.

Scholz, Joachim; Woolf, Clifford J. (2007): The neuropathic pain triad. Neurons, immune cells and glia. In: *Nature neuroscience* 10 (11), S. 1361–1368. DOI: 10.1038/nn1992.

Secor, Virginia H.; Secor, W. Evan; Gutekunst, Claire-Anne; Brown, Melissa A. (2000): Mast Cells Are Essential for Early Onset and Severe Disease in a Murine Model of Multiple Sclerosis. In: *J Exp Med* 191 (5), S. 813–822. DOI: 10.1084/jem.191.5.813.

Shoskes, Daniel A.; Nickel, J. Curtis; Dolinga, Robert; Prots, Donna (2009): Clinical phenotyping of patients with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and correlation with symptom severity. In: *Urology* 73 (3), 538-43. DOI: 10.1016/j.urology.2008.09.074.

Smith, Christopher P. (2016): Male chronic pelvic pain. An update. In: *Indian journal of urology : IJU : journal of the Urological Society of India* 32 (1), S. 34–39. DOI: 10.4103/0970-1591.173105.

Song, Fei; Smith, Joseph F.; Kimura, Makoto T.; Morrow, Arlene D.; Matsuyama, Tomoki; Nagase, Hiroki; Held, William A. (2005): Association of tissue-specific differentially methylated regions (TDMs) with differential gene expression. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (9), S. 3336–3341. DOI: 10.1073/pnas.0408436102.

Stehlik, Christian (2009): Multiple interleukin-1beta-converting enzymes contribute to inflammatory arthritis. In: *Arthritis and rheumatism* 60 (12), S. 3524–3530. DOI: 10.1002/art.24961.

Strauss, Adam C.; Dimitrakov, Jordan D. (2010): New treatments for chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. In: *Nature reviews. Urology* 7 (3), S. 127–135. DOI: 10.1038/nrurol.2010.4.

Subach, B. R.; Haid, R. W.; Rodts, G. E.; Kaiser, M. G. (2001): Bone morphogenetic protein in spinal fusion. Overview and clinical update. In: *Neurosurgical focus* 10 (4), E3.

Subramanian, N.; Bray, M. A. (1987): Interleukin 1 releases histamine from human basophils and mast cells in vitro. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 138 (1), S. 271–275.

Szabo, S. J.; Kim, S. T.; Costa, G. L.; Zhang, X.; Fathman, C. G.; Glimcher, L. H. (2000): A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. In: *Cell* 100 (6), S. 655–669.

Tan, Yanlin; Montgomery, Scott R.; Aghdasi, Bayan G.; Inoue, Hirokazu; Kaner, Tuncay; Tian, Haijun et al. (2013): The effect of corticosteroid administration on soft-tissue inflammation associated with rhBMP-2 use in a rodent model of inflammation. In: *Spine* 38 (10), S. 806–813. DOI: 10.1097/BRS.0b013e31827eca09.

Thermo Scientific (2014): Bestimmung der Gesamttryptase. Schwere allergische Reaktionen besser einschätzen. Hg. v. Thermo Scientific. Online verfügbar unter <http://www.phadia.com/Global/Market%20Companies/Germany/Dokumentenbibliothek/Promotionsmaterial%20Allergie/ImmunoCAP%20Tryptase%2009-2014.pdf>, zuletzt aktualisiert am 8/2014, zuletzt geprüft am 20.03.2018.

Tian, Haijun; Zhao, Jie; Brochmann, Elsa J.; Wang, Jeffrey C.; Murray, Samuel S. (2017): Bone morphogenetic protein-2 and tumor growth. Diverse effects and possibilities for therapy. In: *Cytokine & growth factor reviews* 34, S. 73–91. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2017.01.002.

Tilo Biedermann; Manfred Kneilling; Reinhard Mailhammer; Konrad Maier; Christian A. Sander; George Kollias et al. (2000): Mast Cells Control Neutrophil Recruitment during T Cell–Mediated Delayed-Type Hypersensitivity Reactions through Tumor

Necrosis Factor and Macrophage Inflammatory Protein 2. In: *Journal of Experimental Medicine* 192 (10), S. 1441–1452.

Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH (2017): Prostatitis. Hg. v.

Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH. Online verfügbar unter

http://ukgm.de/ugm_2/deu/ugi_uro/3391.html, zuletzt geprüft am 21.03.2018.

Voytas, D. (2001): Agarose gel electrophoresis. In: *Current protocols in molecular biology* Chapter 2, Unit2.5A. DOI: 10.1002/0471142727.mb0205as51.

Wagenlehner, F.; Pilatz, A.; Linn, T.; Diemer, T.; Schuppe, H. C.; Schagdarsurengin, U. et al. (2013a): Prostatitis and andrological implications. In: *Minerva urologica e nefrologica = The Italian journal of urology and nephrology* 65 (2), S. 117–123.

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.; 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.

Walker, Margaret E.; Hatfield, Julianne K.; Brown, Melissa A. (2012): New insights into the role of mast cells in autoimmunity. Evidence for a common mechanism of action? In: *Biochimica et biophysica acta* 1822 (1), S. 57–65. DOI: 10.1016/j.bbadis.2011.02.009.

Wenninger K.; Heiman J.R.; Rothman I. (1996): Sickness impact of chronic nonbacterial prostatitis and its correlates. In: *J Urol* (155), 965±968.

Wesseley S.; Nimnuan C.; Sharpe M. (1999): Functional somatic syndromes: one or many? In: *Lancet* 354 (9182??), 936±939. DOI: 10.1016/S0140-6736(98)08320-2.

World Health Organization (2010): WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Hg. v. WHO. World Health Organization. Geneva. Online verfügbar unter

http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44261/9789241547789_eng.pdf;jsessionid=ED331E3CAE319A7595D3FEEEC80D4185?sequence=1, zuletzt geprüft am 02.04.2018.

Xu, G. L.; Bestor, T. H.; Bourc'his, D.; Hsieh, C. L.; Tommerup, N.; Bugge, M. et al. (1999): Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. In: *Nature* 402 (6758), S. 187–191. DOI: 10.1038/46052.

Yang, Jinyi; Ye, Lin; Jiang, Hongbo; Zhou, Jie; Hou, Xu; Deng, Xin (2004): Clinical evaluation of IL-1beta and TNF-alpha in prostatic secretions for chronic prostatitis. In: *Zhonghua nan ke xue = National journal of andrology* 10 (6), 449-50, 454.

Zingg, J. M.; Jones, P. A. (1997): Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. In: *Carcinogenesis* 18 (5), S. 869–882.

Anhang

Eine Übersicht über die wie in der Einleitung beschrieben erhobenen Daten bietet die folgende Tabelle.

Proben_ID	Tryptase_Blut	Stelle_1_BMP2	Stelle_2_BMP2	Stelle_3_BMP2	Stelle_4_BMP2	Stelle_5_BMP2	Stelle_6_BMP2	Mittelwert_BMP2	Stelle_1_BMP6	Stelle_2_BMP6	Stelle_3_BMP6	Stelle_4_BMP6	Stelle_5_BMP6	Stelle_6_BMP6	Stelle_7_BMP6	Mittelwert_BMP6	Stelle_1_BMP7	Stelle_2_BMP7	Stelle_3_BMP7	Stelle_4_BMP7	Stelle_5_BMP7	Mittelwert_BMP7
1	3,54	88	92	55	95	83	92	84,2									10	27	55	25	40	31,4
2	5,24	92	98	53	97	86	93	86,5	6	2	2	5	4	7	5	4,43	2	5	0	0	1	1,6
3	2,4	8	8	3	5	3	3	5	6	2	1	6	4	7	4	4,29	8	12	8	7	10	9
4		32	35	23	34	30	31	30,8														
5		4	6	2	4	2	2	3,33	7	1	1	7	6	7	6	5	6	11	7	6	8	7,6
7	16,1	6	8	3	5	4	4	5	6	1	1	6	5	7	6	4,57	6	11	6	6	7	7,2
9	7,44	7	8	4	6	4	4	5,5	3	2	1	3	2	4	2	2,43	7	13	11	8	7	9,2
12	5,08	22	24	12	21	18	18	19,2	11	8	6	10	9	10	10	9,14	6	23	7	5	7	9,6
13	3,25	27	27	18	26	23	23	24	3	1	1	2	2	4	2	2,14	6	11	7	5	10	7,8
14	5,17	22	22	11	20	17	17	18,2	7	4	3	7	5	7	5	5,43	5	11	8	6	9	7,8
15	2,73	100	100	47	85	84	77	82,2									2	5	1	1	1	2
16	4,38	92	96	45	90	80	87	81,7									3	23	8	18	11	12,6
18	4,8	5	7	3	6	4	4	4,83	4	2	1	3	2	4	2	2,57	7	11	9	7	9	8,6
19	27,6	90	90	36	83	67	71	72,8									13	11	44	34	32	26,8
22	4,13	94	100	46	98	84	87	84,8														
23	2,93	2	5	1	2	1	1	2	7	1	1	3	3	5	4	3,43	2	9	2	1	1	3
24	6,12	19	19	12	17	16	16	16,5	4	1	1	2	2	4	2	2,29	3	5	2	2	2	2,8
25		4	6	2	4	3	2	3,5														
26	2,87	1	4	1	2	1	1	1,67	2	1	1	1	1	3	1	1,43	2	5	1	1	1	2
27	3,27																					
33	3,69																					
38	3,67																					
39	3,04																					
42	1,86																					
45	4,5	3	6	1	3	2	1	2,67	3	1	1	3	2	4	2	2,29	6	15	16	12	17	13,2
47																						
48	3,56																					
51	4,45	3	5	1	2	1	0	2	2	1	1	2	1	3	1	1,57	7	11	14	8	9	9,8
58	7,55																					
63	6,26	2	4	0	1	1	1	1,5	2	1	1	2	1	2	1	1,43	6	12	7	7	8	8
65	5,97	2	5	1	2	1	1	2	10	0	0	0	14	10	12	6,57	6	11	8	7	9	8,2
66	2,88	2	4	1	2	1	1	1,83	2	1	1	2	1	3	1	1,57	5	12	7	7	8	7,8
67	2,66	2	4	1	2	1	1	1,83	2	1	1	2	1	3	1	1,57	7	11	8	7	8	8,2
69	2,46	2	5	1	2	1	1	2	2	0	1	1	1	2	1	1,14	5	10	7	5	9	7,2
70	6,76																					
76	0,5	2	5	0	2	1	1	1,83	2	1	1	1	0	3	1	1,29	4	10	6	5	6	6,2
80	6,86	2	4	1	2	1	1	1,83	2	1	1	1	1	3	1	1,43	4	9	6	4	7	6
82	6,37	2	4	1	2	1	1	1,83	2	1	1	1	1	3	1	1,43	5	11	6	6	10	7,6
83	4,32	2	4	1	2	1	1	1,83	2	1	1	2	1	3	1	1,57	4	11	7	6	7	7
85	5,08	3	4	1	3	1	1	2,17	2	0	1	1	0	3	1	1,14	5	10	6	5	9	7
90	5,63	3	5	1	2	1	1	2,17	4	0	0	5	5	7	7	4	6	12	8	8	8	8,4
92	5,83	3	5	1	2	1	1	2,17	8	0	0	9	9	9	10	6,43	5	14	8	7	10	8,8
93	1,11																					
95	2,32																					
98	2,64	2	5	1	2	1	1	2	3	1	1	3	3	4	3	2,57	6	11	9	7	9	8,4
99		2	4	1	2	1	1	1,83	3	1	1	3	2	4	2	2,29	6	11	7	6	8	7,6
101		3	5	1	3	1	1	2,33	3	1	1	3	2	5	4	2,71	7	12	9	8	11	9,4
104	3,05	2	4	1	2	1	1	1,83	2	0	0	1	1	3	1	1,14	4	9	6	6	8	6,6
105	3,23																					
109	16,2																					
110	5,08																					

Anhang

112	4,69	3	6	1	3	1	1	2,5	5	0	0	5	4	6	5	3,57	5	12	9	6	11	8,6
114	4,16																					
118	9,26																					
120	6,49																					
126	4,2	2	4	1	3	1	1	2	2	0	1	1	1	3	1	1,29	6	10	5	5	7	6,6
131	9,07																					
135	3,27								3	1	0	2	2	4	2	2	6	11	7	6	9	7,8
145	3,91	4	5	1	3	1	1	2,5	2	1	0	1	1	3	1	1,29	5	11	6	5	8	7
147	2,14	3	5	1	3	1	1	2,33	2	0	1	1	1	3	1	1,29	4	9	6	6	7	6,4
151	2,86	3	6	1	3	1	1	2,5	4	0	0	5	4	6	5	3,43	6	17	9	8	13	10,6
153	6,63	4	6	2	3	2	2	3,17	2	1	1	1	1	3	1	1,43	5	10	6	5	7	6,6
155	5,02	3	5	1	3	1	1	2,33	2	1	0	1	1	3	1	1,29	5	10	12	5	8	8
159	4,29	3	5	1	2	1	1	2,17	3	1	1	3	2	5	3	2,57	6	10	8	8	8	8
167	2,18	5	8	2	4	2	2	3,83	3	1	1	4	3	5	4	3	7	12	10	8	11	9,6
168	1,46	2	5	1	2	1	1	2	2	1	1	1	1	3	1	1,43	6	12	2	2	0	4,4
169	6,89	2	3	0	1	1	1	1,33	3	1	1	2	1	4	1	1,86	5	11	2	0	0	3,6
170	3,25																					
182	3,03	3	4	1	2	1	1	2	3	2	0	3	3	5	4	2,86	7	9	9	8	14	9,4
184		2	4	1	2	1	1	1,83	2	1	1	2	1	3	1	1,57	8	15	2	0	0	5
185									2	1	1	2	1	3	2	1,71	8	14	2	0	0	4,8
186		2	4	1	2	1	1	1,83														
187	8,82								2	0	0	1	0	3	1	1	7	14	3	0	0	4,8
193	3,06	3	6	1	3	1	1	2,5	4	0	0	4	3	5	4	2,86	7	11	7	6	8	7,8
194	2,83	2	5	1	3	2	1	2,33	2	0	1	2	1	3	1	1,43	9	11	2	2	0	4,8
210		2	4	1	3	1	1	2	2	1	1	1	1	2	1	1,29	7	13	3	2	0	5
211	3,08								2	1	1	1	0	3	1	1,29	7	12	2	1	0	4,4
212	6,27								3	1	1	1	1	2	1	1,43	6	13	2	2	0	4,6
213	4,36																					
214	3,39								2	1	1	1	1	2	1	1,29	3	5	1	1	1	2,2
217	7,43	1	4	0	1	0	0	1	2	1	1	1	1	2	1	1,29	5	7	3	3	0	3,6
218	6,15	1	4	0	1	0	1	1,17	2	1	0	1	1	3	1	1,29	5	6	3	0	0	2,8
219	4,02								2	1	1	1	2	2	1	1,43	5	7	3	3	0	3,6
g1	3,02	4	6	1	2	1	1	2,5	3	1	1	2	1	4	2	2	4	12	5	3	7	6,2
g2	2,98	2	4	1	2	1	1	1,83	3	1	1	2	1	4	1	1,86	5	9	7	5	7	6,6
g3	3,86	6	9	3	5	4	4	5,17	3	0	1	2	1	5	2	2	7	10	7	6	10	8
g4	4,53	4	7	2	3	1	1	3	3	1	1	2	1	4	1	1,86	5	7	7	4	5	5,6
g5	5,48	3	6	2	3	1	1	2,67	4	1	1	2	1	4	2	2,14	5	9	6	6	8	6,8
g7	2,97	2	4	0	2	1	1	1,67	3	1	1	2	1	5	1	2	5	10	10	5	6	7,2
g9	2,6	2	5	1	2	1	1	2	2	1	1	2	1	4	1	1,71	5	9	4	4	6	5,6
g10	2,88	3	5	1	3	1	1	2,33	3	1	0	2	1	4	1	1,71	6	10	8	6	9	7,8
g11	4,81	2	4	1	2	1	1	1,83	2	1	1	2	1	4	1	1,71	4	10	6	5	8	6,6
g13	3,91	3	5	1	3	1	1	2,33	3	1	1	2	1	3	1	1,71	5	12	8	5	7	7,4
g14	3,87	2	6	0	1	0	0	1,5	3	1	1	3	0	4	1	1,86	4	11	3	6	5	5,8
g15	2,68	3	6	1	4	1	1	2,67	3	1	1	2	1	3	1	1,71	6	11	8	5	5	7
g16	2,8	8	10	5	7	6	6	7	4	1	1	2	1	4	2	2,14	4	11	4	3	6	5,6
g18	3,65	3	5	1	2	1	1	2,17	3	1	1	2	1	3	1	1,71	4	10	7	4	9	6,8
g19	3,84	2	4	1	2	1	1	1,83	3	1	1	1	1	3	1	1,57	4	11	7	6	6	6,8
g20	5,34	3	5	1	2	1	1	2,17	4	1	1	2	1	3	1	1,86	5	7	7	4	4	5,4
g22	3,89	2	6	1	2	1	1	2,17	5	1	1	2	0	5	1	2,14	4	11	6	6	7	6,8
g23	4,45	3	5	1	3	1	1	2,33	3	1	1	2	1	3	1	1,71	5	10	6	5	7	6,6
g24	3,41	3	5	1	2	1	1	2,17	3	1	1	2	1	3	1	1,71	5	12	6	6	8	7,4
g25	2,28	3	5	1	3	1	1	2,33	3	1	1	2	1	3	1	1,71	8	10	8	6	9	8,2
g26	2,84																					
g27	4,09	3	5	1	2	1	1	2,17	4	1	1	2	1	3	2	2	6	12	7	6	7	7,6
g28	4,74	2	5	1	1	1	1	1,83	2	1	1	2	1	3	2	1,71	4	10	7	5	7	6,6
g30	5,74	2	5	1	3	1	1	2,17	2	1	1	3	2	3	3	2,14	4	12	5	6	7	6,8
g31	5,69	2	4	0	2	1	1	1,67	2	0	0	2	0	4	3	1,57	5	11	6	6	7	7
g32	13,1	2	4	0	2	1	1	1,67	2	0	0	3	2	4	4	2,14	4	10	6	5	6	6,2

Anhang

g34	30,6	3	5	1	3	1	1	2,33	2	0	1	2	2	4	4	2,14	6	12	8	6	10	8,4
g35	11,4	2	4	1	2	1	1	1,83	3	1	1	3	2	3	3	2,29	9	11	3	2	2	5,4
g37	9,47	2	4	1	2	0	1	1,67	2	1	1	2	1	3	2	1,71	8	9	7	4	7	7
g38	5,27	2	4	1	2	1	1	1,83	2	1	1	2	1	3	2	1,71	5	11	9	6	8	7,8
g40	13,3	2	4	1	2	1	1	1,83	3	1	1	3	2	3	3	2,29	4	10	7	5	7	6,6
g41	3,58	2	4	0	3	0	0	1,5	3	1	1	3	2	3	3	2,29	5	13	6	4	8	7,2
g43	12,1	2	5	1	2	1	1	2	3	1	1	3	2	4	3	2,43	5	11	5	3	4	5,6
g45	4,7	3	5	1	2	1	1	2,17	2	1	1	2	1	3	3	1,86	5	10	4	4	7	6
g46	2,98	2	4	1	2	1	1	1,83	3	0	1	3	2	4	4	2,43	4	11	7	5	7	6,8
g47	3,99	2	4	0	1	0	0	1,17	2	1	1	3	2	3	3	2,14	5	10	7	6	5	6,6
g48	4,11	2	4	1	2	1	1	1,83	3	1	1	3	1	3	2	2	4	10	8	4	6	6,4
g49	3,51	3	6	1	3	1	1	2,5	3	1	1	2	1	3	2	1,86	5	9	7	7	11	7,8
g50	2,97	3	5	0	3	1	1	2,17	4	1	1	3	1	3	3	2,29	5	13	9	7	9	8,6
g51	5,29	3	5	1	3	1	1	2,33	3	1	1	3	1	3	2	2	5	10	5	4	7	6,2
LNCAP		7	7	3	4	2	2	4,17	4	2	2	4	2	5	5	3,43	8	16	33	31	34	24,4
PC3		35	29	11	18	7	6	17,7	17	9	10	38	14	29	28	20,7	11	29	15	16	27	19,6
Dn145		31	32	22	29	8	8	21,7	3	3	2	7	2	12	18	6,71	9	15	12	10	25	14,2
Hmc-1 non t		95	99	69	98	86	87	89	7	1	1	4	3	4	3	3,29	13	23	47	27	35	29
HMC1_0,1_E		97	100	67	100	84	85	88,8	3	1	1	2	1	3	1	1,71	21	24	48	28	30	30,2
HMC1_1_Es		96	100	65	98	81	83	87,2	2	1	1	2	2	3	2	1,86	16	23	47	29	29	28,8
HMC1_10_E		95	100	70	100	82	84	88,5	3	0	0	2	2	3	2	1,71	16	24	49	28	33	30
HMC1_100_E		95	100	56	100	76	79	84,3	3	1	1	2	1	3	2	1,86	14	25	48	29	27	28,6
HMC1_0,1_E		97	96	74	99	88	88	90,3	2	1	1	1	1	3	1	1,43	15	23	49	27	32	29,2
HMC1_1_Et		95	100	57	100	75	81	84,7	2	1	1	2	1	3	1	1,57	15	23	46	26	28	27,6
HMC1_10_E		95	100	68	100	81	80	87,3	2	1	1	1	1	2	1	1,29	16	24	48	28	38	30,8
HMC1_100_E		96	100	72	99	85	84	89,3	2	1	1	1	1	2	1	1,29	16	23	48	26	29	28,4
LAD2_non_t		98	99	54	98	88	88	87,5	3	1	1	2	1	3	2	1,86	4	6	1	2	4	3,4
LAD2_0,1_E		98	98	54	100	87	87	87,3	3	2	1	2	2	4	2	2,29	5	7	4	4	5	5
LAD2_1_Est		98	99	54	99	87	86	87,2	3	1	1	2	1	3	2	1,86	5	6	2	2	4	3,8

LAD2_10_Es	96	97	50	100	81	78	83,7	2	2	1	2	2	4	2	2,14	4	6	3	3	4	4
LAD2_100_E	98	97	54	98	87	87	86,8	3	1	1	2	1	3	2	1,86	6	8	5	6	6	6,2
LAD2_0,1_E	96	98	56	99	88	87	87,3	2	1	1	2	1	3	2	1,71	4	6	3	3	4	4
LAD2_1_Eth	96	100	41	100	75	77	81,5	3	1	1	2	2	3	2	2	9	12	7	6	9	8,6
LAD2_10_Et	95	97	53	98	86	86	85,8	3	1	1	2	1	3	1	1,71	4	6	2	2	3	3,4
LAD2_100_E	96	96	53	98	85	81	84,8	2	1	1	2	1	3	2	1,71	4	7	3	3	5	4,4

Proben_ID2	Stelle_1_TGFB2	Stelle_2_TGFB2	Stelle_3_TGFB2	Stelle_4_TGFB2	Stelle_5_TGFB2	Stelle_6_TGFB2	Mittelwert_TGFB2	Alter_Untersuch	Diagnose_codiert	Eosintest	Peroxidasetest	Leukozyten	Elastase	IL_8	CRP	PSA	Testosteron	Östradiol	CPSI_Schmerzen	Angstwert	Depressionswert
1								45	2						2,6	0,43	528		14		
2								32	2		0,1	1,1	41		0,25	0,69	274		13		
3	2	3	1	2	1	2	1,83	55	2						0,25	0,37	587	24	14		
4								39	2		0		151	####	2,03	0,99	478		16	19	6
5	2	2	1	1	2	0	1,33	38	2		0,2	0,2	142	4611	0,52	0,48	638		17	14	4
7	4	2	2	1	1	1	1,83	26	2	93	0		5	2135	0,25	0,38	293	23	14		
9	3	1	0	1	1	1	1,17	42	2	65	0,2		44	7009	0,25	0,31	230	17	12	5	3
12	2	2	1	1	1	1	1,33	40	2		0		5.0	2079	2,18	0,27	226	27	6	5	0
13	4	2	2	0	1	2	1,83	50	2	69	0,1	0,03	71	3812	0,25		282	41	11		
14	3	3	1	3	2	2	2,33	76	2						0,25	1,44	348	31	9		
15	2	2	1	2	2	0	1,5	44	2		0,3	0,6	66	2716	0,25		445		8		
16								61	1	84	1,2		271	6621	1,16	0,72	326	28	10	5	8
18	3	2	2	2	2	2	2,17	45	2						1,95	0,97	312	38	12		
19								61	2	30	0		14	####	1,13	0,45	700		9	11	7
22								32	2		0,1		369	6298	0,25	0,44	682		10		
23								35	2	88	0,2		56	6237	9,51	0,66	437		15		
24	2	2	1	2	1	1	1,5	23	2	83	0,3		5.0	2205	1,31	0,48	471		12	2	2
25								44	3		0,6	0,3	289	####	0,57	0,58			0		
26	1	2	1	1	1	1	1,17	47	2		0,8	1,4	67	9385	1,21	0,61	342		3	12	8
27								22	2		0		5.0	448	0,75	0,57	426	39	11	6	4
33								43	2		0	0,34	13	1963	0,25	0,97	335	26	16		
38								29	2		0,3	3,2			0,6	0,74	277	31	14	8	8

Anhang

39								76	1						0,8	1,15	550	44	13			
42								65	1	71	0,4	5,2	47	9,76	4,77	2,2	714	38	11	1	3	
45								30	2				5,0	1296	0,56	0,24	267	34	3			
47								52	1						0,78	0,65	635	42	4			
48								46	2	77	1	4,9	640	6277	0,25	0,33	542	35	16	11	7	
51	3	3	2	2	1	2	2,17	47	1						0,25	2,37	501		1	6	10	
58								56	1		1,2		103	664	2,49	0,26	682	32	11			
63	4	5	0	0	3	0	2	52	3	75	0		480		1,96	1,87	426	31	14	10	12	
65	2	2	1	1	1	1	1,33	25	2		0,2	0,5	73	7356	0,25	1,2	565	33	8	4	3	
66	4	6	2	3	0	2	2,83	43	4		0		5,0	3428	0,25	1,6	355	22	13	6	3	
67	2	2	1	1	1	1	1,33	61	2		0,1				0,25	1,02	147	6	12	7	5	
69	3	2	1	1	1	1	1,5	49	2		0,2		299	7735	4,03	0,65	395	25	4	8	4	
70								48	4						6,4	1,09	376	33	18			
76	2	2	1	1	1	1	1,33	40	2	62	0,7		585	8387	1,22	1,93		6	5	3	6	
80	2	2	0	0	1	0	0,83	44	2		0,2		25	19,5	1,46		437	29	13			
82	2	5	2	3	1	6	3,17	61	2		0,1		25	19,5	9,25	1,48	274	37	14	1	4	
83	2	5	2	2	1	1	2,17	27	2	28	0,3		57	####	0,25	0,85	321		7	0	0	
85	3	2	2	1	1	1	1,67	44	2		0,3		248	####	0,25	0,56	395	34	11	8	15	
90	1	2	1	0	0	0	0,67	28	2		0,5	1	105	3579	0,25	0,57	611	40	16			
92								29	3		0		77	####	5,4	0,3	502	33	20			
93								31	2		0,1		16	1419	0,25	0,59	472					
95								23	3		0,5	1,2	1060	####	0,56	1,79			0			
98	2	2	1	1	1	1	1,33	26	1	78	4,3	1	622	####	0,25	1,36	395		13			
99	4	2	1	1	1	1	1,67	23	2	74	0,2		10	1647	0,25	0,74	509		13	12	14	
101	2	2	1	1	1	1	1,33	35	2		0,3	0,8	71	4138	0,25	0,61	341		12	7	9	
104	2	2	1	1	1	1	1,33	54	3		0		1276	####	0,93	151	430		8			
105								63	1		0		11	6565					16			
109								59	1						4,02	0,36	261		13			
110								56	4		0,3		350	####	0,25	3,35	198		11			
112	3	3	0	1	1	1	1,5	32	2		0,1		82		1,57	0,67	761		4	2	1	
114								47	2		0,1		29	2528	0,73	2,02	419		10			
118								47	1	53	0,4	0,02	2000	6215	6,92	5,28	303		4	8	7	
120								50	2		0		23	1561	0,25	0,54	705					
126	2	2	1	1	1	1	1,33	64	2						0,25	2,23	570		9			
131								17	3		0,2	1,4	282	####	0,25	2,6	821	37	13	4	6	
135	3	2	0	0	2	1	1,33	42	2		0		22	4,92	0,7	0,42	308		17	3	2	
145	3	2	0	1	0	0	1	36	2						1,59	0,32	688					
147	3	2	1	1	0	2	1,5	45	2	55	0,7	0,2	291	6259	0,73	5,53	360		8	3	5	
151								34	2		0,3	0,4	5	1311	0,5	0,45	569		6	10	11	
153	2	2	0	0	0	0	0,67	45	2		0,2	0,19	5	2,24	3,62	0,38	474		14	4	5	
155	3	3	2	2	2	1	2,17	50	3		0,1		471	8376	5,29	5,74	269		4	3	3	
159								34	2		0,1		13	2129	0,89	1,63	569		14	11	7	
167	3	2	2	2	2	1	2	39	2		0,1		16	1295	0,25	0,39	431		16	17	12	
168	2	1	1	1	1	0	1	43	2	57	0		5	876	0,25	0,6	263		10	7	9	
169	3	2	2	2	0	1	1,67	42	2	50	0,3	1,5			1,13	0,67	546		15	3	5	
170								33	2		6,1		1907	####	1,51	1,68	559		3	10	6	
182	6	4	3	3	0	2	3	27	2		0,1		5	1351	2,58	1,13	388		8	8	15	
184	2	0	0	0	0	0	0,33	25	1		0		99	3820	3,64	0,12	539		14	8	4	
185	0	3	0	4	0	0	1,17	65	2		0		5	2778	1,35	1,34	540		11	9	10	
186								30	2		0		15	1839	0,25	0,81	594		10	4	5	
187	1	2	0	1	0	0	0,67	32	2		0,1		5	1588	0,89				10	7	0	
193	2	2	1	1	1	1	1,33	22	3		1,2	18	1410	####	0,71	1,05	681		11	6	4	
194								44	2		0,1		1024	4881	2,26	1	511					
210	2	1	1	2	1	1	1,33	25	2	82	0,1		5	583	0,25	0,74	547		9			
211	3	2	0	1	0	1	1,17	53	2	73	0		19	2130	0,25	1,13	265		16	13	6	
212	2	1	1	2	1	1	1,33	56	2	58	1,2	1,4	37	####	1,9	0,52	256		18	5	0	
213								50	3	85	0,1		19	4637	1,77	11	326		10	11	9	
214	2	1	1	0	1	0	0,83	51	2	0	0		25	3278	0,25	66	243		9	11	9	

Anhang

217								48	2	0,2			246		0,25	0,61	310	15	14	8
218	1	1	1	1	1	1	1	44	2	68	2		10	1549	0,25	0,8	278	16	12	12
219								50	2	79	0,5		274	####	0,25	0,67	469	20	14	11
g1	2	2	1	1	1	2	1,5	27	0	93	0	0						0		
g2	2	2	1	1	2	2	1,67	26	0	84	0,2	0						0		
g3	3	2	1	1	2	2	1,83	23	0	92	0	0						0		
g4	2	2	0	0	2	3	1,5	29	0	90	0	0						0		
g5	2	2	1	2	1	3	1,83	26	0	87	0,1	0						0		
g7	2	2	1	1	2	3	1,83	23	0	79	0,2	0						0		
g9	2	2	1	1	2	2	1,67	22	0	67	0,2	0						0		
g10	1	1	1	1	1	2	1,17	25	0	70	0	0						0		
g11	1	2	1	1	1	2	1,33	25	0	93	0	0						0		
g13	2	2	1	1	1	2	1,5	25	0	90	1	1,8						0		
g14	2	1	0	1	2	4	1,67	31	0	87	0,1	0						0		
g15	2	2	0	1	1	2	1,33	24	0	80	0	0						0		
g16	2	1	0	0	3	4	1,67	25	0	87	0,1	0						0		
g18	2	2	0	1	1	2	1,33	32	0	75	0,5	0,74						0		
g19	1	1	1	1	1	2	1,17	24	0	84	0,4	0						0		
g20	2	2	1	1	2	3	1,83	21	0	90	0	0						0		
g22	2	1	0	2	1	3	1,5	19	0	82	1,4	0,11						0		
g23	2	2	1	1	1	2	1,5	31	0	84	0,6	0						0		
g24	1	1	0	1	2	3	1,33	20	0	81	0,2	0						0		
g25	2	2	1	1	2	3	1,83	22	0	90	0,3	0						0		
g26								29	0	90	0	0						0		
g27	2	2	2	2	2	1	1,83	25	0	86	0	0						0	2	0
g28	2	2	1	1	1	1	1,33	24	0	77	0	0						0	9	3
g30	2	2	1	2	1	1	1,5	28	0	92	0,1	0						0	2	0
g31	1	2	0	0	0	0	0,5	27	0	70	0,2	0						0	6	4
g32	2	2	2	2	1	1	1,67	32	0	73	0	0						0	6	0
g34	3	2	1	2	2	1	1,83	30	0	47	0,2	0						0	0	0
g35	2	1	1	1	1	1	1,17	23	0	61	0,5	0						0	3	3
g37	1	1	1	1	1	1	1	24	0	81	0	0						0	6	2
g38	1	2	1	1	1	1	1,17	29	0	78	0	0						0		
g40	1	2	1	1	1	1	1,17	22	0	93	0	0						1	5	0
g41	2	2	1	1	0	1	1,17	28	0	83	0	0						0	5	8
g43	2	2	2	2	1	1	1,67	28	0	84	0	0						0	9	8
g45	3	3	2	2	1	2	2,17	26	0	85	0	0						0	2	3
g46	2	2	2	2	1	1	1,67	26	0	85	0	0						0	2	1
g47	2	1	1	1	1	0	1	22	0	92	0	0						0	2	0
g48	2	1	1	1	0	1	1	20	0	89	0,2	1,67						0	3	0
g49	2	2	2	2	2	2	2	26	0	87	0	0						10	5	4
g50	2	2	1	1	1	1	1,33	25	0	81	0,2	0						0	5	2
g51	3	2	2	3	3	2	2,5	23	0	77	0	0						0	6	1
LNCAI	85	75	54	45	56	57	62		5											
PC3	5	5	3	3	3	3	3,67		6											
Dn14	2	1	1	1	1	1	1,17		7											
Hmc-	91	91	88	97	90	88	90,8		10											
HMC1	88	83	87	98	85	86	87,8		11											
HMC1	91	89	92	100	91	88	91,8		12											
HMC1	87	84	88	94	88	84	87,5		13											
HMC1	91	91	92	100	92	89	92,5		14											
HMC1	86	89	91	91	90	90	89,5		15											
HMC1	92	89	91	99	90	86	91,2		16											
HMC1	90	91	92	100	90	88	91,8		17											
HMC1	94	90	91	96	92	87	91,7		18											
LAD2_	8	8	2	3	3	2	4,33		20											
LAD2_	7	6	3	3	2	2	3,83		21											
LAD2_	7	7	3	4	3	2	4,33		22											
LAD2_	17	13	12	11	11	11	12,5		23											
LAD2_	7	7	3	3	2	2	4		24											
LAD2_	10	7	3	4	4	4	5,33		25											
LAD2_	8	9	4	6	2	4	5,5		26											
LAD2_	7	7	3	3	2	2	4		27											
LAD2_	8	8	3	3	3	2	4,5		28											

Anhang

Folgende Abbildungen zeigen die ersten beiden Seiten eines Pyrogrammes.

CpG Full Report

Run Info

Run Name	110116_TGFB2_Liste3_P5_EDTA_013
Operator	UNI-GIESSEN\sd8577
Run Date/Time	1/11/2016 8:45:31 PM
Instrument Name	PyroMark Q24
Serial Number	001601
Instrument Method	PyroMark Q24 Method 013
Plate ID	
Barcode	
Reagent ID	
Run Note	110116_TGFB2_P5_Liste3_EDTA_013

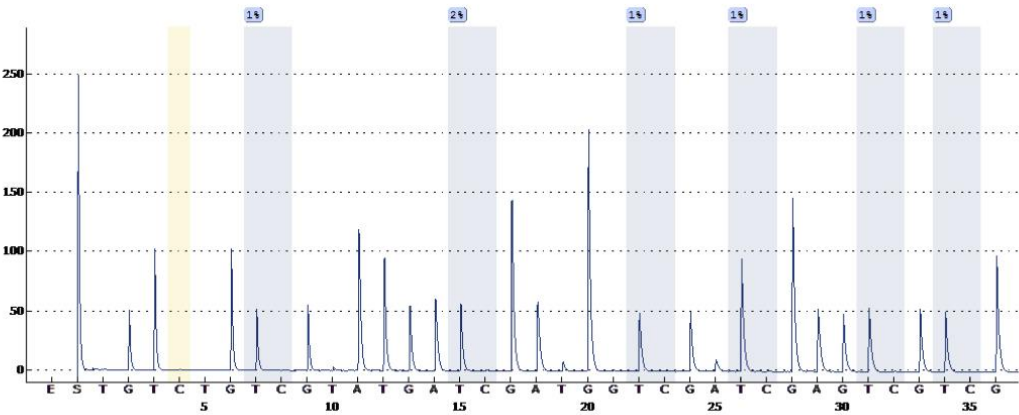
Run Log

Analysis Parameters

Analysis parameters have been edited in the following wells: A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8.

Analysis result

Well: A1
Assay: Hs_TGFB2_01_PM_Q24
Sample ID: 26
Note:
Analysis version: 2.0.6
Analysis parameters have been edited.

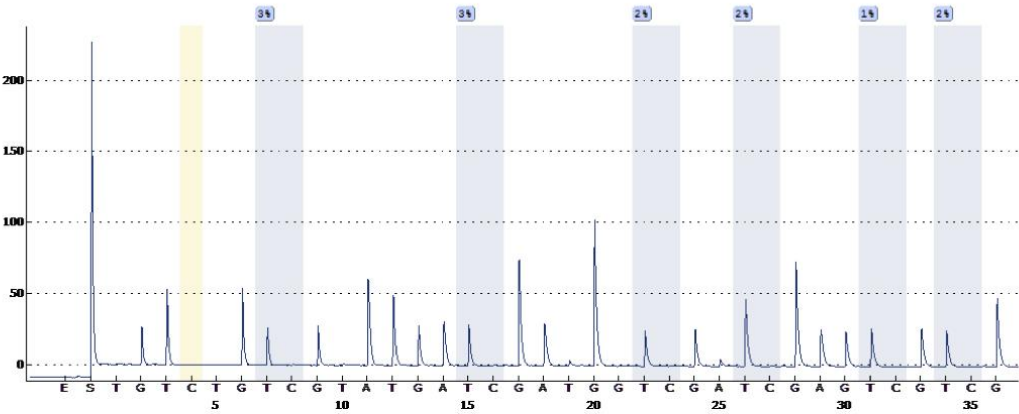


Sequence to analyze:
GTTGGYGAATTGAYGGGAGGGYGTGGGAGYGYGGT

Position	1	2	3	4	5	6
Quality	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed
Meth (%)	1	2	1	1	1	1

No warnings.

Well: A2
Assay: Hs_TGFB2_01_PM_Q24
Sample ID: 51
Note:
Analysis version: 2.0.6
Analysis parameters have been edited.



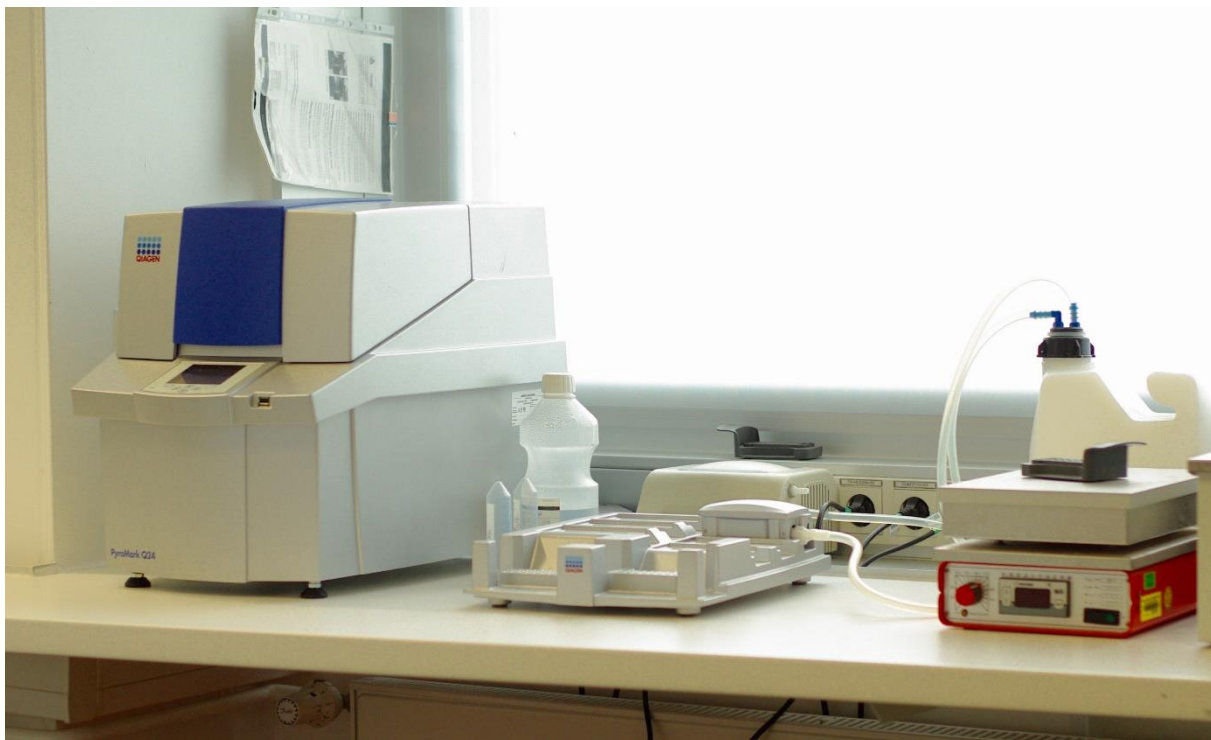
Sequence to analyze:

Anhang

Das folgende Photo zeigt den Phadia 250:



Das folgende Photo zeigt den Arbeitsplatz am Pyrosequenziergerät.



Anhang

Zur Auswertung in SPSS 25, IBM wurde nachfolgende Synthax verwendet.

* Encoding: UTF-8.

Code hierfür + Man whitney U Tryptase+ Korrelation Tryptase und Alter

* Encoding: UTF-8.

*****Get the File

GET DATA

/TYPE=XLSX

/FILE=

'/Users/Bert/Desktop/Auswertung_fertig_03_04_18_TRYPTASE_METHYLIER
UNGEN_P5

_BMP2_6_7_TGFB2_Version'+

'_1_aktuell.xlsx'

/SHEET=name 'Blatt1'

/CELLRANGE=FULL

/READNAMES=ON

/DATATYPEMIN PERCENTAGE=95.0

/HIDDEN IGNORE=YES.

EXECUTE.

DATASET NAME DataSet2 WINDOW=FRONT.

chose only people* no cell lines

Anhang

USE ALL.

COMPUTE filter_\$=(Zustand <= 4).

VARIABLE LABELS filter_\$ '#39;Zustand <= 4 (FILTER)';.

VALUE LABELS filter_\$ 0 '#39;Not Selected'; 1 '#39;Selected';.

FORMATS filter_\$ (f1.0).

FILTER BY filter_\$.

EXECUTE.

***Alter Explorativ

DATASET ACTIVATE DataSet1.

EXAMINE VARIABLES=Alter_Untersuch BY Zustand Diagnose_codiert

/PLOT BOXPLOT STEMLEAF HISTOGRAM NPLOT

/COMPARE GROUPS

/STATISTICS DESCRIPTIVES

/CINTERVAL 95

/MISSING LISTWISE

/NOTOTAL.

Tryptase explorativ

DATASET ACTIVATE DataSet1.

EXAMINE VARIABLES=Tryptase_Blut BY Zustand Diagnose_codiert

/PLOT BOXPLOT STEMLEAF HISTOGRAM NPLOT

Anhang

/COMPARE GROUPS

/STATISTICS DESCRIPTIVES

/CINTERVAL 95

/MISSING LISTWISE

/NOTOTAL.

****Man Whitney U Tryptase**** Gesund vs Krank**

NPAR TESTS

/M-W= Tryptase_Blut BY Zustand(1 0)

/MISSING ANALYSIS.

*****Man Whitney U Tryptase**** Gesund vs CPPS3a**

NPAR TESTS

/M-W= Tryptase_Blut BY Diagnose_codiert(0 1)

/MISSING ANALYSIS.

****Man Whitney U Tryptase**** Gesund vs CPPS3b**

NPAR TESTS

/M-W= Tryptase_Blut BY Diagnose_codiert(0 2)

/MISSING ANALYSIS.

****Man Whitney U Tryptase**** CPPS3b vs CPPS3a**

Anhang

NPART TESTS

/M-W= Tryptase_Blut BY Diagnose_codiert(1 2)

/MISSING ANALYSIS.

****Korrelieren Tryptase und Alter?****

NONPAR CORR

/VARIABLES=Tryptase_Blut Alter_Untersuch

/PRINT=SPEARMAN TWOTAIL NOSIG

/MISSING=PAIRWISE.

Korrelation zw Alter und Tryptase bei allen?

NONPAR CORR

/VARIABLES=Tryptase_Blut Alter_Untersuch

/PRINT=SPEARMAN TWOTAIL NOSIG

/MISSING=PAIRWISE.

GRAPH

/SCATTERPLOT(BIVAR)=Tryptase_Blut WITH Alter_Untersuchung

/MISSING=LISTWISE.

Anhang

Korrelation zw Alter und Tryptase bei Gesunden?

USE ALL.

COMPUTE filter_\$=(Zustand = 0).

VARIABLE LABELS filter_\$ 'Zustand = 1 (FILTER)'.

VALUE LABELS filter_\$ 0 'Not Selected' 1 'Selected'.

FORMATS filter_\$ (f1.0).

FILTER BY filter_\$.

EXECUTE.

NONPAR CORR

/VARIABLES=Tryptase_Blut Alter_Untersuch

/PRINT=SPEARMAN TWOTAIL NOSIG

/MISSING=PAIRWISE.

GRAPH

/SCATTERPLOT(BIVAR)=Tryptase_Blut WITH Alter_Untersuchung

/MISSING=LISTWISE.

Korrelation zw Alter und Tryptase bei Kranken?

USE ALL.

COMPUTE filter_\$=(Zustand = 1).

VARIABLE LABELS filter_\$ 'Zustand = 1 (FILTER)'.

Anhang

VALUE LABELS filter_\$ 0 'Not Selected' 1 'Selected'.

FORMATS filter_\$ (f1.0).

FILTER BY filter_\$.

EXECUTE.

NONPAR CORR

/VARIABLES=Tryptase_Blut Alter_Untersuch

/PRINT=SPEARMAN TWOTAIL NOSIG

/MISSING=PAIRWISE.

GRAPH

/SCATTERPLOT(BIVAR)=Tryptase_Blut WITH Alter_Untersuchung

/MISSING=LISTWISE.

****Filter nur Kranke belassen ****

Korrelation zw IL8 und Tryptase bei Kranken?

NONPAR CORR

/VARIABLES=Tryptase_Blut IL_8

/PRINT=SPEARMAN TWOTAIL NOSIG

/MISSING=PAIRWISE.

Anhang

GRAPH

/SCATTERPLOT(BIVAR)=Tryptase_Blut WITH Il_8

/MISSING=LISTWISE.

Korrelation zw CRP und Tryptase bei Kranken?

NONPAR CORR

/VARIABLES=Tryptase_Blut CRP

/PRINT=SPEARMAN TWOTAIL NOSIG

/MISSING=PAIRWISE.

GRAPH

/SCATTERPLOT(BIVAR)=Tryptase_Blut WITH CRP

/MISSING=LISTWISE.

Korrelation zw PSA und Tryptase bei allen?

NONPAR CORR

/VARIABLES=Tryptase_Blut PSA

/PRINT=SPEARMAN TWOTAIL NOSIG

/MISSING=PAIRWISE.

Anhang

GRAPH

/SCATTERPLOT(BIVAR)=Tryptase_Blut WITH PSA

/MISSING=LISTWISE.

Korrelation zw Testosteron und Tryptase bei allen?

NONPAR CORR

/VARIABLES=Tryptase_Blut Testosteron

/PRINT=SPEARMAN TWOTAIL NOSIG

/MISSING=PAIRWISE.

GRAPH

/SCATTERPLOT(BIVAR)=Tryptase_Blut WITH Testosteron

/MISSING=LISTWISE.

Korrelation zw Östradiol und Tryptase bei allen?

NONPAR CORR

/VARIABLES=Tryptase_Blut Östradiol

/PRINT=SPEARMAN TWOTAIL NOSIG

/MISSING=PAIRWISE.

GRAPH

/SCATTERPLOT(BIVAR)=Tryptase_Blut WITH Östradiol

Anhang

```
/MISSING=LISTWISE.
```

Synthax Analyse Methylierungen

```
DATASET ACTIVATE DataSet1.
```

```
EXAMINE VARIABLES=Alter_Untersuch Mittelert_BMP2 BMP2_Mediane  
Mittelwert_BMP6 BMP6_Mediane
```

```
    BMP7_Mediane Mittelwert_BMP7 Mittelwert_TGFB2 Mediane_TGFb BY Zustand  
Simple_cohort Diagnose
```

```
/PLOT BOXPLOT STEMLEAF
```

```
/COMPARE GROUPS
```

```
/STATISTICS DESCRIPTIVES
```

```
/CINTERVAL 95
```

```
/MISSING LISTWISE
```

```
/NOTOTAL.
```

```
**korrelation alter und Mittel BMP2***
```

```
NONPAR CORR
```

```
/VARIABLES=Mittelert_BMP2 Alter_Untersuch
```

```
/PRINT=SPEARMAN TWOTAIL NOSIG
```

```
/MISSING=PAIRWISE.
```

Anhang

Ausschluss von 11 Patientennicht im code enthalten

erneute explorative untersuchung*****

DATASET ACTIVATE DataSet1.

EXAMINE VARIABLES=Alter_Untersuch Mittelwert_BMP2 BMP2_Mediane
Mittelwert_BMP6 BMP6_Mediane

BMP7_Mediane Mittelwert_BMP7 Mittelwert_TGFB2 Mediane_TGFb BY Zustand
Simple_cohort Diagnose

/PLOT BOXPLOT STEMLEAF

/COMPARE GROUPS

/STATISTICS DESCRIPTIVES

/CINTERVAL 95

/MISSING LISTWISE

/NOTOTAL.

****Man Whitney U test**** Gesund Krank

NPAR TESTS

/M-W= Mittelwert_BMP2 BY Zustand(1 0)

/MISSING ANALYSIS.

NPAR TESTS

/M-W= Mittelwert_BMP6 BY Zustand(1 0)

/MISSING ANALYSIS.

NPAR TESTS

/M-W= Mittelwert_BMP7 BY Zustand(1 0)

Anhang

/MISSING ANALYSIS.

NPAR TESTS

/M-W= Mittelwert_TGFB2 BY Zustand(1 0)

/MISSING ANALYSIS.

****man w u test CPPS gesund

NPAR TESTS

/M-W= Mittelwert_BMP2 Mittelwert_BMP6 Mittelwert_BMP7 Mittelwert_TGFB2 BY
Simple_cohort(1 0)

/MISSING ANALYSIS.

****man w u test CPPS mediane gesund mediane****

NPAR TESTS

/M-W= BMP2_Mediane BMP6_Mediane BMP7_Mediane Mediane_TGFB BY
Simple_cohort(1 0)

/MISSING ANALYSIS.

****Exploration einzelstellen****

EXAMINE VARIABLES=Stelle_1_BMP2 Stelle_2_BMP2 Stelle_3_BMP2
Stelle_4_BMP2 Stelle_5_BMP2

Stelle_6_BMP2 Stelle_1_BMP6 Stelle_2_BMP6 Stelle_3_BMP6 Stelle_4_BMP6
Stelle_5_BMP6 Stelle_6_BMP6

Anhang

Stelle_7_BMP6 Stelle_1_BMP7 Stelle_2_BMP7 Stelle_3_BMP7 Stelle_4_BMP7
Stelle_5_BMP7 Stelle_1_TGFB2

Stelle_2_TGFB2 Stelle_3_TGFB2 Stelle_4_TGFB2 Stelle_5_TGFB2
Stelle_6_TGFB2 BY Simple_cohort Diagnose

/PLOT BOXPLOT STEMLEAF

/COMPARE GROUPS

/STATISTICS DESCRIPTIVES

/CINTERVAL 95

/MISSING LISTWISE

/NOTOTAL.

****Analyse der Einzelstellen****

NPAR TESTS

/M-W= Stelle_1_BMP2 Stelle_2_BMP2 Stelle_3_BMP2 Stelle_4_BMP2
Stelle_5_BMP2 Stelle_6_BMP2

Stelle_1_BMP6 Stelle_2_BMP6 Stelle_3_BMP6 Stelle_4_BMP6 Stelle_5_BMP6
Stelle_6_BMP6 Stelle_7_BMP6

Stelle_1_BMP7 Stelle_2_BMP7 Stelle_3_BMP7 Stelle_4_BMP7 Stelle_5_BMP7
Stelle_1_TGFB2 Stelle_2_TGFB2

Stelle_3_TGFB2 Stelle_4_TGFB2 Stelle_5_TGFB2 Stelle_6_TGFB2 BY
Simple_cohort(1 0)

/MISSING ANALYSIS.

*****Analyse der Zellreihen****

Explorativ PCa**

Anhang

USE ALL.

COMPUTE filter_\$=(Zustand = 5).

VARIABLE LABELS filter_\$ 'Zustand = 5 (FILTER)'.
VALUE LABELS filter_\$ 0 'Not Selected' 1 'Selected'.

FORMATS filter_\$ (f1.0).

FILTER BY filter_\$.

EXECUTE.

EXAMINE VARIABLES=Stelle_1_BMP2 Stelle_2_BMP2 Stelle_3_BMP2
Stelle_4_BMP2 Stelle_5_BMP2

Stelle_6_BMP2 Stelle_1_BMP6 Stelle_2_BMP6 Stelle_3_BMP6 Stelle_4_BMP6
Stelle_5_BMP6 Stelle_6_BMP6

Stelle_7_BMP6 Stelle_1_BMP7 Stelle_2_BMP7 Stelle_3_BMP7 Stelle_4_BMP7
Stelle_5_BMP7 Stelle_1_TGFB2

Stelle_2_TGFB2 Stelle_3_TGFB2 Stelle_4_TGFB2 Stelle_5_TGFB2
Stelle_6_TGFB2 Mittelert_BMP2

BMP2_Mediane Mittelwert_BMP6 BMP6_Mediane BMP7_Mediane
Mittelwert_BMP7 Mittelwert_TGFB2

Mediane_TGFB BY Diagnose

/PLOT BOXPLOT STEMLEAF

/COMPARE GROUPS

/STATISTICS DESCRIPTIVES

/CINTERVAL 95

/MISSING LISTWISE

/NOTOTAL.

Anhang

****explorativ HMC1

USE ALL.

COMPUTE filter_\$=(Zustand = 10).

VARIABLE LABELS filter_\$ 'Zustand = 10 (FILTER)'.
VALUE LABELS filter_\$ 0 'Not Selected' 1 'Selected'.

FORMATS filter_\$ (f1.0).

FILTER BY filter_\$.

EXECUTE.

EXAMINE VARIABLES=Stelle_1_BMP2 Stelle_2_BMP2 Stelle_3_BMP2
Stelle_4_BMP2 Stelle_5_BMP2

Stelle_6_BMP2 Stelle_1_BMP6 Stelle_2_BMP6 Stelle_3_BMP6 Stelle_4_BMP6
Stelle_5_BMP6 Stelle_6_BMP6

Stelle_7_BMP6 Stelle_1_BMP7 Stelle_2_BMP7 Stelle_3_BMP7 Stelle_4_BMP7
Stelle_5_BMP7 Stelle_1_TGFB2

Stelle_2_TGFB2 Stelle_3_TGFB2 Stelle_4_TGFB2 Stelle_5_TGFB2
Stelle_6_TGFB2 Mittelert_BMP2

BMP2_Mediane Mittelwert_BMP6 BMP6_Mediane BMP7_Mediane
Mittelwert_BMP7 Mittelwert_TGFB2

Mediane_TGFB BY Diagnose

/PLOT BOXPLOT STEMLEAF

/COMPARE GROUPS

/STATISTICS DESCRIPTIVES

/CINTERVAL 95

Anhang

/MISSING LISTWISE

/NOTOTAL.

**** korreliert die methylierung mit der Konzentration von estrogen? **

NONPAR CORR

/VARIABLES=Mittelwert_BMP2 BMP2_Mediane Mittelwert_BMP6 BMP6_Mediane
BMP7_Mediane Mittelwert_BMP7

Mittelwert_TGFB2 Mediane_TGFb Konzentration_Ethanol Konzentration_Estrogen

/PRINT=SPEARMAN TWOTAIL NOSIG

/MISSING=PAIRWISE.

***explorativ LAD2**

FILTER OFF.

USE ALL.

EXECUTE.

USE ALL.

COMPUTE filter_\$=(Zustand = 20).

VARIABLE LABELS filter_\$ 'Zustand = 20 (FILTER)'.
VALUE LABELS filter_\$ 0 'Not Selected' 1 'Selected'.

FORMATS filter_\$ (f1.0).

FORMATS filter_\$ (f1.0).

FILTER BY filter_\$.

EXECUTE.

Anhang

EXAMINE VARIABLES=Stelle_1_BMP2 Stelle_2_BMP2 Stelle_3_BMP2

Stelle_4_BMP2 Stelle_5_BMP2

Stelle_6_BMP2 Stelle_1_BMP6 Stelle_2_BMP6 Stelle_3_BMP6 Stelle_4_BMP6

Stelle_5_BMP6 Stelle_6_BMP6

Stelle_7_BMP6 Stelle_1_BMP7 Stelle_2_BMP7 Stelle_3_BMP7 Stelle_4_BMP7

Stelle_5_BMP7 Stelle_1_TGFB2

Stelle_2_TGFB2 Stelle_3_TGFB2 Stelle_4_TGFB2 Stelle_5_TGFB2

Stelle_6_TGFB2 Mittelert_BMP2

BMP2_Mediane Mittelwert_BMP6 BMP6_Mediane BMP7_Mediane

Mittelwert_BMP7 Mittelwert_TGFB2

Mediane_TGFb BY Diagnose

/PLOT BOXPLOT STEMLEAF

/COMPARE GROUPS

/STATISTICS DESCRIPTIVES

/CINTERVAL 95

/MISSING LISTWISE

/NOTOTAL.

**** korreliert die methylierung mit der Konzentration von estrogen? **

NONPAR CORR

/VARIABLES=Mittelert_BMP2 BMP2_Mediane Mittelwert_BMP6 BMP6_Mediane

BMP7_Mediane Mittelwert_BMP7

Mittelwert_TGFB2 Mediane_TGFb Konzentration_Ethanol Konzentration_Estrogen

/PRINT=SPEARMAN TWOTAIL NOSIG

Anhang

/MISSING=PAIRWISE.

***korrelation tryptase und methylierungen**

FILTER OFF.

USE ALL.

EXECUTE.

NONPAR CORR

/VARIABLES=Mittelert_BMP2 BMP2_Mediane Mittelwert_BMP6 BMP6_Mediane
BMP7_Mediane Mittelwert_BMP7

Mittelwert_TGFB2 Mediane_TGFb Stelle_1_BMP2 Stelle_2_BMP2 Stelle_3_BMP2
Stelle_4_BMP2 Stelle_5_BMP2

Stelle_6_BMP2 Stelle_1_BMP6 Stelle_2_BMP6 Stelle_3_BMP6 Stelle_4_BMP6
Stelle_5_BMP6 Stelle_6_BMP6

Stelle_7_BMP6 Stelle_1_BMP7 Stelle_2_BMP7 Stelle_3_BMP7 Stelle_4_BMP7
Stelle_5_BMP7 Stelle_1_TGFB2

Stelle_2_TGFB2 Stelle_3_TGFB2 Stelle_4_TGFB2 Stelle_5_TGFB2
Stelle_6_TGFB2 Tryptase_Blut

/PRINT=SPEARMAN TWOTAIL NOSIG

/MISSING=PAIRWISE.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die vorgelegte Promotionsarbeit selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt zu haben, die ich in der Arbeit angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Thesis erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze gute wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der ‚Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis‘ niedergelegt sind, eingehalten. Gemäß § 25 Abs. 6 der Allgemeinen Bestimmungen für modularisierte Studiengänge dulde ich eine Überprüfung der Thesis mittels Anti-Plagiatssoftware.

Datum

Unterschrift

Abbildungsgenehmigung

Für die Abbildungen 27, 30, 33, und 36 liegt die freundliche Genehmigung zur Verwendung in dieser Arbeit der Firma Qiagen, Hilden vor.

Für die Abbildung 6 liegt die freundliche Genehmigung zur Verwendung in dieser Arbeit von Nils Nesheim vor.

Ethikvotum

Das ohne Einschränkung zustimmende Ethikvotum vom 06 Juni 2013 unter dem Titel „inflammatory prostatitis syndrom in fertile and infertile men: Role of estrogenreceptors, mast cell activity and inflammation of the seminal pathway“ liegt vor. Die Studie wurde von der Ethik Kommission der JLU Gießen genehmigt. (Anlage ethisches Votum, AZ.: 55/13).

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei meinem Doktorvater, Herr Prof. Wagenlehner, für die Möglichkeit bei ihm zu promovieren, seine immer unverzüglich erreichbaren Ideen, seine freundlichen Korrekturen, Lob und Kritik. Er war zu jedem Zeitpunkt eine immer freundliche, große Unterstützung.

Zudem gilt mein Dank Frau Prof. Undraga Schagdarsurengin, die mir mit ihrem breitem Wissen und ihrer so freundlichen Art mit ihrem großem Fachinteresse in so vielen Situationen helfen konnte. Mein Dank gilt auch Ihrem erfahrenem Laborteam, das mir ungezählte Male mit Rat und Tat zur Seite stand.

Auch möchte ich mich bei dem Laborteam des Zentrallabors der Universitätsklinik in Marburg, sowie bei Frau Dr. Chrysanthi Skevaki und Prof. Harald Renz, die die Messung der Tryptasespiegel ermöglicht haben, herzlich bedanken.

Rupert Schambeck