

**Einfluss von Testosteron auf die Population von Immunzellen im Blut -  
Implikationen bei klinisch indizierter Manipulation des  
Testosteronhaushalts bei Männern mit Prostatakarzinom und bei  
Männern mit Testosterondefizit**

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

vorgelegt von  
Theresa Laura Gisela von Zehmen  
aus Frankfurt am Main

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Institut für Anatomie und Zellbiologie

Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie

Gutachter: Prof. Dr. Wagenlehner

Gutachter: PD Dr. Kabisch

Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. Wehler

Prüfungsmitglied: Prof. Dr. Lips

Tag der Disputation: 06. Oktober 2022

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Einführung.....	1
1.2	<b>Das angeborene und das adaptive Immunsystem</b> .....	<b>2</b>
1.3	<b>T-Zellen</b> .....	<b>3</b>
1.3.1	CD4+ T-Effektorzellen.....	3
1.3.1.1	Regulatorische T-Zellen .....	4
1.3.2	CD8+ zytotoxische T-Zellen .....	4
1.3.3	Natürliche Killer-T-Zellen.....	4
1.4	<b>Weitere Zellen des Immunsystems</b> .....	<b>5</b>
1.4.1	B-Zellen.....	5
1.4.2	Monozyten.....	5
1.4.3	Granulozyten und Natürliche Killerzellen.....	5
1.5	<b>Testosteron</b> .....	<b>5</b>
1.5.1	Synthese, Transport, Wirkungsweise .....	5
1.5.2	Allgemeine Funktionen .....	6
1.5.3	Immunologische Funktionen .....	6
1.5.4	Testosteron und Prostatakrebs .....	7
1.6	<b>Das Prostatakarzinom</b> .....	<b>8</b>
1.6.1	Epidemiologie.....	8
1.6.2	Ätiologie .....	8
1.6.3	Klinische Symptomatik, Metastasierung und Diagnostik .....	9
1.6.4	Stadieneinteilung .....	9
1.6.4.1	Der Gleason-Score.....	9
1.6.4.2	TNM-Klassifikation nach UICC 2017.....	10
1.6.4.3	Risikoklassifizierung nach D'Amico.....	11
1.6.5	Therapie.....	12
1.6.6	Androgendeprivation .....	13
1.7	<b>Hypogonadismus</b> .....	<b>15</b>
1.7.1	Definition, Epidemiologie und Ätiologie .....	15
1.7.2	Klinische Symptomatik und Diagnostik.....	15
1.7.3	Therapie.....	16
1.8	<b>Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>16</b>

<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>18</b>
2.1.1	Geräte .....	18
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	18
2.1.3	Chemikalien.....	19
2.1.4	Puffer und Lösungen .....	19
2.1.5	Medien für die Durchflusszytometrie.....	19
2.1.6	Antikörper.....	20
2.1.7	Isotypkontrollen und Fc-Rezeptor-Block .....	20
2.1.8	Softwares .....	21
<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>21</b>
2.2.1	Patienten und Ausschlusskriterien.....	21
2.2.2	Rechtliches .....	23
2.2.3	Blutentnahme und Messung des Testosteronwerts.....	23
2.2.4	Allgemeines zum experimentellen Teil dieser Arbeit .....	24
2.2.5	Isolierung von PBMC.....	24
2.2.6	Zählen und Waschen der isolierten PBMC .....	25
2.2.7	Immunzellfärbungen und ihre Kontrollen .....	26
2.2.8	Immunophänotypisierungsfärbung.....	26
2.2.9	Treg-Färbung.....	28
2.2.9.1	Färbung der Oberflächenproteine: CD4 und CD25 .....	29
2.2.9.2	Intrazelluläre Färbung: Foxp3 .....	29
2.2.10	Analyse der Immunzellpopulationen mittels Durchflusszytometrie .....	31
2.2.11	Statistik .....	32
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Patientengruppen.....</b>	<b>34</b>
3.1.1	Charakteristika der Patientengruppe 1.....	35
3.1.2	Charakteristika der Patientengruppe 2.....	36
3.1.3	Charakteristika der Patientengruppe 3.....	38
3.1.4	Charakteristika der Patientengruppe 4.....	39
3.1.5	Charakteristika der Patientengruppe 5.....	42
3.1.6	Charakteristika der Patientengruppe 6.....	42

3.1.7	Charakteristika der Patientengruppen im Vergleich.....	43
<b>3.2</b>	<b>Datenanalyse – Gating und Kompensation .....</b>	<b>47</b>
<b>3.3</b>	<b>Statistische und graphische Auswertungen des Auftretens der Immunezellpopulationen in den Patientengruppen und in Korrelation mit dem Testosteronspiegel.....</b>	<b>51</b>
3.3.1	Geringstes Aufkommen von Leukozyten in Gruppe 4.....	51
3.3.2	Geringste T-Zellzahl in Gruppe 4 und Nachweis eines mäßigen positiven Zusammenhangs zwischen der T-Zellzahl und dem Testosteronspiegel .....	53
3.3.2.1	Signifikant vermindertes Vorkommen von CD4+ T-Zellen in Gruppe 4 im Vergleich zu Gruppe 1 .....	55
3.3.2.2	Signifikant vermehrtes Vorkommen von CD8+ T-Zellen in Gruppe 4 im Vergleich zu Gruppe 1 .....	58
3.3.2.3	Verhältnis zwischen CD4+ zu CD8+ T-Zellen in Gruppe 4 signifikant erniedrigt im Vergleich zu Gruppe 1 .....	61
3.3.3	B-Zellzahl in Gruppe 4 im Vergleich zu Gruppe 1 halbiert.....	63
3.3.4	Monozytenvorkommen in Gruppe 4 deutlich am höchsten .....	65
3.3.5	Eosinophile und Neutrophile in Gruppe 4 deutlich vermehrt und Nachweis eines mäßigen negativen Zusammenhangs zwischen ihrer Anzahl und dem Testosteronspiegel.....	68
3.3.6	Erniedrigte Anzahl Natürlicher Killer-T-Zellen in Gruppe 1 und erhöhtes Vorkommen von Natürlichen Killerzellen in Gruppe 6 ...	71
3.3.7	Erhöhte Anzahl von Tregs in den Gruppen 1-4 und Nachweis eines geringen bis mäßigen negativen Zusammenhangs zwischen Tregs und dem Testosteronspiegel .....	74
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>78</b>
<b>4.1</b>	<b>Unterschiede im Vorkommen der Immunezellpopulationen insbesondere zwischen den Gruppen 1 und 4.....</b>	<b>78</b>
<b>4.2</b>	<b>Nachweis eines negativen Zusammenhangs zwischen dem Testosteronserumspiegel und dem Vorkommen von Tregs.....</b>	<b>81</b>
<b>4.3</b>	<b>Methodenkritik .....</b>	<b>85</b>
4.3.1	Patientenkollektiv .....	85
4.3.2	Studienmodell.....	87

4.3.3	Testosteronbestimmung.....	87
4.3.4	Treg-Detektion .....	87
<b>4.4</b>	<b>Zukunftsblick .....</b>	<b>88</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>90</b>
<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>91</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>92</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>94</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>96</b>
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>98</b>
<b>11</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>108</b>
11.1	Fragebogen .....	108
11.2	Aufklärungsbogen und Einwilligungserklärung .....	109
<b>12</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>114</b>
<b>13</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>115</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung

Das Immunsystem birgt noch heute viele Geheimnisse und ist zentraler Punkt der Forschung. Einerseits besteht seine Aufgabe darin, den Körper vor schädlichen Fremdstoffen der Außenwelt und Eindringlingen zu schützen, andererseits körpereigene, entartete Zellen zu erkennen und zu vernichten.<sup>42</sup>

Die Immunantwort unterscheidet sich bei Mann und Frau. Es zeigen sich erhebliche geschlechtsspezifische Unterschiede bei der Reaktion des Immunsystems auf Infektionen und Impfungen sowie beim Auftreten von Autoimmunerkrankungen. Obwohl epidemiologisch gut abgesichert, sind die Ursachen dieser Differenzen auf mechanistischer Ebene bisher wenig verstanden. Neben immunologischen, genetischen oder behavioralen Mechanismen werden auch Unterschiede im hormonellen Status vermutet, wobei den Geschlechtshormonen eine zentrale Rolle zugesprochen wird.<sup>48-50</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit wird der Rolle von Testosteron im Zusammenhang mit dem menschlichen Immunsystem weiter auf den Grund gegangen. Es wurde der Einfluss von Testosteron auf Immunzellpopulationen, insbesondere auf CD (Cluster of Differentiation)4+CD25+Foxp3 (Forkhead Box Protein 3)+ T-regulatorischen Zellen (Treg-Zellen, Tregs), im peripheren Blut von Männern untersucht. Vorversuche deuten auf eine direkte Einwirkung von Testosteron auf Foxp3-Expression in CD4+CD25+ Treg-Zellen hin.<sup>24,94</sup> Sie spielen eine entscheidende Rolle bei Entzündungsprozessen sowie beim Auftreten von Autoimmunerkrankungen und Krebs.<sup>28,80</sup>

So beeinflussen Tregs und Androgene maßgeblich die Pathogenese und den Verlauf des Prostatakarzinoms.<sup>27,43</sup> Dessen Entstehung hängt neben Umwelteinflüssen und genetischer Disposition insbesondere von Entzündungsprozessen in der Prostata ab.<sup>38,64,66,82</sup>

In dieser Arbeit wurden Immunzellpopulationen mit besonderem Augenmerk auf CD4+CD25+Foxp3+ Treg-Zellen im Blutserum von Patienten untersucht, die einen erniedrigten Testosteronserumspiegel aufweisen. Zu den untersuchten Patientengruppen gehören unter Testosteronmangel leidende Männer und Prostatakarzinompatienten unter Androgendeprivationstherapie (ADT) sowie Männer ohne Testosterondefizit und Prostatakarzinompatienten ohne ADT als Kontrollprobanden.

## 1.2 Das angeborene und das adaptive Immunsystem

Es wird das angeborene vom adaptiven Immunsystem unterschieden. Das angeborene Immunsystem umfasst Abwehrmechanismen, welche von Geburt an bestehen und unspezifisch auf Pathogene reagieren. Dazu zählen Haut und Schleimhäute, zelluläre Bestandteile wie Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen, dendritische Zellen und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) ebenso wie humorale Bestandteile wie das Komplementsystem, Akute-Phase-Proteine, Lysozyme und verschiedene Zytokine.<sup>42,77</sup> Das adaptive Immunsystem arbeitet mit dem angeborenen eng zusammen. Hier erfolgt eine Immunantwort erst nach Kontakt mit einem Pathogen, welches mithilfe bspw. dendritischer Zellen als Antigen präsentiert wird. Der Ablauf ist langsamer, jedoch spezifischer. Er wird im Wesentlichen von B- und T-Lymphozyten (auch B- und T-Zellen genannt) bzw. über deren Rezeptoren vermittelt, welche hohe Antigenspezifität und Diversität aufweisen. Weiter zeichnet sich das adaptive Immunsystem durch die Fähigkeit der Toleranz gegenüber körpereigenen Zellen und den Aufbau von Immunität durch Bildung von langlebigen, antigenspezifischen B- und T-Zellen, sogenannten Gedächtniszellen, aus.<sup>77</sup> Neben Erythro- und Thrombozyten entwickeln sich all diese Immunzellen über myeloide bzw. lymphatische Vorläuferzellen aus Stammzellen des Knochenmarks, wie in Abbildung 1 zu sehen ist.<sup>17</sup>

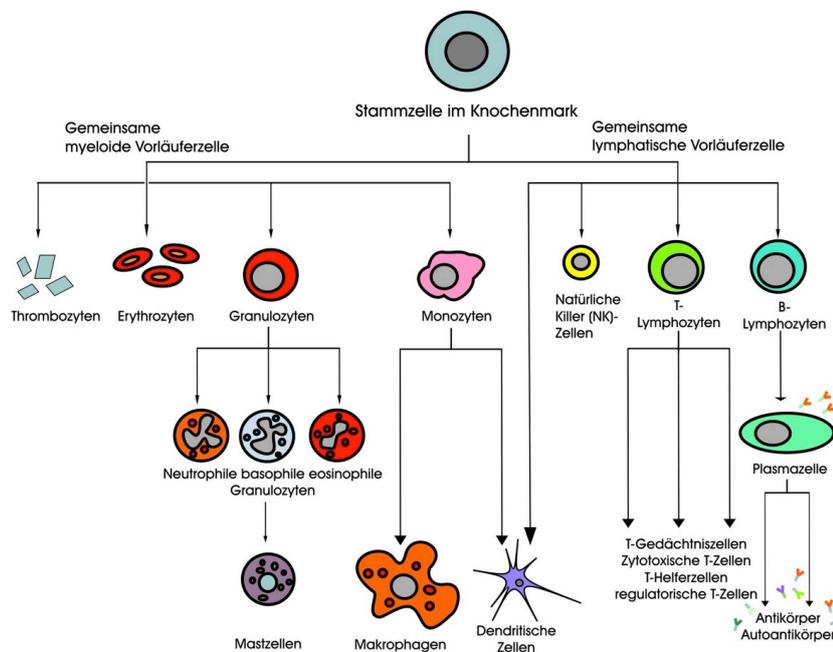


Abbildung 1<sup>17</sup>: Überblick über die Abstammung von Immunzellen, Erythrozyten und Thrombozyten. Quelle: Deutsche Gesellschaft für Immunologie e.V. <http://das-immunsystem.de/fuer-jedermann/unser-immunsystem/die-menschlichen-immunzellen>. Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Agnes Giniewski.

### 1.3 T-Zellen

T-Zellen spielen eine große Rolle bei der Detektion und Eliminierung von maligne entarteten Zellen. Das „T“ im Namen steht für Thymus. T-Vorläuferzellen entstehen im Knochenmark aus lymphatischen Stammzellen und wandern von dort aus in den Thymus. Hier entwickeln sie sich über mehrere Schritte zu reifen T-Zellen. Im Laufe dieser Reifung erfolgt die Bildung des T-Zell-Rezeptors inklusive somatischer Rekombination. Parallel zur Entstehung des T-Zell-Rezeptors entwickeln reife T-Zellen das Membranprotein CD4 oder CD8, welches an MHC (Major Histocompatibility Complex, deutsch: Haupthistokompatibilitätskomplex)-Proteine der Klasse II bzw. I binden. Die Zellen durchlaufen eine positive und negative Selektion, in der das Binden an MHC-Moleküle überprüft wird. Die nach beiden Selektionsmechanismen überlebenden T-Zellen bilden die Gruppe der reifen, naiven T-Zellen. Diese stellen insgesamt nur 2 % der ursprünglichen T-Vorläuferzellen dar. Sie gelangen vom Thymus ins Blut, wo sie ca. 80 % der Lymphozyten darstellen.<sup>77</sup> CD4+, naive T-Lymphozyten differenzieren sich weiter zu verschiedenen T-Effektorzellen. CD8+, naive T-Lymphozyten werden zu zytotoxischen T-Zellen.<sup>62</sup>

#### 1.3.1 CD4+ T-Effektorzellen

Je nach dem, bei Aktivierung lokal vorherrschendem, Zytokinmuster entsteht aus dem naiven CD4+ T-Lymphozyten eine T-Helferzelle (TH-Zelle)1, TH2, TH17 oder eine Treg.<sup>62</sup>

TH1-Zellen aktivieren durch Bindung an MHC-II-Proteine Makrophagen, NK-Zellen und zytotoxische T-Zellen. Eine Überaktivität kann Entzündungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen hervorrufen.<sup>62</sup>

TH2-Zellen helfen bei der B-Zell-Aktivierung. B-Zellen proliferieren nach dieser Aktivierung und können einen Klassenwechsel zu Plasmazellen vollziehen, Antikörper produzieren und sezernieren.<sup>77</sup> Kommt es bei TH2-Zellen zu einer überschießenden Reaktion, kann es zu allergischen Reaktionen mit Beteiligung von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten sowie von Mastzellen kommen.<sup>62</sup>

TH17-Zellen sezernieren insbesondere IL (Interleukin)-17, was den für sie namensgebenden Prozess darstellt. Sie wirken entzündungsfördernd und beteiligen sich maßgeblich an der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen.<sup>62</sup> Sie tragen auf der einen Seite über Zytokine zum proinflammatorischen Milieu bei der Entwicklung von

Tumoren bei, auf der anderen Seite beteiligen sie sich an der Immunantwort gegen Tumoren. TH17-Zellen stellen ein vielversprechendes Therapieziel in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen sowie von Krebs dar.<sup>10,55</sup>

### **1.3.1.1 Regulatorische T-Zellen**

Regulatorische T-Zellen (Tregs) spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung immunologischer Homöostase. Sie können Vorgänge des angeborenen und adaptiven Immunsystems hemmen.<sup>62</sup> Tregs verhindern das Entstehen von Entzündungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen, indem sie eine Selbsttoleranz gegenüber Autoantigenen herstellen.<sup>80</sup> Gleichzeitig vermindern sie sowohl die protektive Immunreaktion auf Pathogene und Impfungen<sup>5,56,92</sup> als auch auf Tumorantigene.<sup>16,69,86</sup> Tregs sind Dreh- und Angelpunkt der Balance zwischen Toleranz und Immunität und stellen einen möglichen Ansatzpunkt in der Therapie von Autoimmunerkrankungen und Transplantatabstoßung, wie auch in der Tumorummuntherapie dar.<sup>79,80</sup>

Es werden verschiedene Gruppen von Tregs unterschieden. In dieser Studie geht es um CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg-Zellen. Auf ihrer Zelloberfläche tragen sie in großen Mengen die Membranproteine CD4 und CD25. Ihr Hauptmarker ist der Transkriptionsfaktor Foxp3, welcher ebenso den Hauptschalter der Tregs-Funktion darstellt.<sup>28,41,67,75</sup>

Tregs können ihre Zielzellen bei Zell-Zellkontakt hemmen oder in ihnen mithilfe von Granzymen B und Perforin den Zelltod auslösen.<sup>9</sup>

### **1.3.2 CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen**

CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen dienen der gezielten Eliminierung körpereigener, jedoch von Viren oder anderen intrazellulären Organismen infizierter Zellen. Diese präsentieren die körperfremden Peptide über MHC-I-Proteine. Die zytotoxische T-Zelle erkennt diese als körperfremd und induziert mittels Perforin, Granzymen oder Fas-Liganden die Apoptose der infizierten Zelle.<sup>62,77</sup>

### **1.3.3 Natürliche Killer-T-Zellen**

Natürliche Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) kombinieren Eigenschaften von T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen. Bei Aktivierung ihres T-Zell-Rezeptors sezernieren NKT-Zellen Zytokine, welche die schnelle Aktivierung und Differenzierung von B- und T-Zellen unterstützen. NKT-Zellen sind wie NK-Zellen zur Zelllyse fähig.<sup>63</sup>

## **1.4 Weitere Zellen des Immunsystems**

### **1.4.1 B-Zellen**

B-Zellen („B“ wie „bone“, aus dem Englischen für „Knochen“) entstehen im Knochenmark und gehören wie auch die T-Zellen zum adaptiven Immunsystem. Sie produzieren als Plasmazellen Antikörper und können sich zu Gedächtniszellen differenzieren.<sup>62</sup>

### **1.4.2 Monozyten**

Monozyten gehören zum angeborenen Immunsystem. Sie sind die Vorläuferzellen von Makrophagen und dendritischen Zellen und tragen insbesondere über Phagozytose und Antigen-Präsentation zur Immunabwehr bei.<sup>62</sup>

### **1.4.3 Granulozyten und Natürliche Killerzellen**

Auch Granulozyten und NK-Zellen zählt man zum unspezifischen Immunsystem. Sie gehören wie auch Makrophagen zu den „Fresszellen“, da sie Phagozytose betreiben. Granulozyten unterscheidet man mittels Färbung in neutrophile, basophile und eosinophile und wirken gegen Pathogene wie Bakterien, Pilze und Parasiten. NK-Zellen hingegen sind auf die Abwehr von Viren und Tumorzellen spezialisiert.<sup>62</sup>

## **1.5 Testosteron**

### **1.5.1 Synthese, Transport, Wirkungsweise**

Testosteron ist ein Androgen und gehört zu der Gruppe der Steroidhormone. Es wird sowohl beim Mann als auch bei der Frau über mehrere enzymatische Schritte aus Cholesterin gebildet. Bildungsorte sind die Nebennieren und die Gonaden, wobei hier ein Unterschied zwischen den Geschlechtern besteht: Während beim Mann ca. 95 % des Testosterons in den Leydig-Zellen des Hodens und nur ca. 5 % in den Nebennierenrinden produziert wird, wird bei der Frau ein Großteil des Testosterons in den Nebennieren und nur ein kleiner Teil in den Ovarien synthetisiert. Das aus der Hypophyse stammende luteinisierende Hormon (LH) sowie andere parakrine Faktoren regulieren die Synthese und Sekretion des Testosterons. Die Referenzwerte der Testosteronkonzentration im Blutserum liegen beim Mann zwischen etwa 12 und 40 nmol/l (bzw. etwa 300 und 1000 ng/dl, Zentrallabor Uniklinik Gießen) während der ersten Tageshälfte. Der Blutabnahmezeitpunkt spielt dabei eine wichtige Rolle, da

Testosteron einer zirkadianen Rhythmik unterliegt. Morgens ist der Testosteronwert im Blutserum am höchsten, abends kann er etwa 25 % unter dem morgendlichen Wert liegen. Neben Testosteron werden auch andere Sexualhormone wie Androsteron, Androstendion, Dihydrotestosteron (DHT), Progesteron, 17-Hydroxyprogesteron und Pregnenolon gebildet. Im Blut wird Testosteron vor allem an dem Sexualhormonbindenden-Globulin (SHBG) oder an Albumin gebunden zu Zielzellen transportiert, wo es z. B. in der Prostata durch die Steroid-5alpha-Reduktase zu DHT reduziert oder z. B. im Fettgewebe durch die Aromatase-Reaktion in Östradiol umgewandelt werden kann. DHT und Testosteron binden intrazellulär an den gleichen genregulierenden Androgenrezeptor, DHT allerdings mit einer höheren Affinität und ist somit die biologisch aktivere Form. Die Wechselwirkung mit dem Androgenrezeptor, sowie die Anzahl der Androgenmoleküle beeinflussen ihre physiologische Wirkung. Androgene können neben nicht-genomischen auch genomische Effekte erzielen, welche langsam (nach Stunden) bzw. schnell (nach Sekunden oder Minuten) einsetzen.<sup>68</sup>

### **1.5.2 Allgemeine Funktionen**

Testosteron ist das wichtigste Androgen im männlichen Organismus und erfüllt zahlreiche Funktionen im Körper. Es ist für die Ausbildung und Funktion der äußeren und inneren Geschlechtsorgane verantwortlich. Es bestimmt die Potenz und trägt indirekt über Sertoli-Zellen zur Ernährung der Spermatogonien bei. Testosteron wirkt anabol. Es fördert den Aufbau von Muskulatur und Knochen und ist im Zusammenspiel mit Östrogen für die Regulierung des Skelettwachstums zuständig. Weiter beeinflusst es u.a. in der Leber die Proteinbiosynthese, im Knochenmark die Hämatopoese, im Gehirn kognitive Leistungen und die Libido, in der Niere die Produktion von Erythropoetin, in der Haut die Talgproduktion und das Haarwachstum.<sup>68</sup>

### **1.5.3 Immunologische Funktionen**

In den letzten Jahren wurden zunehmend klinische und grundlagenorientierte Studien veröffentlicht, die eine anti-inflammatorische Funktion von Androgenen darlegen.<sup>12,71</sup> Es konnte gezeigt werden, dass mit Testosteron stimulierte, humane Monozyten, Makrophagen und andere nicht-immunologische Zellen einerseits weniger Adhäsionsmoleküle und proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF (Tumornekrosefaktor)-alpha, andererseits vermehrt anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 produzieren.<sup>15,47,60</sup> In Studien zu verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie

dem Lupus erythematoses, der Rheumatoiden Arthritis oder auch der Multiplen Sklerose weist Testosteron einen positiven, das Immunsystem supprimierenden Effekt auf.<sup>7,14,33,73</sup> Eine Testosteronsubstitution konnte bspw. bei älteren hypogonadalen Männern mit einer Morbus Crohn-Erkrankung eine Besserung der Symptomatik bewirken.<sup>37</sup> Weiter wurde eine signifikante Inhibition der experimentellen Autoimmunorchitis (EAO) der Ratte nach Testosteronsubstitution nachgewiesen.<sup>25</sup> Auch ein direkter Effekt von Testosteron auf Tregs wurde *in vitro* festgestellt: Testosteron förderte die Entstehung von Tregs aus naiven Milz-T-Zellen der Ratte, welche die Proliferation aktivierter, proinflammatorischer T-Zellen unterdrücken.<sup>24</sup> Umgekehrt bestätigten Bebo et al. 1998 bei Mäusen eine Progredienz der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis bzw. Fitzpatrick et al. 1991 des autoimmunen Diabetes bei Testosteronentzug durch Kastration.<sup>4,26</sup> In humanen T-Zellen konnten Walecki et al. 2015 nachweisen, dass die Foxp3-Expression androgenabhängig ist. Testosteron führt zu einer Interaktion zwischen dem Androgenrezeptor und dem untranslatierten Bereich des Foxp3-kodierenden Gens und regt damit die Differenzierung von Tregs an. Androgene könnten folglich eine Expansion von humanen Treg-Zellpopulationen bewirken.<sup>94</sup>

#### **1.5.4 Testosteron und Prostatakrebs**

Testosteron steht als möglicher Risikofaktor der Prostatakarzinomentstehung in der Diskussion. Unumstritten ist, dass Testosteron das benigne wie auch das maligne Wachstum des Prostatakarzinoms beeinflusst.<sup>68</sup> Ein Zusammenhang zwischen dem Testosteronspiegel und der Entstehung von Prostatakrebs ist jedoch nicht bewiesen.<sup>8</sup> Es zeigt sich zudem, dass high grade Prostatakarzinome eher mit einem niedrigen prätherapeutischen Testosteronserumspiegel assoziiert sein können bzw. hohe prätherapeutische Testosteronserumspiegel das Risiko eines aggressiven Prostatakarzinoms vermindern.<sup>78</sup> Bei einem klinisch lokal begrenzten Prostatakarzinom ist ein niedriger Testosteronspiegel mit einem höheren pathologischen Tumorstatus bzw. mit einem extraprostatatischen Wachstum assoziiert. Assoziiert sind zudem höhere Rezidivraten nach radikaler Prostatektomie und schlechtere Überlebensraten mit niedrigen Testosteronspiegeln.<sup>13,78</sup>

## **1.6 Das Prostatakarzinom**

Vier der sechs in dieser Arbeit untersuchten Patientengruppen umfassen an Prostatakarzinom erkrankte Patienten. Es folgt hier ein Überblick über diese Malignomerkrankung.

### **1.6.1 Epidemiologie**

In der Bundesrepublik Deutschland ist das Prostatakarzinom die häufigste Krebserkrankung des Mannes, an der jährlich ca. 58.000 Männer neu erkranken und an deren Folgen etwa 14.000 Männer pro Jahr versterben. Das Lebenszeiterkrankungsrisiko liegt bei 10,9 %, die Lebenszeitsterberate bei 3,3 %. Momentan liegt das mittlere Erkrankungsalter bei etwa 72 Jahren. Das Risiko der 75-Jährigen in den nächsten fünf Lebensjahren an Prostatakrebs zu erkranken liegt bei 5 %. Die altersstandardisierte Erkrankungsrate stieg bis 2003 an, zeigte sich dann konstant und ist seit ca. 2011 rückläufig. Dies wird insbesondere auf Präventionsmaßnahmen wie die PSA (Prostata Spezifisches Antigen)-Wert-Messung zurückgeführt. Etwa zwei Drittel der Diagnosen werden in einem frühen Krebsstadium gestellt (UICC I/II, Union Internationale Contre le Cancer, aus dem Französischen für „Internationale Vereinigung gegen Krebs“).<sup>54</sup>

### **1.6.2 Ätiologie**

Das Alter gilt als ein wichtiger Risikofaktor für das Auftreten eines Prostatakarzinoms. Ebenfalls erwiesene Risikofaktoren sind die familiäre Disposition wie auch die ethnische Abstammung. Verwandte ersten Grades eines Prostatakrebspatienten haben ein zwei- bis dreifach erhöhtes Risiko ebenfalls an Prostatakrebs zu erkranken. Umso mehr Verwandte betroffen sind, umso höher ist das Erkrankungsrisiko und umso niedriger das Erkrankungsalter. Skandinavier und Nordamerikaner, insbesondere afroamerikanische Nordamerikaner, sind häufiger von einem Prostatakarzinom betroffen als Asiaten.<sup>54</sup> Zu genauen Prostatakrebs-fördernden Lebensstilen und Umweltfaktoren liegen kaum signifikante Erkenntnisse vor.<sup>36</sup> Es wird angenommen, dass lokal entzündliche Prozesse wie chronische Entzündungsreaktionen und sexuell übertragbare Erkrankungen im Zusammenhang mit dem Auftreten eines Prostatakarzinoms stehen.<sup>54</sup>

### **1.6.3 Klinische Symptomatik, Metastasierung und Diagnostik**

Das Prostatakarzinom bleibt im Anfangsstadium häufig unbemerkt. Symptomatisch wird die Tumorerkrankung zumeist erst durch Metastasen-bedingte Beschwerden wie Knochenschmerzen, Anämie oder Lymphödeme. Der Primärtumor kann ebenfalls Symptome erzeugen. Dazu gehören obstruktive oder irritative Miktionsbeschwerden, Hämaturie, Hämatospermie, erektile Dysfunktion und einseitiger Harnstau. Frühere lokale Tumorstadien werden oftmals durch Präventionsmaßnahmen entdeckt. Dazu gehören die digital-rektale Untersuchung (DRU) der Prostata, bei der ein suspekter Tastbefund auffallen kann und zu weiterer Diagnostik führt, sowie die Bestimmung des PSA-Wertes im Blutserum. Das PSA ist eine Serinprotease, die ausschließlich in der Prostata synthetisiert wird und das Sperma verflüssigt. Eine weitere diagnostische Maßnahme ist der transrektale Ultraschall (TRUS) der Prostata. Zur Diagnosesicherung erfolgt eine Prostatastanzbiopsie. Die hierdurch gesicherten Prostatagewebeproben werden histopathologisch auf das Vorliegen eines Karzinoms untersucht. Je nach Befund (Anzahl und Lokalisation der positiven Stanzbiopsien, Karzinombefall der Zylinder in Prozent, Infiltration der Prostatakapsel oder perineural, Gleason-Score) sollte hiernach ein Staging nach UICC-TNM (Tumor-Nodus-Metastasen)-Klassifikation erfolgen. Das Prostatakarzinom breitet sich zunächst lokal auf anliegende Organe bzw. Kapseln, sowie über die Lymphe aus. Es befällt lokale wie pelvine und retroperitoneale Lymphknoten. Die hämatogene Metastasierung erfolgt später und betrifft erst Knochen, vor allem des Achsenskeletts, seltener Lunge und Leber und sehr selten Gehirn und Haut. Als bildgebendes Verfahren zur Beurteilung der Prostata und einer etwaigen lokalen Ausbreitung eines Prostatakarzinoms hat sich die multiparametrische Magnetresonanztomografie (MRT) etabliert. Eine wichtige Rolle beim Staging spielt die Skelettszintigrafie zum Ausschluss und zur Früherkennung von Knochenmetastasen neben der Computertomografie (CT) zur Beurteilung von Lymphknotenmetastasen.<sup>81</sup> Ein sehr spezifisches diagnostisches Verfahren ist das PSMA-PET/CT (Prostata-Spezifisches-Membran-Antigen-Positronenemissionstomographie/CT).<sup>58,83</sup>

### **1.6.4 Stadieneinteilung**

#### **1.6.4.1 Der Gleason-Score**

Der von Dr. Donald Gleason entwickelte Gleason-Score beurteilt die feingewebliche Entartung des Prostatakarzinomgewebes anhand der Drüsenstruktur und dient als

wichtiger prognostischer Faktor. Er errechnet sich durch Addition des häufigsten und zweithäufigsten Differenzierungsgrades der Tumorzellen beim Prostataektomiepräparat bzw. des häufigsten und höchsten beim Prostatabiopsat. Der Score liegt zwischen 2 und 10, wobei die Größe der Zahl mit einer höheren krebsspezifischen Mortalität korreliert.<sup>31,34</sup>

#### 1.6.4.2 TNM-Klassifikation nach UICC 2017

Das T-Stadium beschreibt die lokale Ausdehnung des Karzinoms (s. Tabelle 1). Das N-Stadium gibt Auskunft über den Befall von Lymphknoten (s. Tabelle 2) und das M-Stadium über die Metastasierung (s. Tabelle 3). Als lokal begrenzte Prostatatumorstadien gelten Tumoren der Stadien T1-2N0M0; die Stadien T3-4N0M0 definieren das lokal fortgeschrittene Prostatakarzinom. Fortgeschrittene bzw. metastasierte Prostatakarzinomstadien stellen alle N1- und/oder M1-Stadien dar.<sup>45,87</sup>

#### T-Stadium

Tabelle 1: T-Stadium

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Weder klinisch tastbarer noch in der Bildgebung sichtbarer Tumor
T1a	Tumor zufälligen histologischen Befunds (Incidental Carcinoma) in 5 % oder weniger des resezierten Gewebes
T1b	Tumor zufälligen histologischen Befunds (Incidental Carcinoma) in mehr als 5 % des resezierten Gewebes
T1c	Tumor durch Nadelbiopsie diagnostiziert (z. B. bei erhöhtem PSA-Wert)
T2	Tumor auf Prostata begrenzt
T2a	Tumorbefall der Hälfte oder weniger eines Seitenlappens
T2b	Tumorbefall mehr als der Hälfte eines Seitenlappens
T2c	Tumorbefall in beiden Seitenlappen
T3	Tumor durchbricht Prostatakapsel

T3a	Extrakapsuläre Ausbreitung (ein- oder beidseitig) eingeschlossen mikroskopisch nachweisbarer Infiltration des Blasenhalses
T3b	Tumor infiltriert Samenblase(n)
T4	Tumor ist fixiert oder infiltriert andere benachbarte Strukturen als Samenblasen wie Sphinkter externus, Rektum, Levatormuskel, Beckenwand

## N-Stadium

Tabelle 2: N-Stadium

NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionäre(n) Lymphknotenmetastase(n)
N1	Regionäre Lymphknotenmetastase(n)

## M-Stadium

Tabelle 3: M-Stadium

MX	Metastasierung kann nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
M1a	Nicht regionäre Lymphknotenmetastase(n)
M1b	Knochenmetastase(n)
M1c	Andere Lokalisation(en)

### 1.6.4.3 Risikoklassifizierung nach D'Amico

Es wird das cTNM („c“ für „clinical“, deutsch: „klinisch“), welches aus klinischer Beurteilung abhängig von den Befunden aus DRU, TRUS und Bildgebung resultiert, vom pTNM-Stadium („p“ für „pathological“, deutsch: „pathologisch“) unterschieden. Das pTNM bildet sich aus der pathologischen Beurteilung des endgültigen Prostatektomie- und Lymphadenektomiepräparats. Die Risikoklassifizierung nach den D'Amico-Kriterien teilt das Prostatakarzinom in ein Karzinom eines niedrigen (low risk), mittleren (intermediate risk) oder hohen (high risk) Risikos ein. Entscheidend

hierfür sind das cTNM-Stadium, der PSA-Wert und der stanzbiologisch gesicherte Gleason-Score.<sup>20,81</sup>

### **1.6.5 Therapie**

Dem Patienten stehen, abhängig vom Tumorstadium, verschiedene Therapieoptionen des Prostatakarzinoms zur Auswahl. Die Entscheidung wird unter Berücksichtigung der Risikoklassifikation des Prostatakarzinoms getroffen. Zu berücksichtigen sind zudem der Patientenwille bzw. die Therapiepräferenz, die Beschwerdesymptomatik, das Alter bzw. die Lebenserwartung und die vorhandenen Komorbiditäten.<sup>20,81</sup>

Die radikale Prostatektomie mit oder ohne Lymphadenektomie, offen oder minimal-invasiv operiert, nervschonend oder nicht, wie auch weitere Behandlungsmöglichkeiten wie die perkutane Strahlentherapie, die LDR (Low Dose Rate, deutsch: niedrige Dosisleistung)- und HDR (High Dose Rate, deutsch: hohe Dosisleistung)-Brachytherapie, die hormonablativierende Therapie und die Chemotherapie stellen aktive Behandlungsmethoden dar, während die Methode der „Active Surveillance“ ein abwartendes Konzept des lokalen Prostatakarzinoms im Rahmen des prinzipiell kurativen Ansatzes und „Watchful Waiting“ ein abwartendes, symptomorientiertes Konzept der palliativen Therapie darstellen.<sup>20,81</sup>

Handelt es sich um ein low risk Prostatakarzinom, kommen folgende kurative Therapieoptionen infrage: Die radikale Prostatektomie (ohne Lymphadenektomie) oder die perkutane Strahlentherapie mit einer Dosis von 74-80 Gy (Gray). Des Weiteren gibt es die Möglichkeit der LDR-Brachytherapie durch Implantation radioaktiver 125-Iod-Seeds. Beim low risk Prostatakarzinom existiert unter bestimmten Voraussetzungen die Möglichkeit der Active Surveillance im Sinne einer abwartenden Haltung, um den Therapiebeginn und damit einhergehende, Therapie-bedingte Nebenwirkungen hinauszuzögern, bevor man bei Progress die aktive, kurative Therapie einleitet.<sup>20</sup>

Im Stadium des intermediate risk Prostatakarzinoms wird nach S3-Leitlinie die aktive Therapie empfohlen.<sup>45</sup> Es wird die (nervschonende) radikale Prostatektomie mit Lymphadenektomie, die perkutane Radiotherapie mit kombinierter ADT oder die HDR-Brachytherapie empfohlen. Die Therapieoption des Watchful Waitings ist eine palliative. Die alleinige ADT oder andere lokale Verfahren, wie die HIFU (Hoch Intensiver Fokussierter Ultraschall)-Therapie, sind nur im Einzelfall bzw. je nach

Patientenwille nicht-kurative Therapieoptionen bzw. nicht der Empfehlung der S3-Leitlinie entsprechend.<sup>20,45</sup>

Bei einem high risk Prostatakarzinom existieren dieselben Therapieoptionen wie beim intermediate risk Prostatakarzinom, unterschieden wird bei der kombinierten Radio-/Androgendeprivationstherapie die Dauer der ADT (Monate vs. Jahre).<sup>20</sup>

Ist das Tumorwachstum lokal fortgeschritten, wurden Lymphknoten- oder Fernmetastasen nachgewiesen, ist die Prognose des Krankheitsverlaufs deutlich schlechter. Patienten mit dieser Diagnose bedürfen einer weiteren systemischen Therapie. Hier kommt neben der Hormonentzugstherapie alternativ eine Chemotherapie mit Docetaxel zum Einsatz. Bei ossärer Metastasierung kann die Therapie um Bisphosphonate ergänzt werden. Die ADT wird mittlerweile fast immer als Kombinationstherapie mit einem der neuen Antiandrogene (Enzalutamid, Apalutamid, Darolutamid) oder einem Lyasehemmer der Testosteronbiosynthese (Abirateron) durchgeführt. Alternativ oder sequentiell bei kastrationsresistentem Prostatakarzinom wird eine zytotoxische Chemotherapie z. B. mit Docetaxel oder Cabazitaxel angewendet.<sup>20</sup> Wünscht der Patient in diesem Krankheitsstadium keine aktive Therapie, wird hier das Watchful Waiting im Sinne einer abwartenden Haltung angewandt, bei der nur bei Symptomatik eine symptomorientierte Therapie mit weiterhin palliativer Zielsetzung eingeleitet wird.<sup>20</sup>

### **1.6.6 Androgendeprivation**

Die Androgendeprivation findet vor allem beim lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Prostatakarzinom Anwendung. Sie kommt zudem in kurativer Intention neo-/ adjuvant zur radikalen Prostatektomie oder mit einer Bestrahlung als Kombinationstherapie zum Einsatz. Hierdurch kann eine Verbesserung des Überlebens erzielt werden.<sup>45,81</sup>

Charles Huggins erhielt 1941 den Nobelpreis für die Entdeckung des androgenabhängigen Wachstums von Prostatakarzinomzellen. Bei androgenablativer Therapie wird somit die Prostatakarzinomproliferation vorerst gestoppt. Es existieren verschiedene medikamentöse Ansätze, die Testosteronsynthese zu unterdrücken bzw. die Testosteronwirkung im Körper zu blockieren (s. Abbildung 2): Ein Therapieansatz ist die Senkung des Testosteronspiegels im Blut durch medikamentöse Kastration mittels LHRH (Luteinisierendes Hormon Releasing-Hormon)-Agonisten oder LHRH-

Antagonisten. Eine weitere Möglichkeit ist die Blockade der Androgenrezeptoren, auch der Prostata, durch steroidale oder nichtsteroidale Antiandrogene. Die Kombination beider genannter Ansätze ist eine weitere Therapieoption und wird komplette Androgenblockade genannt. Die chirurgische Kastration durch die bilaterale Orchiektomie (Entfernung Testosteron-produzierender Leydig-Zellen) ist heutzutage eine Ausnahmeoption.<sup>45,81</sup>

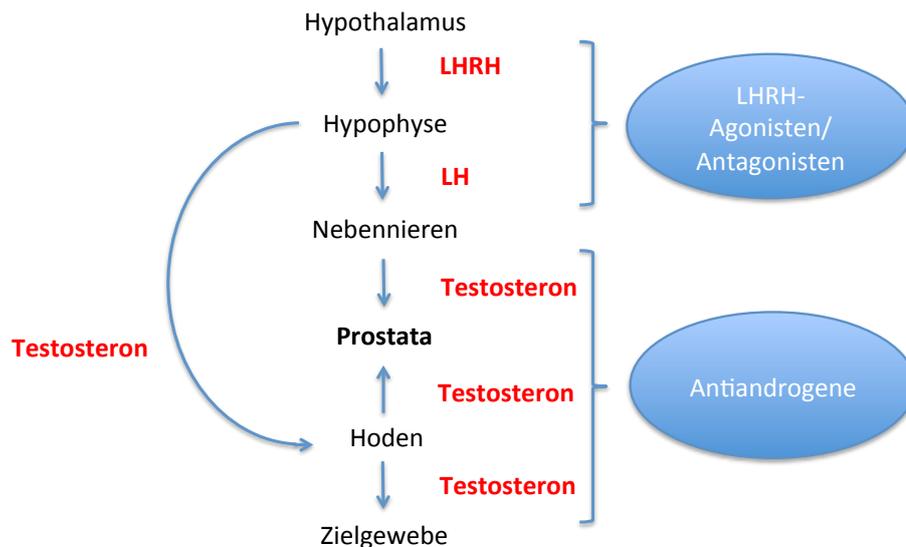


Abbildung 2: Medikamentöse Therapieansätze zur Unterdrückung der Testosteronsynthese (mittels LHRH-Agonisten/ Antagonisten) bzw. der Testosteronwirkung (mittels Antiandrogenen)

Allerdings sind nicht alle Prostatakrebszellen hormonsensitiv. Es wird die Koexistenz hormonsensitiver und hormonresistenter Tumorzelllinien vermutet. Zunächst greift die antiandrogene Therapie, sodass die Vielzahl hormonsensitiver Tumorzellen nicht mehr proliferiert. Im Verlauf kann es jedoch zu einer sogenannten Kastrationsresistenz kommen. Das bedeutet, dass hormonrefraktäre Tumorzellen übrig bleiben und weiter proliferieren. Es kommt zum Tumorprogress, im Mittel 14-30 Monate nach Beginn der antiandrogenen Behandlung.<sup>32</sup>

Für Patienten mit einem kastrationsresistenten Prostatakarzinom gibt es die Möglichkeiten eines Wechsels der ADT-Medikation bzw. die Addition einer weiteren antiandrogenen Medikation. Auch eine alternative oder zusätzliche Chemotherapie (Docetaxel, Cabazitaxel) wie auch eine Radium-223-Therapie bei ossärer Metastasierung können erwogen werden. Des Weiteren stellt die Lutetium-177-PSMA-Therapie eine Behandlungsoption des weit fortgeschrittenen kastrationsresistenten Prostatakarzinoms dar.<sup>20</sup>

## **1.7 Hypogonadismus**

Ein Teil der in dieser Arbeit untersuchten Patienten umfasst vom Hypogonadismus betroffene Männer. Es folgt ein Einblick in dieses Krankheitsbild.

### **1.7.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie**

Der männliche Hypogonadismus ist als ein klinisches Syndrom zu betrachten. Durch einen verminderten Androgenspiegel oder eine eingeschränkte Androgenwirkung können mehrere Organfunktionen zugleich und hiermit einhergehend die Lebensqualität im Allgemeinen beeinträchtigt sein.<sup>18,46,68</sup>

Der Testosteronserumspiegel sinkt altersbedingt. Mit zunehmendem Alter nimmt somit auch die Anzahl der an unter Hypogonadismus leidenden Männer zu. Besonders betroffen sind zudem Männer mit Komorbiditäten, schlechtem Allgemeinzustand und adipöse Männer.<sup>68,76</sup>

Hypogonadismus ist bedingt durch eine Pathologie auf mindestens einer Stufe der hypothalamischen-hypophysären-gonadalen Hormonachse oder durch eine allgemeine Androgenresistenz bzw. -insensitivität. Der primäre Hypogonadismus ist auf eine Störung der Testosteronproduktion der Hoden oder der Testosteronbiosynthese zurückzuführen. Der sekundäre Hypogonadismus ist durch eine Störung auf hypophysärer und hypothalamischer Ebene zu klassifizieren. Beim Late-onset-Hypogonadismus sind Hypophyse/Hypothalamus sowie Gonaden pathologisch betroffen. Weiter kann eine Androgeninsensitivität oder -resistenz von androgenen Zielorganen ursächlich für die Symptomatik des Hypogonadismus sein.<sup>18,68</sup>

### **1.7.2 Klinische Symptomatik und Diagnostik**

Anhand einer anhaltenden Klinik mit Anzeichen eines Androgenmangels sowie dem Nachweis eines erniedrigten Testosteronwerts im Blutserum wird die Diagnose des Hypogonadismus gestellt. Die Symptomatik ist abhängig von Ausmaß, Dauer der Erkrankung sowie dem Alter des Patienten zum Zeitpunkt des Androgenmangels und erschließt sich aus einer Minder- oder Dysfunktion von androgenabhängigen Funktionen bzw. Minder- oder Fehlbildung von androgenabhängigen Körperstrukturen (s. Tabelle 4).<sup>18</sup>

Tabelle 4: Symptome des Androgenmangels und des Late-onset-Hypogonadismus

<b>Symptome Androgenmangel</b>	<b>Symptome Late-onset-Hypogonadismus</b>
erektile Dysfunktion, Infertilität, kleine Hoden, verzögerte Pubertät	erektile Dysfunktion
verminderte Libido	Libidoverlust
verminderte Körperbehaarung	Körperhaarverlust
Hitzewallungen, Gynäkomastie	Hitzewallungen
Rückgang der fettfreien Körpermasse und Muskelstärke, viszerale Fettleibigkeit	Sarkopenie
Osteoporose	Knochenmasse vermindert
Stimmungsschwankungen, Erschöpfung, Aggressivität	Depression, Erschöpfung
metabolisches Syndrom, Diabetes mellitus, verminderte kognitive Funktion	

### 1.7.3 Therapie

Die Testosteronsubstitution stellt die Therapie des Hypogonadismus dar. Diese wird durchgeführt, sofern keine Kontraindikationen wie bspw. ein Prostata- oder ein männliches Mammakarzinom vorliegen. Die Substitution kann mittels oraler, intramuskulärer oder transdermaler Applikation von Testosteronpräparaten erfolgen.<sup>18,68</sup>

### 1.8 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit ist die *ex vivo*-Untersuchung des Zusammenhangs von Testosteron mit dem Vorliegen von CD4+CD25+Foxp3+ Treg-Zellen und anderen Immunzellenpopulationen im humanen Blutserum.

Tregs spielen eine wichtige Rolle bei inflammatorischen und autoimmunen Prozessen. Foxp3 wird als X-Chromosom-ständiges Tumor-Suppressor-Gen beschrieben und gilt als ein Hauptregulator von Tregs. Im Prostatakarzinom zeigt sich häufig eine Mutation des Foxp3-Gens.<sup>59</sup>

In Studien von Fijak et al. 2011 wurde im Rattenmodell erstmals bewiesen, dass Testosteron *in vitro* die Generierung von Foxp3<sup>+</sup> Treg-Zellen stimuliert, welche wiederum eine supprimierende Wirkung auf die Proliferation von aktivierten T-Zellen haben.<sup>25</sup> In *ex-vivo*-Vorversuchen in humanen Blutzellen konnte gezeigt werden, dass Testosteron und DHT die Differenzierung von Foxp3 in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen stimulieren. Darüber hinaus führte eine Stimulierung humaner T-Zellen mit Androgenen zu einer Interaktion zwischen dem Androgenrezeptor und einem untranslatierten Bereich des Foxp3-kodierenden Gens und zur Differenzierung der Tregs. Bei Frauen zeigte sich zudem eine statistisch signifikante konzentrationsabhängige Entstehung von Tregs, was sich bei Männern interessanterweise nicht nachweisen ließ.<sup>94</sup>

Zukünftig könnte der medikamentöse Einsatz von Testosteron zur Beeinflussung von systemisch wirksamen Tregs ein möglicher Therapieansatz in der Behandlung von Entzündungsprozessen, Autoimmun- und Tumorerkrankungen darstellen.

In dieser Arbeit wird *ex vivo* anhand des Blutserums von sechs Patientengruppen das Vorliegen von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg-Zellen und weiteren Immunzellpopulationen untersucht. Die sechs Patientengruppen umfassen Prostatakarzinompatienten unterschiedlicher Tumorstadien unter laufender sowie ohne Androgendeprivationstherapie und karzinomfreie Patienten mit und ohne Testosterondefizit.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

##### Geräte

Bürker-Zählkammer

Kühlschrank 1, Bosch Economic Cooler

Kühlschrank 2, Liebherr Comfort

MACS Quant 10 Durchflusszytometer

Mikroskop CKX41

Pipetten Eppendorf Research

Waage Scout

Zentrifuge Labofuge 200

Zentrifuge Labofuge 400 R Centrifuge

##### Hersteller

Superior, Marienfeld

Bosch, Gerlingen

Liebherr, Schweiz

Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

Olympus, Hamburg

Eppendorf, Hamburg

Ohaus, USA

Heraeus, Hanau

Heraeus, Hanau

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

##### Material

Deckglas

Flow Cytometry Tubes, 5 ml

Handschuhe Micro-Touch Ultra II S Latex

Monovette Serum 7,5 ml

Monovette-EDTA  
(Ethylendiamintetraessigsäure)-KE/7,5 ml

Pipettenspitzen

Pipettenspitzen, groß

Reagiergefäß 0,5 ml

Safety-Multifly-Kanüle 0,8 x 19 mm

Serumpipetten/Transferpipetten 3,5 ml

Tubes 50 ml

Tubes 75 x 12 mm, 5 ml

Zellstoff Advanced

##### Hersteller

Superior, Marienfeld

Sarstedt, Nümbrecht

Ansell, Eresing/Buchloe

Sarstedt, Nümbrecht

Sarstedt, Nümbrecht

Sarstedt, Nümbrecht

Eppendorf, Hamburg

Sarstedt, Nümbrecht

Sarstedt, Nümbrecht

Sarstedt, Nümbrecht

Greiner, Österreich

Sarstedt, Nümbrecht

Tork, München/Mannheim

### 2.1.3 Chemikalien

#### Material

Ficoll-Paque™ PLUS, 500 ml

Trypanblau 0,4 %, 100 ml

#### Hersteller

GE Healthcare, Schweden

Gibco by life technologies, USA

### 2.1.4 Puffer und Lösungen

#### Material

EDTA 2 mM (Millimol)

Fixation/Permeabilization Concentrate,  
Solution 1

Fixation/Permeabilization Diluent, Solution 2

MACS BSA (Bovines Serumalbumin) Stock  
Solution 1:20

PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline,  
deutsch: Phosphat-gepufferte physiologische  
Kochsalzlösung)

Permeabilization Buffer

#### Hersteller

Merck, Darmstadt

eBioscience, USA

eBioscience, USA

Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

Gibco by life technologies, USA

eBioscience, USA

#### Fixierungspuffer „Fix/Perm“ (Verdünnungsfaktor 1:4):

1 Teil Fix/Perm Solution 1

3 Teile Fix/Perm Solution 2

#### MACS-Puffer:

PBS, pH 7,2

0,5 % BSA

2mM EDTA, pH 8,0

#### Waschpuffer „Perm-Wash“ (Verdünnungsfaktor 1:10):

Permeabilization Buffer

Destilliertes Wasser

### 2.1.5 Medien für die Durchflusszytometrie

#### Medium

MACSQuant® Bleach Solution

MACSQuant® Running Buffer

MACSQuant™ Storage Solution

MACSQuant™ Washing Solution

#### Hersteller

Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

### 2.1.6 Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
7-Color-Immunophenotyping Cocktail, human	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
- Anti-CD3-APC (IgG2a)	
- Anti-CD4-PerCP (IgG2a)	
- Anti-CD8-APC-Vio770 (IgG2a)	
- Anti-CD14-FITC (IgG2a)	
- Anti-CD16-PE (IgG1)	
- Anti-CD19-PE-Vio770 (IgG1)	
- Anti-CD45-VioBlue (IgG2a)	
- Anti-CD56-PE (IgG1)	
Anti-CD4-FITC, human (IgG2a)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Anti-CD25-PE, human (IgG2b)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Anti-Foxp3-APC, human and mouse (IgG1)	Miltenyi-Biotec, Bergisch-Gladbach

### 2.1.7 Isotypkontrollen und Fc-Rezeptor-Block

<b>Isotypkontrollen/ Fc-Rezeptor(FcR)-Block</b>	<b>Hersteller</b>
mouse IgG1-APC	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
mouse IgG1-PE-Vio770	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
mouse IgG2a-APC	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
mouse IgG2a-APC-Vio770	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
mouse IgG2a-FITC	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
mouse IgG2a-PerCP	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
mouse IgG2a-VioBlue	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
mouse IgG2b-PE	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
recombinant human IgG1-PE	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
FcR Blocking Reagent, human, 2 ml	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

### **2.1.8 Softwares**

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
GraphPad Prism® 6.0c	GraphPad Software Inc., USA
MACSQuantify™ Software 2.5	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Microsoft® Excel, Word, PowerPoint 2011	Microsoft Corporation, USA
Mendeley Desktop, Version 1.19.8	Mendeley Ltd., UK

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Patienten und Ausschlusskriterien**

In die Studie wurden Ergebnisse von insgesamt 63 Patienten eingeschlossen. Es handelt sich um Männer mit erniedrigten Testosteronwerten, bedingt durch einen Hypogonadismus, idiopathisch oder im Rahmen einer antiandrogenen Prostatakarzinomtherapie, sowie um Prostatakarzinompatienten ohne ADT und gesunde Männer als Kontrollprobanden. Alle Studienteilnehmer waren Patienten der Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Sie besuchten am Tag der Studienteilnahme die andrologische Sprechstunde, die Tumorsprechstunde oder die allgemeine Sprechstunde in der urologischen Ambulanz, oder befanden sich in der onkologischen Tagesklinik. In die Studie wurden auch wenige stationäre Patienten eingeschlossen.

Ausschlusskriterien, die zur Nicht-Teilnahme oder zum nachträglichen Ausschluss aus der Studie führten, waren akute Infektionen, chronische Infektionskrankheiten, Infekte, Fieber, stark erhöhte Entzündungswerte oder nicht die Prostata betreffende, akute Krebsleiden. Niereninsuffiziente, dialysepflichtige Patienten sowie Patienten, die sich zum Zeitpunkt der Befragung einer Bestrahlungstherapie oder Chemotherapie unterzogen oder wenn diese nicht lange Zeit zurücklag (Bestrahlung < 1 Monat, Chemotherapie < 1 Monat), wurden ebenfalls aus der Studie ausgeschlossen. Patienten, die testosteronsupplementierende Medikamente einnahmen, wurden ebenfalls aus der Studie ausgeschlossen. Die Patienten wurden hierzu ausführlich befragt und füllten teilweise einen Fragenbogen (s. Anhang) bzgl. der oben genannten Kriterien aus.

Die Patienten wurden in sechs Patientengruppen eingeteilt.

1. Bei den Patienten der ersten Patientengruppe handelte es sich um Männer, die durch einen erniedrigten Testosteronwert auffielen und zum Teil von einem symptomatischen Hypogonadismus betroffen waren. Ein Großteil von ihnen kam am Tag der

Studienteilnahme zur andrologischen Sprechstunde in die urologische Ambulanz. Zudem wurden stationäre Patienten, die sich zur TESE (testikuläre Spermienextraktion) in stationärer Behandlung befanden, in die Studie einbezogen.

2. Die zweite Patientengruppe umfasst an lokalem bzw. lokal fortgeschrittenem Prostatakarzinom erkrankte Männer, die zum Zeitpunkt der Studienteilnahme unter ADT standen. Die meisten dieser Patienten besuchten am Tag der Studienteilnahme die Tumorsprechstunde in der urologischen Ambulanz oder die onkologische Tagesklinik, wenige waren stationär aufgenommene Patienten.

3. In der dritten Patientengruppe befanden sich an metastasiertem, androgensensitiven Prostatakarzinom erkrankte Männer unter ADT. Die meisten dieser Patienten waren am Tag der Studienteilnahme Patienten in der onkologischen Tagesklinik oder besuchten die urologische Ambulanz oder waren stationär aufgenommene Patienten.

4. Die vierte Patientengruppe umfasste an Prostatakarzinom erkrankte Männer, deren Prostatakarzinom bereits kastrationsresistent geworden war. Aufgrund der fortgeführten androgenablativen Therapie war auch ihr Testosteronwert stark unter der Norm erniedrigt. Diese Testosteronsuppression (mit Nachweis von einem Testosteronspiegel im Kastrationsbereich von möglichst  $< 50$  ng/dl) verhinderte jedoch nicht mehr die Tumorprogression, sodass man hier von Kastrationsresistenz spricht. Dies ist nach EAU (European Association of Urology)-Leitlinie der Fall, wenn ein PSA-Anstieg in drei Blutentnahmen, welche in mindestens wöchentlichem Abstand erfolgt sein müssen, mit zweimaligem Anstieg um 50 % über den Nadir und einem PSA-Wert von  $> 2$  ng/ml, verifiziert werden konnte. Dann wird von einem biochemischen Progress gesprochen. Alternativ definiert ein kastrationsresistentes Tumorstadium einen bildmorphologisch nachgewiesenen Tumorprogress im Sinne von mindestens zwei neu aufgetretenen Knochenmetastasen oder mit Nachweis von neuen oder zunehmenden Weichteilmetastasen.<sup>22</sup> Auch diese Patienten befanden sich am Tag der Studienteilnahme auf Station, in der onkologischen Sprechstunde oder in der onkologischen Tagesklinik.

5. Die fünfte Patientengruppe bestand aus männlichen Kontrollpatienten ohne Prostatakarzinom. Es waren Patienten, die am Tag der Studienteilnahme zu einer Routineuntersuchung in die urologische Ambulanz zur Sprechstunde kamen, bspw. im Rahmen einer Miktionsproblematik (Lower Urinary Tract Symptoms, LUTS; deutsch: Symptome des unteren Harntrakts) bei benigner Prostatahyperplasie (BPH).

6. In der sechsten Patientengruppe handelte es sich ebenfalls um Kontrollpatienten, hier jedoch um Prostatakarzinompatienten, welche keine hormonablative Therapie erhielten und somit teilweise auch einen normwertigen Testosteronwert aufwiesen. Auch sie waren am Tag der Studienteilnahme Patienten in der Urologie der Uniklinik Gießen, entweder ambulant in der Tumorsprechstunde oder stationär aufgrund einer anstehenden oder erfolgten Diagnostikmaßnahme.

### **2.2.2 Rechtliches**

Die Studie wurde von der Ethik-Kommission am Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen geprüft und genehmigt (AZ 25/14).

Alle beteiligten Patienten wurden über das Studienvorhaben, Prozedere und über mögliche Risiken einer Blutentnahme mündlich und schriftlich anhand des Aufklärungsbogens aufgeklärt und gaben ihre Zustimmung in mündlicher und schriftlicher Form. Die Patientenproben und Datensätze wurden anonymisiert und nach Datenschutzvorschriften vertraulich behandelt.

### **2.2.3 Blutentnahme und Messung des Testosteronwerts**

Jedem Studienteilnehmer wurde Blut abgenommen, um den Testosteronwert bestimmen zu lassen und die Immunzellfärbungen durchzuführen. Dafür wurden zwei Blutentnahmeröhrchen benötigt: Für die Messung des Testosteronwertes wurde das Blut in einer Serum-Monovette abgenommen, für die Gewinnung von PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell(s), deutsch: mononukleare Zelle(n) des peripheren Blutes) und die darauffolgende Färbung dieser im Institut für Anatomie und Zellbiologie, AG Reproduktionsbiologie, JLU Gießen, wurde eine große EDTA-Monovette (7,5 ml) verwendet.

Um Vergleichbarkeit herzustellen und Fehlerquellen zu vermeiden wurden bei jeder Blutentnahme und Probenbearbeitung folgende Kriterien eingehalten:

Die Blutentnahme der Studienteilnehmer erfolgte aufgrund der zirkadianen Rhythmik des Testosteronserumspiegels im Laufe der ersten Tageshälfte (in der Regel vor 11:30 Uhr). Es wurde zudem immer dasselbe Blutentnahmeset, bestehend aus einer Safety-Multifly-Kanüle und Monovetten der Marke Sarstedt, verwendet. Die Blutentnahme erfolgte nach Hygienevorschrift. Alle Testosteronwerte wurden im Zentrallabor der Uniklinik Gießen bestimmt. Die Testosteronwerte wurden entweder am

selben Tag der Blutentnahme im Zentrallabor bestimmt. Bei späterer Bestimmung wurden die Blutproben erst zentrifugiert, um so das Blutserum von den festen Blutbestandteilen abzutrennen, und den Überstand (Serum) bei unter  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  einzufrieren. Nach einmaligen Einfrieren und Auftauen wurde dann die Testosteronbestimmung durchgeführt.

#### **2.2.4 Allgemeines zum experimentellen Teil dieser Arbeit**

Die experimentellen Untersuchungen der Blutproben der Studienteilnehmer erfolgten am Tag der Blutentnahme im Institut für Anatomie und Zellbiologie Gießen. Das hierfür benötigte, in EDTA-Röhrchen abgenommene, heparinisierte, venöse Vollblut der Teilnehmer wurde bei Raumtemperatur von der Uniklinik Gießen zum Institut für Anatomie und Zellbiologie Gießen transportiert. Hier wurde es umgehend unter einheitlichen und geeigneten Bedingungen bearbeitet: PBMC wurden aus den Vollblutproben isoliert, gezählt, mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern angefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

#### **2.2.5 Isolierung von PBMC**

Aus dem frischen, heparinisierten, venösen Vollblut wurden PBMC mithilfe der Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Hierfür wurde das Blut im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt und in ein 50 ml-Röhrchen über Ficoll (Dichtegradient im Verhältnis: 2 Volumen Blutgemisch, 1 Volumen Ficoll) gegeben. Es entstanden dabei zwei übereinanderliegende Schichten (unten Ficoll, oben Blut-PBS-Gemisch; s. Abbildung 3). Dieses Röhrchen wurde nun vorsichtig samt Inhalt gewogen und nach Herstellung eines genauen Gegengewichtsausgleichs in Form eines mit Wasser gefüllten 50 ml-Tubes 30 Minuten bei Raumtemperatur und  $400\text{ g}$  (Erdbeschleunigung  $g = 9,81\text{ m/s}^2$ ) ohne Bremse zentrifugiert. Nach Dichtegradientenzentrifugation bildeten sich dabei drei gut voneinander abgrenzbare Schichten: Unten entstand ein Pellet aus Erythrozyten und Granulozyten, darüber schichtete sich Ficoll, ganz oben befand sich Blutplasma. Zwischen Ficoll und Blutplasma bildete sich eine ringförmige Interphase, welche aus PBMC bestand. Dieser PBMC-enhaltende Ring konnte nun mithilfe einer sterilen Serumpipette abgetragen und in ein neues Gefäß überführt werden. Dieses wurde nun zweimal mit PBS in der Zentrifuge gewaschen (bei  $350\text{ g}$  und  $225\text{ g}$ ). Dabei wurde jeweils der bei der

Zentrifugation entstehende Überstand verworfen und das PBMC-Pellet in PBS resuspendiert.

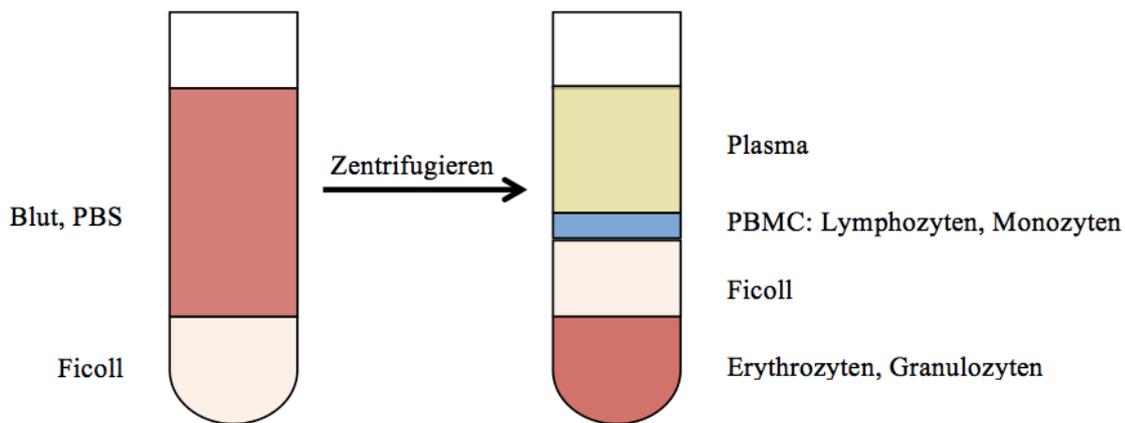


Abbildung 3: Isolation von PBMC aus humanem Blut

### 2.2.6 Zählen und Waschen der isolierten PBMC

Im nächsten Schritt wurden 10  $\mu$ l aus der PBMC-Suspension entnommen und in ein mit 90  $\mu$ l 0,4 %-Trypanblau befülltes Eppendorfgefäß im Verhältnis vermengt (Verdünnungsfaktor 1:10). Die Färbung mit Trypanblau führte dazu, dass tote Zellen dargestellt werden konnten, da sie sich aufgrund von Zellmembranschäden blau färben und so unter dem Mikroskop von lebenden, nicht farbstoffaufnehmenden Zellen zu unterscheiden sind. Diese nun blaugefärbte Zellsuspension wurde auf die Bürker-Zählkammer aufgetragen und unter dem Mikroskop anhand der Zählkammer-Quadrate ausgezählt. Die Bürker-Zählkammer ist in neun Großquadrate unterteilt, welche durch Dreifachlinien voneinander abgetrennt sind. Die Großquadrate unterteilen sich in 16 kleinere Quadrate. Es wurden die lebenden Zellen innerhalb von zwei bis vier Großquadraten ausgezählt inklusive all derer Zellen, die die obere und rechte Begrenzung berühren; ausgeschlossen wurden die Zellen, die die linke und untere Begrenzung berühren. Mindestens 100 Zellen wurden ausgezählt. Hiernach wurde der Mittelwert (M) gebildet und unter Berücksichtigung des Faktors der Bürker-Zählkammer ( $B = 10^4$ ) und des Verdünnungsfaktors ( $V = 10^1$ ) die Zellzahl pro ml (N) ermittelt:  $N = M \times 10^4 \times 10^1$ .

Nach Ermittlung der Anzahl an PBMC/ml wurden pro Probandenprobe sechs Reagenzgefäße (5 ml) mit jeweils  $1 \times 10^6$  bzw.  $5 \times 10^5$  PBMC für die Immunphänotypisierungs- bzw. Treg-Färbung befüllt, in MACS-Puffer für zehn

Minuten bei 300 g gewaschen und der Überstand dekantiert. Hiernach folgen die Schritte der Immunophänotypisierungs- bzw. Treg-Färbung.

### **2.2.7 Immunzellfärbungen und ihre Kontrollen**

Um die für diese Studie wichtigen Immunzellarten mit dem Durchflusszytometer detektieren zu können, wurden zellspezifische Oberflächenproteine sowie der intrazellulär gelegene Transkriptionsfaktor Foxp3 mithilfe von Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper markiert. Im Rahmen des ersten Experiments, der Immunophänotypisierungsfärbung, wurden auf diese Weise mehrere Immunzellpopulationen wie bspw. B-Zellen angefärbt. In dem zweiten Experiment, der Treg-Färbung, wurde das Hauptaugenmerk auf das Markieren von T-Zellen, insbesondere von CD4+CD25+Foxp3+ Treg-Zellen, gelegt.

Da es zu unspezifischen Antikörperbindungen kommen kann bzw. um die Spezifität der markierenden Antikörper zu überprüfen, wurden sowohl Negativ-Kontrollen (keine Färbung) als auch Isotypkontrollen in entsprechender Konzentration angefertigt. Der bei einer Isotypkontrolle verwendete Antikörper entspricht demselben Subtyp wie der markierende Antikörper, bindet allerdings nicht spezifisch an das untersuchte Antigenepitop und kann somit keine spezifische Färbung darstellen. Ein weiterer Schritt, um die Spezifität der Antikörperfärbungen zu überprüfen, stellt die Verwendung eines FcR-Block-Reagenzes dar. Es verhindert das unspezifische Binden der Fluoreszenzantikörper an FcR-exprimierende Zellen wie z. B. B-Zellen, Monozyten oder Makrophagen.

### **2.2.8 Immunophänotypisierungsfärbung**

Im Zuge der Immunophänotypisierungsfärbung wurden verschiedene Immunzellpopulationen anhand ihrer Oberflächenproteine identifiziert. Diese sowie die hierzu verwendeten Antikörper und Isotypkontrollantikörper können Tabelle 5 entnommen werden.

Tabelle 5: Verwendete Antikörper für die Immunophänotypisierungsfärbung

<b>Oberflächen-protein</b>	<b>Antikörper (human)</b>	<b>Isotypkontroll-antikörper</b>	<b>Zelltyp</b>
CD3	Anti-CD3-APC	mouse IgG2a-APC	T-Zellen
CD4	Anti-CD4-PerCP	mouse IgG2a-PerCP	CD4+ T-Zellen
CD8	Anti-CD8-APC-Vio770	mouse IgG2a-APC-Vio770	CD8+ T-Zellen
CD14	Anti-CD14-FITC	mouse IgG2a-FITC	Monozyten
CD16	Anti-CD16-PE	recombinant human IgG1-PE	Neutrophile NK-Zellen NKT-Zellen
CD19	Anti-CD19-PE-Vio770	mouse IgG1-PE-Vio770	B-Zellen
CD45	Anti-CD45-VioBlue	mouse IgG2a-VioBlue	Leukozyten
CD56	Anti-CD56-PE	recombinant human IgG1-PE	NK-Zellen NKT-Zellen

Pro Patientenprobe wurden jeweils drei Röhrchen mit  $5 \times 10^5$  PBMC-Suspension präpariert. In den folgenden Schritten wurden die PBMC des ersten Röhrchens nicht, die des zweiten mit fluoreszierenden Antikörpern und die des dritten Röhrchens mit Isotypkontrollantikörpern angefärbt (s. Tabelle 6).

Tabelle 6: Protokoll Immunophänotypisierungsfärbung

Probe Nr.	1	2	3
Probentyp	Ungefärbt	Gefärbt	Isotypkontrolle
$5 \times 10^5$ PBMC in Röhrchen geben	$5 \times 10^5$ PBMC	$5 \times 10^5$ PBMC	$5 \times 10^5$ PBMC
MACS-Puffer hinzufügen	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l

Antikörper/ Isotypkontroll- antikörper hinzufügen (Verdünnungs- faktor 1:11)	-	5 µl Immunophenotyping- Cocktail	Je 5 µl Isotypkontroll- antikörper
Mischen, inkubieren	-	Gut mischen, 10 Minuten inkubieren im Dunkeln bei 2-8 °C	
MACS-Puffer hinzufügen	1 ml	1 ml	1ml
Zentrifugieren: 300 g, 10 Minuten, 4 °C			
Überstand dekantieren			
MACS-Puffer hinzufügen	200 µl	200 µl	200 µl

### 2.2.9 Treg-Färbung

Aktuell existiert kein spezifischer Marker für CD4+CD25+Foxp3+ Treg-Zellen. Zur Identifikation dieser Zellen wurde daher die Kombination verschiedener Marker verwendet: Oberflächlich wurden die Proteine CD4 und CD25 sowie intrazellulär der Transkriptionsfaktor Foxp3 angefärbt (s. Tabelle 7).

Tabelle 7: Verwendete Antikörper für die Treg-Färbung

<b>Oberflächen- protein</b>	<b>Antikörper</b>	<b>Isotypkontroll- antikörper</b>	<b>Zelltyp</b>
CD4	Anti-CD4-FITC, human	mouse IgG2a- FITC	CD4+ T-Zellen
CD25	Anti-CD25-PE, human	mouse IgG2b-PE	CD25+ T-Zellen
<b>Transkrip- tionsfaktor</b>	<b>Antikörper</b>	<b>Isotypkontroll- antikörper</b>	<b>Zelltyp</b>
Foxp3	Anti-Foxp3-APC, human and mouse	mouse IgG1-APC	CD4+CD25+Foxp3+ Treg-Zellen

Der Ablauf des Experiments teilt sich in die Färbung der oberflächlichen Proteine CD4 und CD25 (s. Kapitel 2.2.9.1) und in die Färbung des intrazellulären Transkriptionsfaktors Foxp3 (s. Kapitel 2.2.9.2).

### 2.2.9.1 Färbung der Oberflächenproteine: CD4 und CD25

Pro Patientenprobe wurden jeweils drei Röhrchen mit  $1 \times 10^6$  PBMC-Suspension befüllt. In den folgenden Schritten wurden die PBMC des ersten Röhrchens nicht, die des zweiten mit fluoreszierenden Antikörpern und die des dritten Röhrchens mit entsprechenden fluoreszierenden Isotypkontrollantikörpern angefärbt (s. Tabelle 8).

Tabelle 8: Protokoll Oberflächenfärbung Tregs

Probe Nr.	1	2	3
Probentyp	Ungefärbt	Gefärbt	Isotypkontrolle
$1 \times 10^6$ PBMC in Röhrchen geben	$1 \times 10^6$ PBMC	$1 \times 10^6$ PBMC	$1 \times 10^6$ PBMC
MACS-Puffer hinzufügen	90 $\mu$ l	90 $\mu$ l	90 $\mu$ l
Keine Zugabe/ Zugabe von Antikörpern bzw. Isotypkontrollantikörpern	-	10 $\mu$ l Anti-CD4-FITC 10 $\mu$ l Anti-CD25-PE	10 $\mu$ l mouse IgG2a-FITC 10 $\mu$ l mouse IgG2b-PE
Mischen, inkubieren	-	Gut mischen, 10 Minuten inkubieren im Dunkeln bei 2-8 °C	
MACS-Puffer hinzufügen	1 ml	1 ml	1 ml
Zentrifugieren: 300 g, 5 Minuten, 4 °C			
Überstand dekantieren			

### 2.2.9.2 Intrazelluläre Färbung: Foxp3

Da der Transkriptionsfaktor intrazellulär liegt, muss die Zellmembran permeabilisiert werden. Dazu wurden die Zellen mit einer FixPerm-Lösung bearbeitet und anschließend mit einem entsprechenden PermWash-Puffer gewaschen (s. Tabelle 9).

Tabelle 9: Protokoll Intrazelluläre Färbung Tregs

Probe Nr.	1	2	3
Probentyp	Ungefärbt	Gefärbt	Isotypkontrolle
FixPerm hinzufügen	1 ml	1 ml	1 ml
Gut mischen, 30 Minuten inkubieren im Dunkeln bei 2-8 °C			
MACS-Puffer hinzufügen	1 ml	1 ml	1 ml
Zentrifugieren: 300 g, 5 Minuten, 4 °C			
Überstand dekantieren			
PermWash hinzufügen	1 ml	1 ml	1 ml
Zentrifugieren: 300 g, 5 Minuten, 4 °C			
Überstand dekantieren			
MACS-Puffer hinzufügen	300 µl	-	-
PermWash hinzufügen	-	80 µl	80 µl
FcR-Block hinzufügen	-	20 µl	20 µl
Mischen und inkubieren	-	Gut mischen, 5 Minuten inkubieren, 2-8 °C	
Keine Zugabe/ Zugabe von Antikörpern/ Zugabe von Isotypkontrollantikörpern	-	10 µl Anti-Foxp3-APC	10 µl mouse IgG1-APC
Mischen und inkubieren	-	Gut mischen, 30 Minuten inkubieren im Dunkeln bei 2-8 °C	
PermWash hinzufügen	-	1 ml	1 ml
Zentrifugieren	-	Zentrifugieren: 300 g, 5 Minuten, 4 °C	
Überstand dekantieren	-	Überstand dekantieren	

MACS-Puffer hinzufügen	-	300 µl	300 µl
---------------------------	---	--------	--------

### 2.2.10 Analyse der Immunzellpopulationen mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein optisches Verfahren zur Analyse von verschiedenen Zellsubpopulationen. Zur Bestrahlung der zu untersuchenden Zelle dient ein Laser als Lichtquelle. Um jeweils nur eine einzelne Zelle aus der zu untersuchenden Zellsuspension zu bestrahlen, bedarf es der sogenannten hydrodynamischen Fokussierung: Mithilfe eines laminar fließenden Hüllstroms wird jeweils nur eine einzige Zelle durch eine enge Kapillare geleitet und so auf einen geringen Kapillarquerschnitt hydrodynamisch fokussiert. Beim Durchfluss trifft das Laserlicht auf die einzelne Zelle. Eine Photovervielfältigerröhre detektiert das reflektierte Licht und wandelt es in einen Spannungsimpuls um, wie in Abbildung 4 dargestellt ist.<sup>30,61,84</sup>

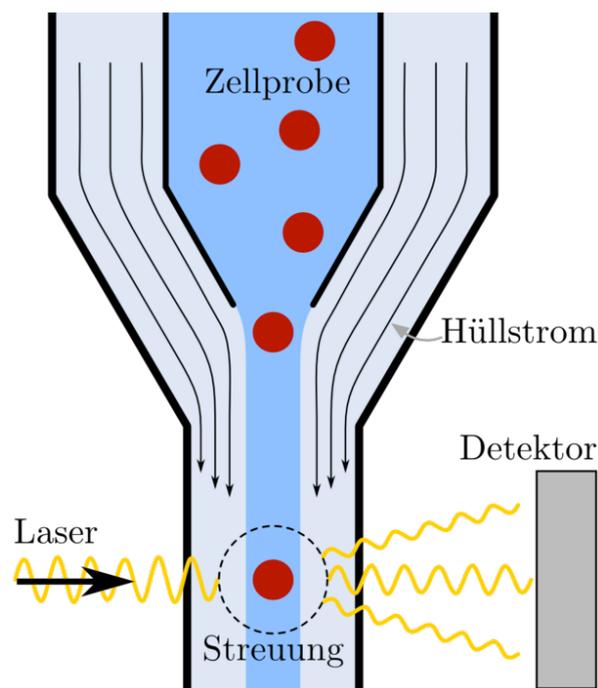


Abbildung 4<sup>30</sup>: Funktionsprinzip des Durchflusszytometers: Im Durchflusszytometer trifft der Laserstrahl mithilfe des Hüllstroms auf eine einzelne Zelle (hydrodynamische Fokussierung), sodass es zu einer zellspezifischen Lichtstreuung kommt, welche dann mithilfe des Detektors, einer Photovervielfältigerröhre, in einen Spannungsimpuls umgewandelt wird. Quelle: Gienger JC. Schemazeichnung zur Funktionsweise eines optischen Durchflusszytometers. <https://www.ptb.de/cms/ptb/fachabteilungen/abt8/fb-84/ag-841/flowzytometrie-841.html>. Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Jonas Constantin Gienger und Prof. Dr. Markus Bär.

Anhand der Lichtbeugung (Vorwärtsstreulicht, englisch: Forward Scatter, FSC) wird die Größe und anhand der Lichtbrechung (Seitwärtsstreulicht, englisch: Side Scatter,

SSC) die Granularität und Form der Zelle bestimmt. Auf diese Weise werden Zelltrümmer (Debris) und Zellarten wie Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten voneinander unterschieden und ihre Anzahl ermittelt. Um innerhalb dieser Zellarten Untergruppen zu bestimmen, bspw. T-Lymphozyten, benötigt man Fluorochrom-konjugierte Antikörper (s. Kapitel 3.2). Diese fluoreszierenden Farbstoffe werden durch Absorption von Laserstrahlen angeregt. Es kommt zur Photonen- bzw. Lichtemission einer spezifischen Wellenlänge, anhand derer Zelluntergruppen voneinander differenziert werden können.<sup>30,61,84</sup>

Nach den vorangegangenen Färbungen in der PBMC-Suspension wurde die Durchflusszytometrie zur Detektion und Quantifizierung von Tregs und weiteren Immunzellarten durchgeführt.

### 2.2.11 Statistik

Die statistische Analyse und graphische Darstellung wurde mithilfe der Programme GraphPad Prism® 6.0c und Microsoft® Excel 2011 durchgeführt. Es wurden Median, Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler (SEM, englisch: Standard Error of the Mean) der einzelnen Patientengruppen berechnet. Da die Gruppenwerte nicht alle normalverteilt waren (Überprüfung mittels Shapiro-Wilk-Test) und das Vorkommen von Immunzellen im Blut keiner Normalverteilung unterliegt, erfolgten nicht parametrische statistische Tests. Wurden Daten von mehr als zwei unabhängigen Gruppen analysiert, erfolgte die statistische Analyse mittels Kruskal-Wallis-Test. Sofern Daten zweier unabhängiger Gruppen verglichen wurden, wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Es wurde somit überprüft, ob sich die Mittelwerte der verschiedenen Patientengruppen signifikant unterscheiden. Als Post-hoc-Test zum Gruppenvergleich und Vergleich der Rangsummen zweier Gruppen diente der Dunn's Multiple Comparison Test. Das Signifikanzniveau wurde für alle Auswertungen gleichermaßen anhand des mathematischen p-Werts („p“ für „probabilitas“, deutsch: Wahrscheinlichkeit) festgelegt, s. Tabelle 10.

Tabelle 10: Einteilung des Signifikanzniveaus

<b>p-Wert</b>	<b>Signifikanzniveau</b>	<b>Abkürzung</b>
$p > 0,05$	nicht signifikant	n.s.
$p \leq 0,05$	signifikant	*
$p \leq 0,01$	sehr signifikant	**
$p \leq 0,001$	hoch signifikant	***
$p \leq 0,0001$	höchst signifikant	****

Zusammenhänge zwischen Testosteronwerten und Zellzahlen verschiedener Immunzellpopulationen wurden anhand der Spearman-Korrelation und Berechnung des Korrelationskoeffizient  $r_s$  ausgewertet (s. Tabelle 11). Der Korrelationskoeffizient  $r_s$  nimmt Werte zwischen -1 und +1 an. Ist  $r_s < 0$ , besteht ein negativer, ist  $r_s > 0$ , besteht ein positiver Zusammenhang, ist  $r_s = 0$ , besteht kein Zusammenhang zwischen den ausgewerteten Daten.

Tabelle 11: Interpretation des Korrelationskoeffizienten  $r_s$

<b>Korrelationskoeffizient <math>r_s</math></b>	<b>Zusammenhangsniveau</b>
$0,0 \leq r_s \leq 0,2$	kein bis geringer Zusammenhang
$0,2 < r_s \leq 0,5$	schwacher bis mäßiger Zusammenhang
$0,5 < r_s \leq 0,8$	deutlicher Zusammenhang
$0,8 < r_s \leq 1,0$	hoher Zusammenhang

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Patientengruppen

Im Rahmen dieser Studie wurden die Daten von 63 Patienten, sechs verschiedener Patientengruppen, analysiert (s. Tabelle 12). Alle Studienteilnehmer waren Patienten der Urologie, Kinderurologie und Andrologie des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Florian Wagenlehner. Sie befanden sich am Tag der Studienteilnahme in der allgemeinen, andrologischen oder onkologischen Sprechstunde, in der onkologischen Tagesklinik oder auf der urologischen Normalstation. Ausschlusskriterien waren akute Infektionen, chronische Infektionskrankheiten, akute Krebsleiden neben dem Prostatakarzinom, dialysepflichtige Patienten oder Patienten unter Testosteronsubstitution. Patienten, die sich akut oder erst kürzlich in Chemotherapie (< 1 Monat) oder Bestrahlungstherapie (< 1 Monat) befanden, wurden aus der Studie ausgeschlossen. Die experimentellen Untersuchungen wurden unter der Leitung von Frau Dr. hum. biol. Monika Fijak im Labor des Instituts für Anatomie und Zellbiologie des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen (Direktor Herr Prof. Dr. Andreas Meinhardt) durchgeführt.

Tabelle 12: Übersicht der Patientengruppen 1-6

<b>Gruppe 1</b>	Patienten ohne Prostatakarzinom, die durch einen erniedrigten Testosteronspiegel auffielen (idiopathischer Genese, unter Hypogonadismus leidende Patienten inklusive Klinefelter-Syndrom-Patienten)
<b>Gruppe 2</b>	Patienten mit lokalem bzw. lokal fortgeschrittenem, hormonsensiblen Prostatakarzinom unter ADT
<b>Gruppe 3</b>	Patienten mit metastasiertem, hormonsensiblen Prostatakarzinom unter ADT
<b>Gruppe 4</b>	Patienten mit kastrationsresistentem Prostatakarzinom unter ADT (metastasiert und nicht-metastasiert)
<b>Gruppe 5</b>	Kontrollpatienten ohne Prostatakarzinom mit normwertigem Testosteronspiegel
<b>Gruppe 6</b>	Kontrollpatienten mit Prostatakarzinom ohne ADT mit norm- oder nicht-normwertigem Testosteronspiegel

### 3.1.1 Charakteristika der Patientengruppe 1

Die Patientengruppe 1 umfasst Patienten, die sich elektiv in einer der urologischen Sprechstunden, bspw. der andrologischen oder allgemeinen, in der urologischen Ambulanz vorstellten (s. Tabelle 13). Eingeschlossen wurden ebenso Patienten, die elektiv aufgrund eines kleinen operativen Eingriffs, wie bspw. der TESE, auf der urologischen Normalstation behandelt wurden und durch einen erniedrigten Testosteronwert auffielen.

Tabelle 13: Patientengruppe 1: Patienten ohne Prostatakarzinom, die durch einen erniedrigten Testosteronspiegel auffielen.

Patient	Alter (Jahre)	Testosteronwert (ng/dl)	Symptomatik	Anmerkung
1	51	198	Einzelhoden nach Semikastration bei Z. n. (Zustand nach) Seminom, Azoospermie, Chronisches Beckenschmerzsyndrom (englisch: Chronic Pelvic Pain Syndrome, CPPS)	Immunophänotypisierungsfärbung nicht vorhanden
2	40	261	LUTS; idiopathischer Testosteronmangel	
3	29	127	hypergonadotroper Hypogonadismus, Azoospermie, AZF (Azoospermiefaktor)c-Deletion des Y-Chromosoms	
4	41	88	hypergonadotroper Hypogonadismus mit Testosterondefizit und Hodenatrophie, nicht-obstruktive Azoospermie bei Z. n. Mumpsorchitis	Z. n. Clomifencitrat-Einnahme, abgesetzt ca. vier Tage vor Studienteilnahme
5	43	129	Klinefelter-Syndrom, Azoospermie	
6	56	184	Altershypogonadismus, normogonadotrop mit deutlichem Testosterondefizit, Depression	
7	44	164	hypogonadaler Hypogonadismus, Infertilität	
8	61	148	hypogonadaler Einzelhoden bei Z. n. Leistenhodenentfernung, Z. n. Samenstranginfiltration und Neurolyse	
9	52	166	Hodenatrophie beidseits, Penisdeviation im Rahmen einer Hypospadie	

10	48	157	Klinefelter-Syndrom	
11	49	159	Testosterondefizit, Verschlussazoospermie beidseits, Z. n. Epididymitis beidseits	
12	45	161	Hypogonadismus, erektile Dysfunktion, Schilddrüsenunterfunktion, Fibromyalgie	
13	64	178	idiopathischer Testosteronmangel	Blutentnahme um 12.45 Uhr
14	72	241	idiopathischer Testosteronmangel, BPH	
15	58	274	idiopathischer Testosteronmangel, IPP (Induratio Penis Plastica)	
<b>Mittelwerte Gruppe 1:</b>				
	50,2	175,67		

### 3.1.2 Charakteristika der Patientengruppe 2

Die zweite Patientengruppe wird gebildet von an lokalem bzw. lokal fortgeschrittenem, hormonsensiblen Prostatakarzinom erkrankten Patienten unter antiandrogener Therapie, welche sich am Tag der Studienteilnahme in der urologischen Ambulanz oder auf urologischer Normalstation befanden (s. Tabelle 14). Nach operativer Therapie des Prostatakarzinoms mittels radikaler Prostatektomie und ggf. Lymphadenektomie ist in Abhängigkeit des Tumorstadiums bzw. der Tumorausbreitung, des Lymphknotenbefalls und des Resektionsstatus unmittelbar nach erfolgter Operation eine adjuvante Therapie (bspw. die antiandrogene oder strahlentherapeutische Therapie) notwendig oder eine PSA-getriggerte Nachsorge ausreichend. Kommt es im Rahmen der Nachsorgeuntersuchungen zu einem biochemischen Rezidiv, kann ebenfalls eine antiandrogene Therapie indiziert sein. Nach S3-Leitlinie zum Prostatakarzinom ist nach radikaler Prostatektomie von einem biochemischen Rezidiv zu sprechen, wenn in mindestens zwei Messungen der PSA-Wert  $> 0,2$  ng/ml liegt. Wurde anstelle der operativen Sanierung eine Radiotherapie durchgeführt, kennzeichnet ein postinterventioneller PSA-Wert von  $> 2$  ng/ml in mindestens zwei Messungen ein biochemisches Rezidiv.<sup>45</sup>

Tabelle 14: Patientengruppe 2: Patienten mit lokalem bzw. lokal fortgeschrittenem, hormonsensiblen Prostatakarzinom.

<b>Patient</b>	<b>Alter (Jahre)</b>	<b>Testosteronwert (ng/dl)</b>	<b>TNM-Stadium</b>	<b>Antiandrogene Therapie</b>	<b>Anmerkung</b>
1	81	29	initial pT1cN0M0 aktuell TXNXMX	Leuprorelinacetat	seit Jahren unter Therapie mit Leuprorelinacetat
2	69	32	initial pT3bpN0Pn 1cM0, R1 aktuell TXNXMX	Leuprorelinacetat	direkt nach radikaler Prostatektomie 1/2011 Leuprorelinacetat und Zoledronsäure begonnen, jedoch keine Lymphknoten- oder Fernmetastasen; PSA 0,18 ng/ml
3	73	91	initial pT3bpN0c M0 aktuell TXNXMX	Leuprorelinacetat	nach radikaler Prostatektomie adjuvante Radiatio 2002, hiernach biochemische Vollremission, dann im Verlauf Leuprorelinacetat-Therapie gestartet
4	80	31	initial und aktuell pT1cN0M0	Leuprorelinacetat	im Verlauf Therapie mit Leuprorelinacetat und Zoledronsäure gestartet
5	69	101	initial und aktuell pT3bcN0c M0	Leuprorelinacetat, Bicalutamid	antiandrogene Therapie und Zoledronsäure-Gabe bis dato intermittierend, aktuelles PSMA-PET/CT ohne Metastasen-nachweis, aktuell unter

					Leuprorelinacetat und Bicalutamid
6	80	22	initial pT1ccNXc MX aktuell TXNXMX	Leuprorelinacetat	antiandrogene Therapie und Zoledronsäure intermittierend, aktuell Leuprorelinacetat
7	80	16	TXNXMX	Leuprorelinacetat, Bicalutamid	seit ED 2003 Leuprorelinacetat, aktuell auch Bicalutamid und Zoledronsäure, keine Metastasen beschrieben, PSA 0,04 ng/ml
8	73	153	initial und aktuell pT3bcNXc M0	Leuprorelinacetat	Leuprorelinacetat begonnen, Radiotherapie geplant; Z. n. Bicalutamid-Therapie drei Wochen vor Studienteilnahme (Halbwertszeit 7 Tage)
9	87	37	initial pT1cN0M0 aktuell TXNXMX	Leuprorelinacetat	Z. n. TUR-P (transurethrale Prostatektomie), aktuell Leuprorelinacetat
<b>Mittelwerte Gruppe 2:</b>					
	76,89	56,89			

### 3.1.3 Charakteristika der Patientengruppe 3

Die Patientengruppe 3 umfasst Prostatakarzinompatienten mit einem metastasierten, hormonsensiblen Tumor unter antiandrogener Therapie (s. Tabelle 15). Auch diese Studienteilnehmer befanden sich am Teilnahmetag in der urologischen Ambulanz, auf der urologischen Station oder in der onkologischen Tagesklinik.

Tabelle 15: Patientengruppe 3: Patienten mit metastasiertem, hormonsensiblen Prostatakarzinom unter antiandrogener Therapie.

Patient	Alter (Jahre)	Testosteronwert (ng/dl)	TNM-Stadium	Antiandrogene Therapie	Anmerkung
1	83	28	initial pT4apN0c M0 aktuell TXNXM1	Leuprorelinacetat	zusätzlich Zoledronsäure
2	81	30	aktuell cT4cN1 cM1	Leuprorelinacetat, Bicalutamid	zusätzlich Denosumab
3	78	54	aktuell cT3bpN1 pM1	Leuprorelinacetat	Zusätzlich Zoledronsäure
4	73	62	aktuell pT2cpN1 cM1	Leuprorelinacetat	zusätzlich Zoledronsäure
5	79	18	aktuell pTXcN1c M1	Degarelix	zusätzlich Zoledronsäure
6	74	30	aktuell pTXcN1 cMX	Leuprorelinacetat	Z. n. Bicalutamid- Einnahme drei Monate vor Teilnahme
7	69	19	aktuell pT2ccN1 cM1	Leuprorelinacetat	zusätzlich Zoledronsäure; Z. n. Chemotherapie und ADT, aktuell nur noch ADT
<b>Mittelwerte Gruppe 3:</b>					
	76,71	34,43			

### 3.1.4 Charakteristika der Patientengruppe 4

In der vierten Patientengruppe sind Prostatakarzinompatienten eingeschlossen, deren Krebserkrankung unter antiandrogener Therapie mit nachgewiesenem Testosteronspiegel im Kastrationsbereich (möglichst < 50 ng/ml, besser < 20 ng/ml) einen Progress zeigten (s. Tabelle 16). Der Tumorprogress ist definiert durch eine neu aufgetretene Metastasierung (Weichteil- oder Knochenmetastasierung) oder durch einen konsekutiven PSA-Anstieg in mindestens drei Messungen in mindestens einwöchigem Abstand, zwei Messungen hiervon mit Nachweis eines PSA-Anstiegs von 50 % über

dem Nadir und einem PSA-Wert > 2,0 ng/ml. Die Patienten leiden somit an einem kastrationsresistenten Prostatakarzinom, welches einem fortgeschrittenen Stadium der Tumorerkrankung entspricht. Die Studienteilnehmer dieser Gruppe sind zwölf Patienten, die sich am Tag der Teilnahme in der onkologischen Sprechstunde der Urologie oder in der onkologischen Tagesklinik befanden. Neun der zwölf Patienten zeigten eine Metastasierung unter ADT, die anderen drei Patienten wiesen einen deutlichen PSA-Progress unter ADT auf. Eine Metastasierung war bei diesen Patienten bildmorphologisch (noch) nicht nachgewiesen.

Tabelle 16: Patientengruppe 4: Patienten mit kastrationsresistenten Prostatakarzinom unter antiandrogener Therapie (metastasiert und nicht-metastasiert).

Patient	Alter (Jahre)	Testosteronwert (ng/dl)	TNM-Stadium	Antiandrogene Therapie	Anmerkungen
1	62	17	aktuell pTXcNX cM1	Leuprorelinacetat, Abirateronacetat	Z. n. Progress unter ADT, dann Progress unter Chemotherapie, aktuell guter PSA-Verlauf unter Leuprorelinacetat und Abirateronacetat; erhält Zoledronsäure
2	77	118	aktuell cTXpN1 cM1	Leuprorelinacetat, Enzalutamid	Z. n. Chemotherapie, zusätzlich Zoledronsäure
3	78	14	aktuell cT4cNX cM1	Leuprorelinacetat, Abirateronacetat	Z. n. Chemotherapie, zusätzlich Zoledronsäure
4	60	37	initial pT2cpN0 cM1 aktuell TXNXM1	Leuprorelinacetat, Chemotherapie abgelehnt, weitere Therapie in Planung	nebenbefundlich Colitis ulcerosa; zusätzlich Zoledronsäure
5	80	43	aktuell cT4cN1 cM1	Leuprorelinacetat, Bicalutamid	Progress (PSA, Metastasierung) unter kompletter Androgenblockade, zusätzlich

					Zoledronsäure
6	76	27	aktuell pTXpNXc M1	Leuprorelinacetat	Z. n. Chemotherapie bis 1 Monat vor Studienteilnahme, Radium-223-Dichlorid- Therapie geplant, aktuell Zoledronsäure
7	82	19	initial pT1cN0M0 aktuell pTXNXMX	Leuprorelinacetat, Abirateronacetat	PSA-Progress unter ADT; Studienteilnahme bereits vor ca. 2 Jahren (damals Gruppe 2, Patient 4); zusätzlich Zoledronsäure
8	74	12	initial pT2bNXM XR1; aktuell TXNXM1	Leuprorelinacetat, weitere Therapie aktuell abgelehnt	Z. n. Chemotherapie und Radiatio; Knochenmetastase unter ADT; Radiatio und Denosumab abgelehnt; Ibandronsäure, nebenbefundlich Colitis ulcerosa
9	83	15	aktuell pT3bcNXc MX	Leuprorelinacetat, Abirateronacetat	Z. n. Radiatio, PSA-Progress unter ADT
10	80	50	aktuell mindestens pT1ccN0c M1	Leuprorelinacetat, Enzalutamid	
11	76	26	cTXcNXc M1	Leuprorelinacetat	
12	78	40	aktuell cTXcNXc MX	Leuprorelinacetat, Bicalutamid	PSA-Progress unter ADT, Bildgebung zum Zeitpunkt der Studienteilnahme ausstehend
<b>Mittelwerte Gruppe 4:</b>					
	75,5	34,83			

### 3.1.5 Charakteristika der Patientengruppe 5

Die fünfte Patientengruppe stellt eine Kontrollgruppe dar (s. Tabelle 17). Die Patienten leiden nicht an einem Prostatakarzinom und stellten sich ambulant zu Routineuntersuchungen, bspw. im Rahmen von Miktionsbeschwerden, CPPS, Penisdeviation oder erektiler Dysfunktion ohne Nachweis anatomischer oder hormoneller Funktionseinschränkung, vor.

Tabelle 17: Patientengruppe 5: Kontrollpatienten ohne Prostatakarzinom mit normwertigem Testosteronspiegel.

Patient	Alter (Jahre)	Testosteronwert (ng/dl)	Symptomatik und Anmerkung
1	48	310	CPPS, BPH, erhöhtes IL-8 im Ejakulat; keine Immunophänotypisierungsfärbung vorhanden
2	60	338	BPH, erniedrigtes Ejakulatvolumen, Oligoasthenozoospermie
3	63	443	CPPS
4	72	324	CPPS, LUTS, Einzelhoden nach Epididymorchitis, Einzelhoden mit regelrechtem Befund
5	51	374	CPPS
6	22	520	CPPS
7	36	401	LUTS
8	48	471	Erektile Dysfunktion
9	60	305	BPH
10	54	353	IPP
11	49	776	Erektile Dysfunktion
12	52	400	IPP
<b>Mittelwerte Gruppe 5:</b>			
	51,25	417,92	

### 3.1.6 Charakteristika der Patientengruppe 6

Die sechste Gruppe stellt eine weitere Kontrollpatientengruppe dar (s. Tabelle 18). Sie umfasst an Prostatakarzinom erkrankte Patienten, welche keine antiandrogene Therapie erhalten. Dies ist bspw. der Fall bei Patienten mit einem low risk Prostatakarzinom unter Active Surveillance oder Patienten mit einem lokalen Prostatakarzinom nach erfolgter Lokaltherapie mittels Operation oder Radiotherapie ohne Indikation zur adjuvanten antiandrogenen Therapie. Zwei der acht Patienten dieser Gruppe zeigen eine Metastasierung. Bei einem dieser Patienten wurde der Testosteron-Wert vergleichsweise spät am Tag (13.30 Uhr) abgenommen. Insgesamt sieht man, dass fünf der acht Studienteilnehmer dieser Gruppe einen Testosteronwert unterhalb der unteren

Normwertgrenze von 300 ng/dl aufweisen, ohne unter antiandrogener Therapie zu sein. Beachtet man jedoch die Werte im Einzelnen sowie den Mittelwert der Gruppe (258,5 ng/dl), ist ein deutlicher Unterschied im Vergleich zu den Patientengruppen unter antiandrogener Therapie (Gruppen 2-4) festzustellen. Der Testosteronspiegel der Gruppen 2-4 liegt bei 56,89 ng/dl bzw. 34,43 ng/dl bzw. 34,83 ng/dl. Die Patienten der sechsten Gruppe befanden sich zum Zeitpunkt der Studienteilnahme in der urologischen Ambulanz oder auf der urologischen Normalstation.

Tabelle 18: Patientengruppe 6: Kontrollpatienten mit Prostatakarzinom ohne ADT

Patient	Alter (Jahre)	Testosteronwert (ng/dl)	TNM-Stadium	Anmerkung
1	79	128	pT2aNXXM	neu diagnostiziert, weitere Diagnostik ausstehend, PSA 441 ng/ml
2	89	164	initial cT4cN1cM0 aktuell cT4N1MX	Z. n. initialer ADT-Therapie (bis 1 Jahr vor Studienteilnahme), unterbrochen aufgrund von Nebenwirkungen, nun erneut ADT geplant; Testosteronabnahme 13.30 Uhr
3	77	231	pT2cpN0cM0R1	Z. n. Radiotherapie bis vor 1,5 Monaten vor Teilnahme
4	69	414	pT2pN0cM1	Z. n. Radiotherapie (vor > 5 Jahren), Z. n. Weichteilmetastasenresektion
5	65	318	pT1cpN0cM0	Active Surveillance
6	66	274	pT2cNXcMX	Active Surveillance
7	57	229	pT2cpN0cM0	Z. n. Radiotherapie, aktuell Active Surveillance
8	78	310	TXNXXM	lokales Prostatakarzinom, Active Surveillance
<b>Mittelwerte Gruppe 6:</b>				
	72,5	258,5		

### 3.1.7 Charakteristika der Patientengruppen im Vergleich

Insgesamt wurden die Daten von 63 Patienten in diese Arbeit eingeschlossen: Männer mit erniedrigtem Testosteronwert wie bspw. unter Hypogonadismus leidende Patienten (Gruppe 1), Prostatakarzinompatienten in unterschiedlichen Tumorstadien unter ADT (Gruppen 2-4) und Kontrollgruppen wie Patienten mit normwertigem Testosteronspiegel (Gruppe 5) und Prostatakarzinompatienten ohne ADT (Gruppe 6). In

dieser Studie wurde mit zwei Kontrollpatientengruppen gearbeitet, um eine bestmögliche Vergleichbarkeit zwischen Patienten mit und ohne Prostatakarzinom, sowie zwischen den zwei vorherrschenden Altersgipfeln im Patientenkollektiv herzustellen: Gruppe 5 umfasst Patienten ohne Prostatakarzinom und normwertigem Testosteronspiegel mit einem Durchschnittsalter von circa 50 Jahren, welches vergleichbar ist mit dem Durchschnittsalter der Gruppe 1 (circa 51 Jahre), während Gruppe 6 Prostatakarzinompatienten ohne antiandrogene Therapie mit durchschnittlichem Alter von 72,5 Jahren einschließt und somit den Prostatakarzinompatientengruppen unter ADT (Gruppen 2-4) mit Durchschnittsaltern von 75-77 Jahren ähnelt.

Die Patientenzahl, das durchschnittliche Alter, das minimale bzw. maximale Alter sowie der Mittelwert und die Spannweite des Testosteronspiegels in den einzelnen Gruppen 1-6 werden tabellarisch in Tabelle 19 und graphisch in den Säulendiagrammen der Abbildungen 5 und 6 dargestellt.

Tabelle 19: Gruppenübersicht zu Patientenzahl, Alter und Testosteronwert der 6 Patientengruppen

<b>Gruppe</b>	<b>Patientenzahl n</b>	<b>Alter Mittelwert (Jahre)</b>	<b>Alter Minimum-Maximum (Jahre)</b>	<b>Testosteronspiegel Mittelwert (ng/dl)</b>	<b>Testosteronspiegel Minimum-Maximum (ng/dl)</b>
1	15	50,2	29-72	175,67	88-274
2	9	76,89	69-87	56,89	16-153
3	7	76,71	69-83	34,43	18-62
4	12	75,5	60-83	34,83	12-118
5	12	51,25	22-72	417,92	305-776
6	8	72,5	57-89	258,5	128-414
<b>Gesamt</b>	63	67,18	22-89	163,04	12-776

Für alle Säulendiagramme dieser Arbeit gilt: Zur Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen kennzeichnet die obere horizontale Begrenzung einer Säule den jeweiligen Mittelwert der Gruppe und der SEM ist t-förmig oberhalb bzw. unterhalb von diesem graphisch dargestellt. Statistische Signifikanzniveaus zwischen zwei Gruppen sind im Säulendiagramm oberhalb der jeweiligen Säulen gekennzeichnet (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ ). In diesem Kapitel sind die statistischen Signifikanzniveaus zugunsten der Übersichtlichkeit ausschließlich tabellarisch aufgeführt (s. Tabellen 20 und 21).

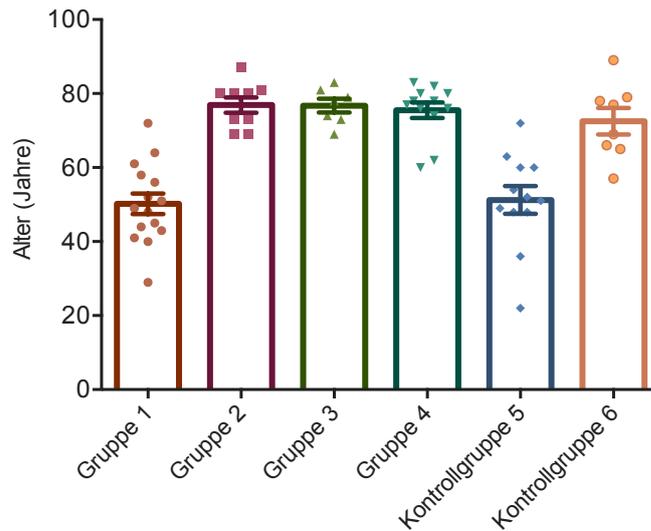


Abbildung 5: Patientenalter im Gruppenvergleich in Jahren: Gruppe 1 (Patienten mit Testosterondefizit, ohne Prostatakarzinom) und Kontrollgruppe 5 (Kontrollpatienten mit normwertigem Testosteronspiegel, ohne Prostatakarzinom) weisen ebenso wie Gruppen 2-4 (Prostatakarzinom-Patienten unter ADT) und Kontrollgruppe 6 (Prostatakarzinom-Patienten ohne ADT) sehr eng aneinander liegende Mittelwerte auf. Zugunsten der Übersichtlichkeit sind die statistischen Signifikanzen zwischen den Gruppen nicht im Säulendiagramm, sondern nur tabellarisch aufgeführt (s. Tabelle 20).

Tabelle 20: Gruppenvergleich des Patientenalters mittels Dunn's Multiple Comparison Test

Gruppen	p-Wert	Signifikanzniveau
Gruppe 1 vs. Gruppe 2	$\leq 0,001$	***
Gruppe 1 vs. Gruppe 3	$\leq 0,01$	**
Gruppe 1 vs. Gruppe 4	$\leq 0,001$	***
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 5	$> 0,05$	n.s.
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 6	$\leq 0,05$	*
Gruppe 2 vs. Gruppe 3	$> 0,05$	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 4	$> 0,05$	n.s.
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 5	$\leq 0,01$	**
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 6	$> 0,05$	n.s.
Gruppe 3 vs. Gruppe 4	$> 0,05$	n.s.
Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 5	$\leq 0,01$	**
Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 6	$> 0,05$	n.s.
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 5	$\leq 0,01$	**
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 6	$> 0,05$	n.s.
Kontrollgruppe 5 vs. Kontrollgruppe 6	$> 0,05$	n.s.

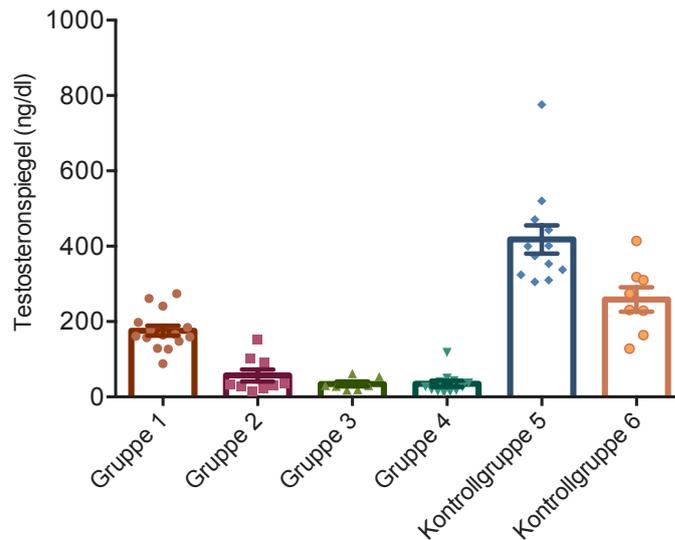


Abbildung 6: Testosteronspiegel im Gruppenvergleich in ng/dl: Gruppen 2-4 (Prostatakarzinom-Patienten unter ADT) zeigen deutlich erniedrigte Testosteronwerte im Kastrationsbereich mit eng aneinander gelegenen Mittelwerten. Gruppe 1 (Patienten mit Testosterondefizit, ohne Prostatakarzinom) zeigt im Mittelwert einen Testosteronwert von 175,67 ng/dl. Die Kontrollgruppen 5 und 6 weisen mit Mittelwerten von 417,92 ng/dl bzw. 258,5 ng/dl einen normwertigen bzw. nahezu normwertigen Testosteronspiegel auf und unterscheiden sich somit jeweils zu den Gruppen 2-4, nicht aber zu Gruppe 1, statistisch signifikant. Die statistischen Signifikanzen zwischen den Gruppen sind zugunsten der Übersichtlichkeit ausschließlich tabellarisch aufgeführt (s. Tabelle 21).

Tabelle 21: Gruppenvergleich des Testosteronspiegels mittels Dunn's Multiple Comparison Test

Gruppen	p-Wert	Signifikanzniveau
Gruppe 1 vs. Gruppe 2	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Gruppe 3	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Gruppe 4	≤ 0,01	**
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 3	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 5	≤ 0,0001	****
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 6	≤ 0,05	*
Gruppe 3 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 5	≤ 0,0001	****
Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 6	≤ 0,05	*
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 5	≤ 0,0001	****
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 6	≤ 0,01	**
Kontrollgruppe 5 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.

### 3.2 Datenanalyse – Gating und Kompensation

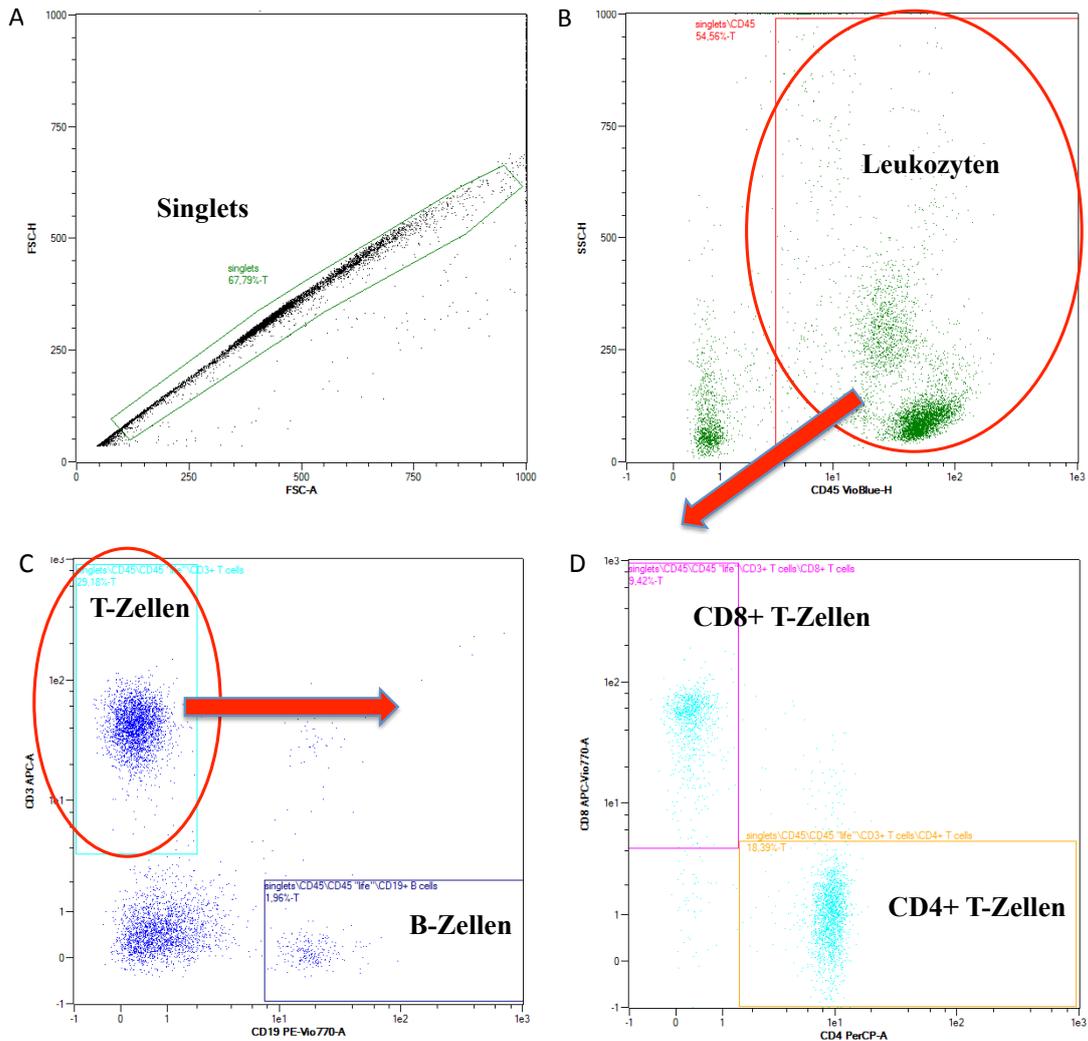
Nach den erfolgten Färbungen der PBMC erfolgte die durchflusszytometrische Messung zur Detektion und Quantifizierung der verschiedenen Immunzellpopulationen (s. Kapitel 2.2.10). Entscheidend hierbei ist die Gating-Strategie, die eine gleichzeitige Analyse einer Mehrzahl verschiedener Parameter (Fluoreszenzen) in einer ausgewählten Zellsubpopulation ermöglicht. Anhand dessen, dass die verschiedenen Immunzellpopulationen mit unterschiedlich Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern markiert wurden, konnten diese nun separiert ausgezählt werden. Autofluoreszierende Zelltrümmer, tote Zellen, Doublets und Triplets konnten im Rahmen des Gatings als Streusignale erkannt und von der Analyse ausgeschlossen werden. Wie in Kapitel 2.2.7 beschrieben, wurden zur Überprüfung und Verbesserung der Spezifität der Antikörperfärbungen neben der Verwendung eines FcR-Blocks Negativ- und Isotypkontrollen durchgeführt. Zudem ist als wichtiges Verfahren zur Minimierung spektraler Überlappung die Kompensation des Durchflusszytometers zu erwähnen. Da ein Fluoreszenzfarbstoff nicht rein eine Farbe, sondern vielmehr ein Farbspektrum, emittiert, wird er nicht nur in einem Farbkanal detektiert. Ein Fluoreszenzfarbstoff streut somit auch in andere Kanäle und löst dort (Stör-)Impulse aus. Die Kompensation dient im Sinne einer Voreinstellung zur rechnerischen Korrektur dieser spektralen Überlappung.<sup>61,84</sup>

In den Abbildungen 7 und 8 sind repräsentative Dotplots bzw. zwei-dimensionale Streudiagramme dargestellt, wie sie bei der Immunophänotypisierungs- bzw. der Treg-Färbung von Patientenproben entstanden. Es soll hierdurch exemplarisch die Gating-Strategie verdeutlicht werden, mithilfe derer die einzelnen Zellpopulationen wie Leukozyten, T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, Neutrophile, Eosinophile, NKT-Zellen, NK-Zellen und Tregs bestimmt und ausgezählt wurden.

Gating-Schritte der Immunophänotypisierungsfärbung (s. Abbildung 7):

- a) Darstellung von Singlets mittels Ausschluss von Zelltrümmern, Doublets und Triplets,
- b) Gating von Leukozyten anhand von CD45-Expression und Unterscheidung dieser in CD3+ T-Zellen und CD19+ B-Zellen,
- c) Unterscheidung zwischen CD4+ und CD8+ T-Zellen anhand von CD4- bzw. CD8-Expression; Darstellung von CD14- innerhalb der CD45+ Leukozyten zur Differenzierung zwischen Monozyten und Nicht-Monozyten,

d) Unterscheidung innerhalb der Nicht-Monozyten von Eosinophilen, Neutrophilen und einer weiteren Zellpopulation (SSClow/CD16+) anhand der CD16-Expression und der Höhe des SSCs; Differenzierung der SSClow/CD16+ Zellpopulation anhand der CD3-Expression in NK- bzw. NKT-Zellen.



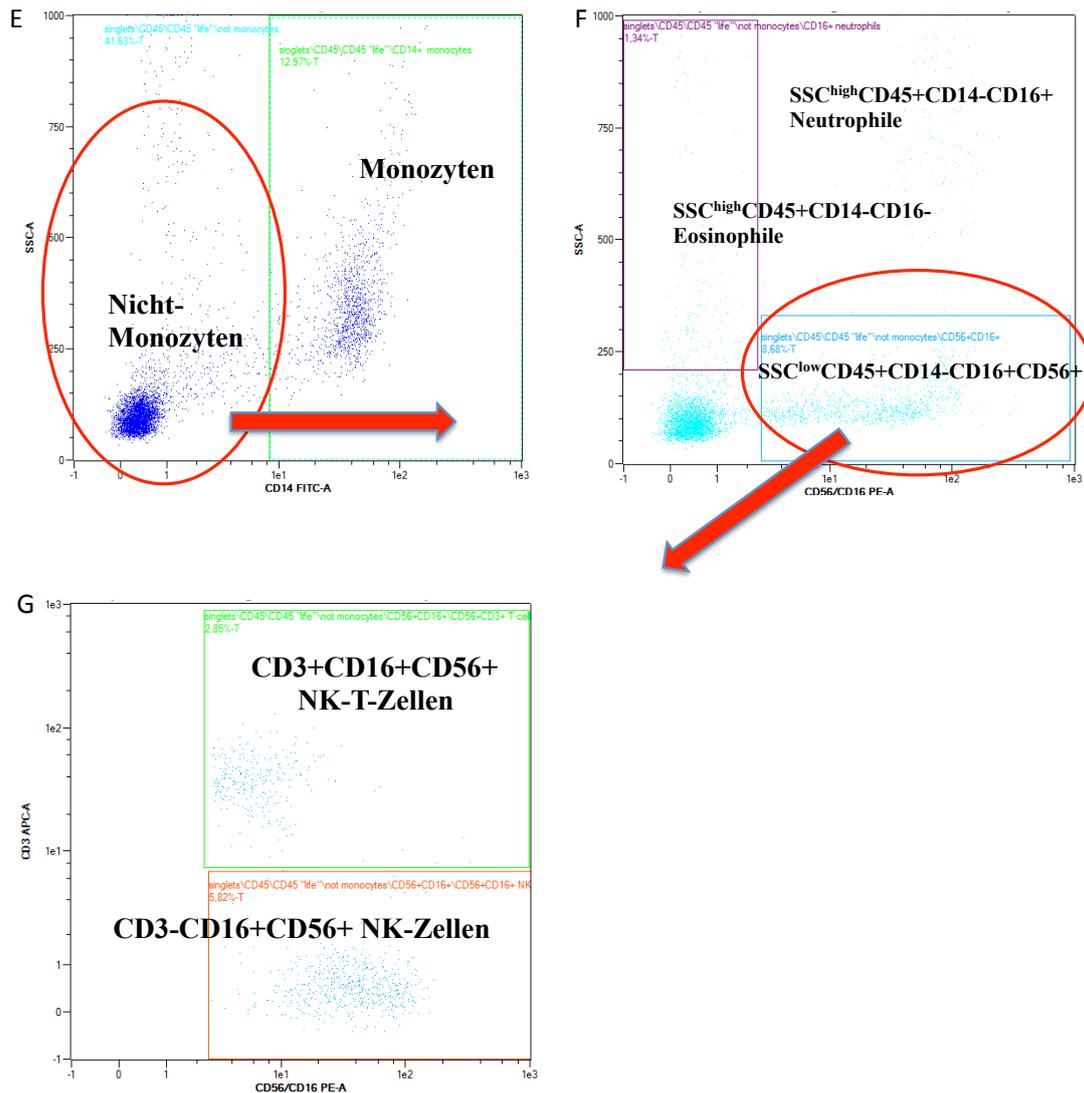


Abbildung 7: Gating-Schritte der Immunphänotypisierungsfärbung: Darstellung von Singlets durch Ausschluss von Zelltrümmern, Doublets und Triplets (A). Identifikation von Leukozyten anhand der CD45-Expression (B). Differenzierung der CD45+ Leukozyten in CD3+ T-Zellen und CD19+ B-Zellen (C). CD3+ T-Zellen werden anhand der CD4- bzw. CD8-Expression in CD4+ bzw. CD8+ T-Zellen klassifiziert (D). Unterscheidung zwischen Monozyten (CD14+) und Nicht-Monozyten (CD14-) (E). Die Population der Nicht-Monozyten wird nun weiter differenziert: Anhand der CD16-Expression und der Höhe des Seitwärtstreulichts (SSC) können Eosinophile, Neutrophile und SSC<sup>low</sup>/CD16+ Zellen unterschieden werden (F). Die zuletzt genannte Population exprimiert CD56 und wird anhand der CD3-Expression in CD3+ NKT-Zellen bzw. in CD3- NK-Zellen differenziert (G).

#### Gating-Schritte der Treg-Färbung (s. Abbildung 8):

- Darstellung von Singlets mittels Ausschluss von Zelltrümmern, Doublets und Triplets,
- Gating von CD4+CD25+ Zellen innerhalb der Singlets,
- Darstellung von CD4+CD25+Foxp3+ Zellen (Tregs) innerhalb der CD4+CD25+ Zellpopulation in verschiedenen Graphen (x-Achse: Foxp3-Expression, y-Achse: CD-25-Expression bzw. CD4-Expression).

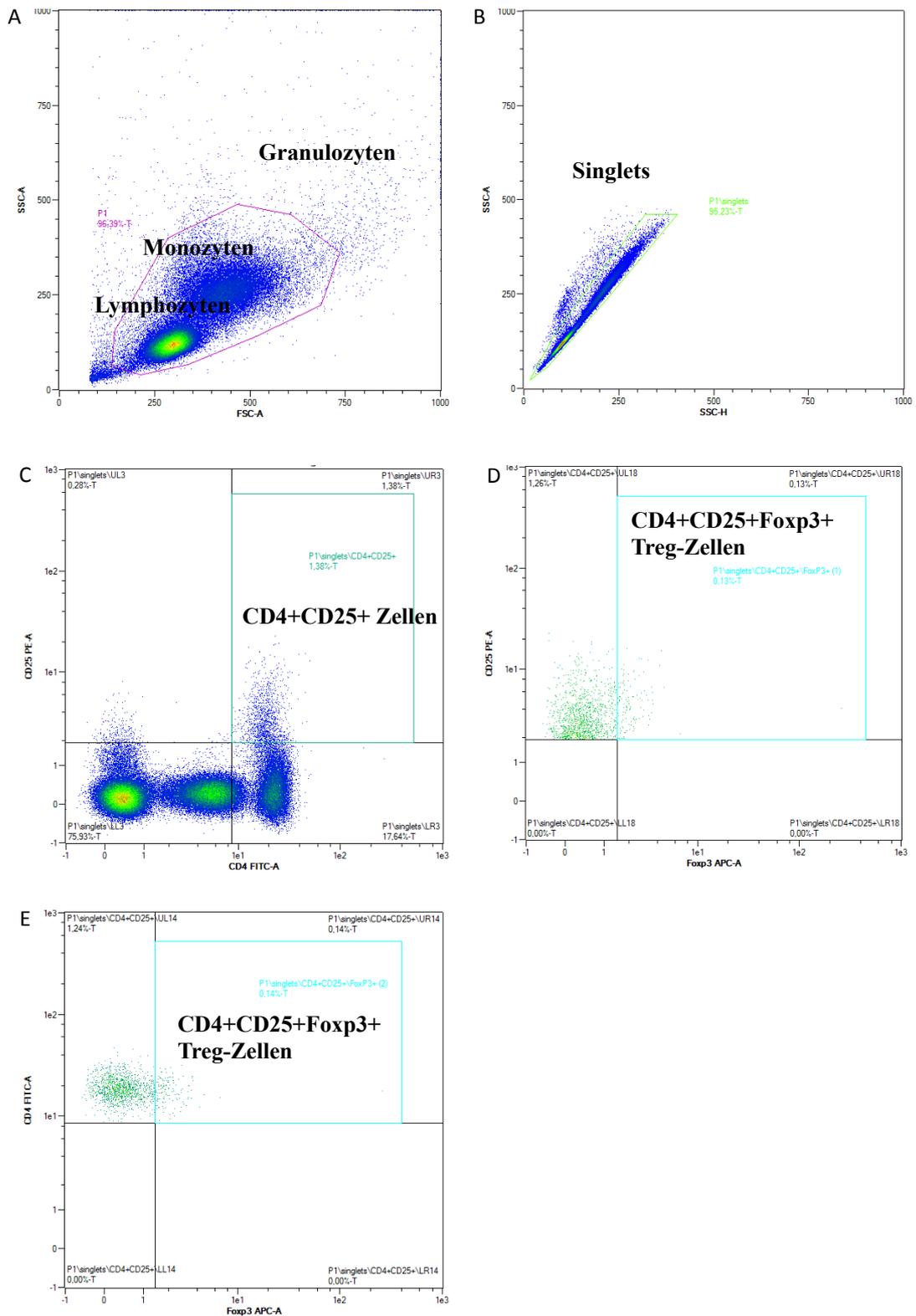


Abbildung 8: Gating-Schritte der Treg-Färbung: Identifizierung der Singlets durch Ausschluss von Zelltrümmern, Doublets und Triplets mittels Gating (A, B). Gating von CD4 und CD25-exprimierenden Zellen innerhalb der Singlets (C). Detektion von Tregs anhand der Foxp3-Expression innerhalb der CD4+CD25+ Zellpopulation mit Darstellung der CD25-Expression (D) bzw. der CD4-Expression auf der y-Achse (E).

### 3.3 Statistische und graphische Auswertungen des Auftretens der Immunzellpopulationen in den Patientengruppen und in Korrelation mit dem Testosteronspiegel

#### 3.3.1 Geringstes Aufkommen von Leukozyten in Gruppe 4

Leukozyten exprimieren das Oberflächenprotein CD45, welches in dieser Arbeit zur Detektion und Auszählung dieser diente. Wenn auch statistisch nicht signifikant, zu konstatieren ist ein auffallend geringeres Vorkommen von Leukozyten in Gruppe 4, welche Patienten mit kastrationsresistentem Prostatakarzinom umfasst. Betrachtet man hierzu Gruppe 1, im Vergleich jüngere Männer mit erniedrigtem Testosteronspiegel ohne Karzinomerkrankung, fällt ein deutlich höheres Aufkommen von Leukozyten in PBMC auf (s. Abbildung 9).

Für das Auftreten von Leukozyten in PBMC erwies sich mittels Kruskal-Wallis-Test ein p-Wert von  $> 0,05$  mit einem H-Wert von 4,727. In Tabelle 22 ist die ermittelte deskriptive Statistik dargestellt. Im Dunn's Multiple Comparison Test wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen errechnet (s. Tabelle 23). In der Spearman-Korrelation ließ sich mit einem Korrelationskoeffizient von  $r_s = -0,061$  kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Leukozyten in PBMC in Abhängigkeit vom Testosteronwert feststellen (s. Abbildung 10).

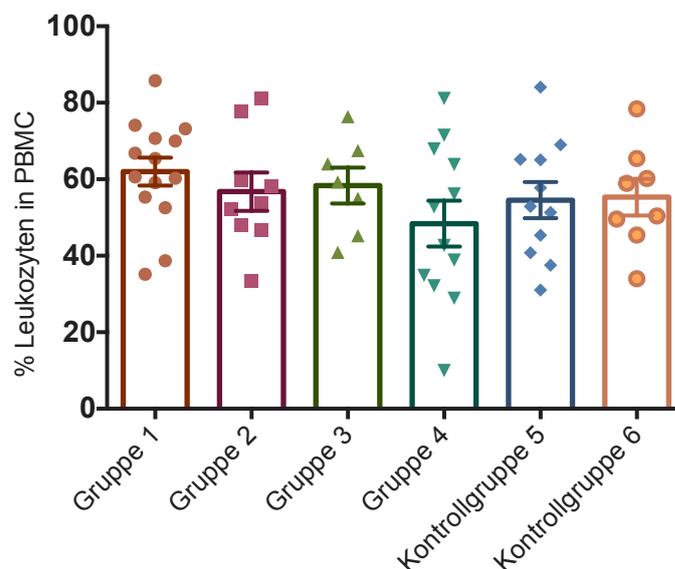


Abbildung 9: Prozentualer Anteil von Leukozyten in PBMC im Gruppenvergleich. Statistisch signifikante Unterschiede wurden nicht konstatiert.

Tabelle 22: Deskriptive Statistik zum Vorkommen von Leukozyten in PBMC

	<b>Gruppe 1</b>	<b>Gruppe 2</b>	<b>Gruppe 3</b>	<b>Gruppe 4</b>	<b>Gruppe 5</b>	<b>Gruppe 6</b>
<b>n</b>	14	9	7	12	11	8
<b>Minimum</b>	35,15	33,39	40,92	10,01	31,05	34,01
<b>Maximum</b>	85,79	81,1	76,36	81,15	84,08	78,42
<b>Median</b>	63,04	53,72	59,29	47,74	52,88	54,68
<b>Mittelwert</b>	61,99	56,76	58,34	48,4	54,55	55,31
<b>SD</b>	13,65	14,98	12,44	20,73	15,64	13,53
<b>SEM</b>	3,647	4,995	4,701	5,984	4,714	4,784

Tabelle 23: Gruppenvergleich zum Auftreten von Leukozyten in PBMC

<b>Gruppen</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Signifikanzniveau</b>
Gruppe 1 vs. Gruppe 2	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Gruppe 3	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 3	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Kontrollgruppe 5 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.

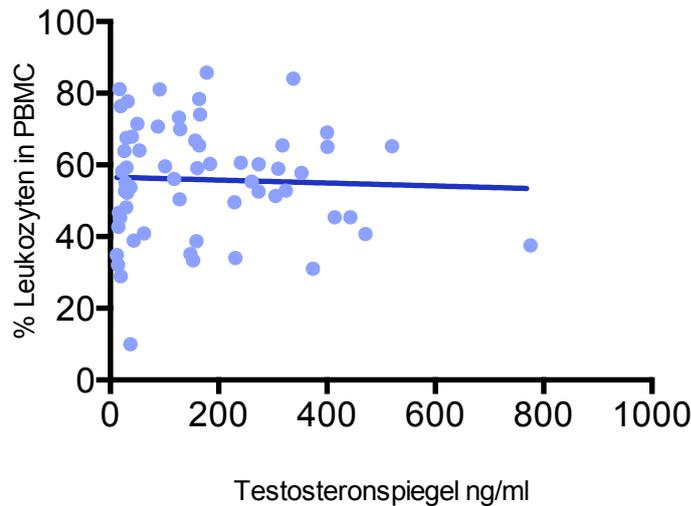


Abbildung 10: Prozentualer Anteil von Leukozyten in PBMC im Zusammenhang mit dem Testosteronspiegel nach dem Spearman-Korrelationstest,  $r_s = -0,061$ .

### 3.3.2 Geringste T-Zellzahl in Gruppe 4 und Nachweis eines mäßigen positiven Zusammenhangs zwischen der T-Zellzahl und dem Testosteronspiegel

T-Zellen wurden anhand ihrer CD3-Expression innerhalb der Leukozytenpopulation detektiert. Im Gruppenvergleich konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Aufkommen von T-Zellen in Gruppe 1 und dem in Gruppe 4 festgestellt werden. Gruppe 4 sticht mit deutlich erniedrigten T-Zellaufkommen hervor (s. Abbildung 11).

Der Kruskal-Wallis-Test für das Vorkommen von T-Zellen in Leukozyten ermittelte einen p-Wert von  $\leq 0,05$  mit einem H-Wert von 14,24. Die hierzu ermittelte deskriptive Statistik ist in Tabelle 24 dargestellt. Der hierauf durchgeführte Dunn's Multiple Comparison Test zeigte einen signifikanten Unterschied der Werte zwischen den Gruppen 1 und 4, zwischen den anderen Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (s. Tabelle 25). Es wurde weiter ein Mann-Whitney-U-Test mit den Daten von Gruppe 1 und 4 durchgeführt, hier ergab sich ein p-Wert von  $\leq 0,01$ . Zur Überprüfung eines Zusammenhangs zwischen dem Auftreten von T-Zellen in Leukozyten und dem Testosteronspiegel ergab sich in der Spearman-Korrelation ein Korrelationskoeffizient  $r_s$  von 0,250 und beschreibt somit einen mäßigen positiven Zusammenhang (s. Abbildung 12).

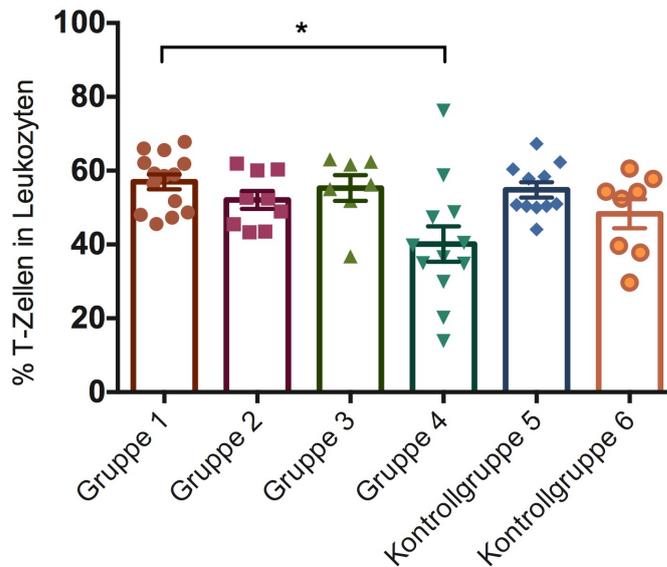


Abbildung 11: Prozentualer Anteil von T-Zellen in Leukozyten im Gruppenvergleich. Zwischen Gruppe 1 und Gruppe 4 zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied (\* =  $p \leq 0,05$ ).

Tabelle 24: Deskriptive Statistik zum Vorkommen von T-Zellen in Leukozyten

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6
<b>n</b>	14	9	7	12	11	8
<b>Minimum</b>	45,55	43,32	36,78	13,86	44,09	29,72
<b>Maximum</b>	67,82	61,92	63,06	76,24	67,3	60,6
<b>Median</b>	58,77	52,49	56,21	38,14	51	53,34
<b>Mittelwert</b>	56,99	52,08	55,29	40,12	54,8	48,32
<b>SD</b>	7,516	7,35	9,201	16,62	6,883	11,08
<b>SEM</b>	2,009	2,45	3,478	4,799	2,075	3,916

Tabelle 25: Gruppenvergleich zum Auftreten von T-Zellen in Leukozyten

Gruppen	p-Wert	Signifikanzniveau
Gruppe 1 vs. Gruppe 2	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Gruppe 3	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Gruppe 4	$\leq 0,05$	*
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 3	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.

Kontrollgruppe 5 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
---------------------------------------	--------	------

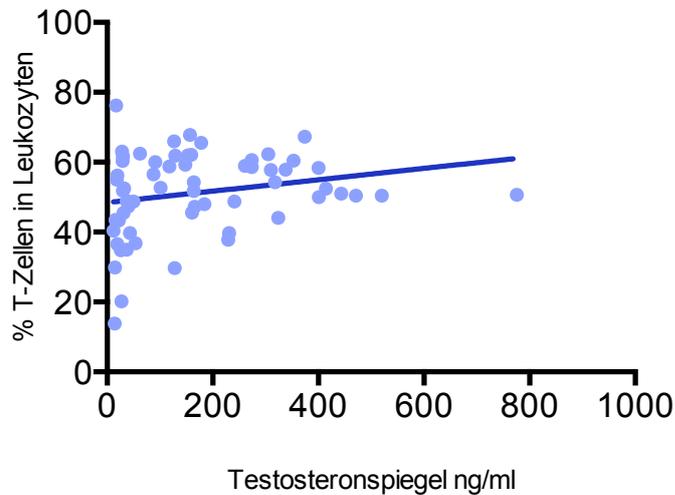


Abbildung 12: Prozentualer Anteil von T-Zellen in Leukozyten im Zusammenhang mit dem Testosteronspiegel. Nach der Spearman-Korrelation ergibt sich für  $r_s$ :  $r_s = 0,250$ , sodass ein mäßiger positiver Zusammenhang zwischen dem Auftreten von T-Zellen in Leukozyten und dem Testosteronspiegel besteht.

### 3.3.2.1 Signifikant vermindertes Vorkommen von CD4+ T-Zellen in Gruppe 4 im Vergleich zu Gruppe 1

Die T-Zellpopulation wurde mittels Oberflächenmarkierung und Gating weiter differenziert. Statistisch sehr bis höchst signifikante Unterschiede traten zwischen Gruppe 1 und 4 hervor: Es fanden sich deutlich weniger CD4+ T-Zellen in Gruppe 4 als in Gruppe 1. Ebenfalls statistisch sehr signifikant erwiesen sich die Unterschiede zwischen Gruppe 3 und 4, in welchem Vergleich sich Gruppe 4 auch hier mit einem sehr signifikant geringeren CD4+ T-Zellaufkommen auswies (s. Abbildung 13).

Für das Vorkommen von CD4+ T-Zellen in Leukozyten bzw. in der T-Zellpopulation berechnete sich im Kruskal-Wallis-Test einen p-Wert von  $\leq 0,0001$  mit einem H-Wert von 28,17 bzw. einen p-Wert von  $\leq 0,01$  mit einem H-Wert von 16,14. Die hierzu ermittelten deskriptiven Statistiken sind Tabelle 26 und 27 zu entnehmen. Hierauf durchgeführte Dunn's Multiple Comparison Tests zeigten signifikante Unterschiede (s. Tabellen 28, 29): Für das Auftreten von CD4+ T-Zellen in Leukozyten erwies sich zwischen den Gruppen 1 und 4 ein höchst signifikanter ( $p \leq 0,0001$ ) und zwischen den Gruppen 3 und 4 ein sehr signifikanter Unterschied ( $p \leq 0,01$ ). Der Mann-Whitney-U-Test bestätigte diese Ergebnisse. Für das Auftreten von CD4+ T-Zellen in der T-

Zellpopulation ergab sich zwischen den Gruppen 1 und 4 ( $p \leq 0,05$ ) ein signifikanter Unterschied, im Mann-Whitney-U-Test ein sehr signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von  $\leq 0,01$ . Unabhängig der Gruppeneinteilung wurde eine Spearman-Korrelation durchgeführt, um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Testosteronspiegel und der CD4+ T-Zellzahl in Leukozyten bzw. in der T-Zellpopulation zu erschließen. Es errechneten sich Korrelationskoeffizienten von  $r_s = 0,314$  bzw.  $r_s = 0,146$  und zeigten somit einen schwachen bis mäßigen bzw. keinen bis geringen Zusammenhang zwischen den Zellzahlen und dem Testosteronwert (s. Abbildung 14).

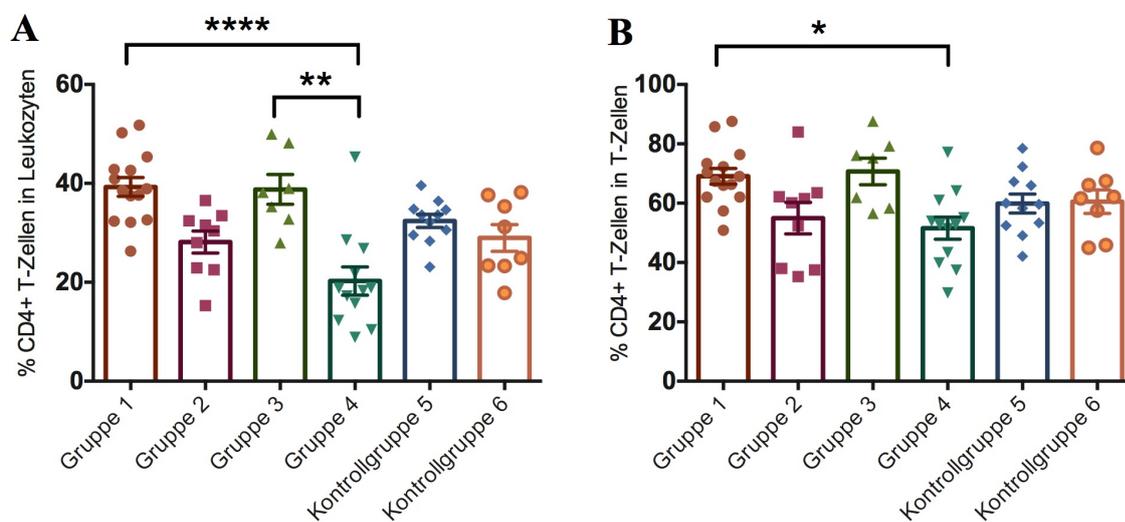


Abbildung 13: Prozentualer Anteil von CD4+ T-Zellen in Leukozyten (A) und in der T-Zellpopulation (B) im Gruppenvergleich. Es zeigte sich ein statistisch höchst signifikant geringerer prozentualer Anteil von CD4+ T-Zellen in Leukozyten in Gruppe 4 im Vergleich zu Gruppe 1 ( $p \leq 0,0001$ ) bzw. ein sehr signifikant geringerer prozentualer Anteil im Vergleich zu Gruppe 3 ( $p \leq 0,01$ ) (A). Statistisch signifikant zeichnete sich ebenso ein prozentual geringeres Aufkommen von CD4+ T-Zellen in T-Zellen in Gruppe 4 im Vergleich zu Gruppe 1 ab ( $p \leq 0,05$ ) (B).

Tabelle 26: Deskriptive Statistik zu CD4+ T-Zellen in Leukozyten

	<b>Gruppe 1</b>	<b>Gruppe 2</b>	<b>Gruppe 3</b>	<b>Gruppe 4</b>	<b>Gruppe 5</b>	<b>Gruppe 6</b>
<b>n</b>	14	9	7	12	11	8
<b>Minimum</b>	26,32	15,29	28	8,892	23,13	17,86
<b>Maximum</b>	51,78	36,54	49,96	45,34	39,57	38,19
<b>Median</b>	38,73	30,41	38,19	18,58	33,62	28,06
<b>Mittelwert</b>	39,27	28,13	38,78	20,26	32,41	28,98
<b>SD</b>	7,116	6,691	7,945	9,865	4,422	7,644
<b>SEM</b>	1,902	2,23	3,003	2,848	1,333	2,703

Tabelle 27: Deskriptive Statistik zu CD4+ T-Zellen in der T-Zellpopulation

	<b>Gruppe 1</b>	<b>Gruppe 2</b>	<b>Gruppe 3</b>	<b>Gruppe 4</b>	<b>Gruppe 5</b>	<b>Gruppe 6</b>
<b>n</b>	14	9	7	12	11	8
<b>Minimum</b>	50,85	35,29	56,54	29,79	42,08	45
<b>Maximum</b>	87,56	84	87,61	77,17	78,51	78,63
<b>Median</b>	68,2	60,12	75,21	52,72	59,6	61,85
<b>Mittelwert</b>	69,07	54,95	70,71	51,56	59,89	60,53
<b>SD</b>	9,971	15,91	11,83	12,79	10,61	11,17
<b>SEM</b>	2,665	5,302	4,47	3,693	3,198	3,95

Tabelle 28: Gruppenvergleich zum Auftreten von CD4+ T-Zellen in Leukozyten

<b>Gruppen</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Signifikanzniveau</b>
Gruppe 1 vs. Gruppe 2	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Gruppe 3	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Gruppe 4	≤ 0,0001	****
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 3	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Gruppe 4	≤ 0,01	**
Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Kontrollgruppe 5 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.

Tabelle 29: Gruppenvergleich zum Auftreten von CD4+ T-Zellen in der T-Zellpopulation

<b>Gruppen</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Signifikanzniveau</b>
Gruppe 1 vs. Gruppe 2	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Gruppe 3	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Gruppe 4	≤ 0,05	*
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 3	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.

Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Kontrollgruppe 5 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.

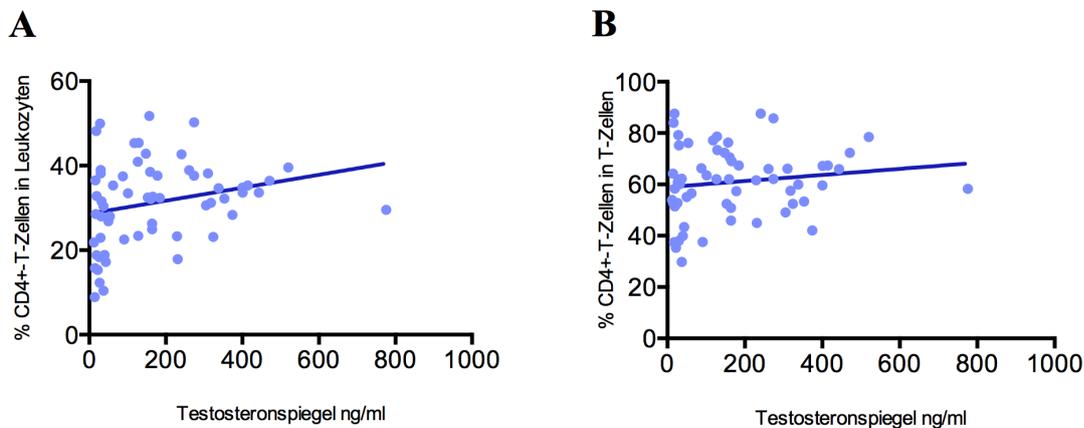


Abbildung 14: Prozentualer Anteil von CD4+ T-Zellen in Leukozyten (A) und in der T-Zellpopulation (B) im Zusammenhang mit dem Testosteronspiegel nach der Spearman-Korrelation. Für den Spearman-Korrelationskoeffizienten  $r_s$  ergibt sich ein Wert von  $r_s = 0,314$  (A) bzw.  $r_s = 0,146$  (B). Es erwies sich demnach ein mäßiger (A) bzw. ein geringer (B) positiver Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von CD4+ Zellen und dem Testosteronspiegel.

### 3.3.2.2 Signifikant vermehrtes Vorkommen von CD8+ T-Zellen in Gruppe 4 im Vergleich zu Gruppe 1

Innerhalb der T-Zellpopulation wurden CD8-exprimierende T-Zellen detektiert. Im Gruppenvergleich ließ sich statistisch sehr signifikant nachweisen, dass CD8+ T-Zellen prozentual innerhalb der T-Zellpopulation in Gruppe 4 häufiger auftreten als in Gruppe 1 (s. Abbildung 15).

Die Durchführung des Kruskal-Wallis-Tests für das Auftreten von CD8+ T-Zellen in Leukozyten bzw. in der T-Zellpopulation berechnete einen p-Wert von  $> 0,05$  mit einem H-Wert 4,403 bzw. einen p-Wert von  $\leq 0,01$  mit einem H-Wert von 16,24. Die hierzu ermittelten deskriptiven Statistiken sind in Tabelle 30 und 31 dargestellt. Die im Anschluss durchgeführten Dunn's Multiple Comparison Tests (Tabellen 32, 33) zeigten im Gruppenvergleich der CD8+ T-Zellen in Leukozyten keinen signifikanten Unterschied, im Gruppenvergleich der CD8+ T-Zellen in der T-Zellpopulation zwischen Gruppe 1 und Gruppe 4 einen sehr signifikanten Unterschied (p-Wert  $\leq 0,01$ ), welcher sich im Mann-Whitney-U-Test mit einem hohen Signifikanzniveau (p  $\leq 0,001$ ) bestätigte. Eine Spearman-Korrelation ergab keinen bis geringen bzw. einen schwachen

bis mäßigen Zusammenhang zwischen dem Testosteronwert und CD8+ T-Zellen in Leukozyten ( $r_s = -0,060$ ) bzw. in der T-Zellpopulation ( $r_s = -0,212$ ), siehe Abbildung 16.

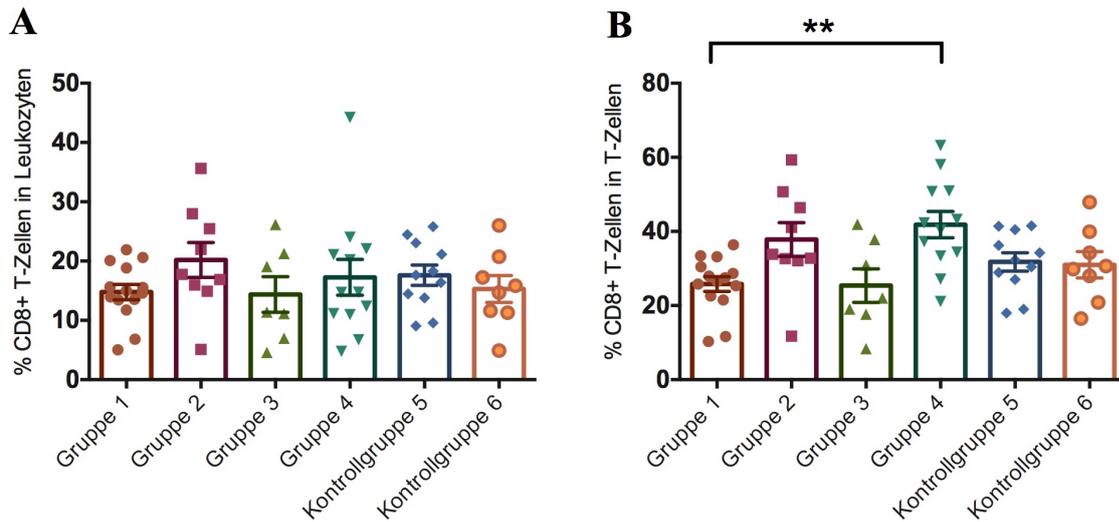


Abbildung 15: Prozentualer Anteil von CD8+ T-Zellen in Leukozyten (A) bzw. in der T-Zellpopulation (B) im Gruppenvergleich. In Bezug auf das prozentuale Vorkommen von CD8+ T-Zellen in der T-Zellpopulation fand sich zwischen Gruppe 1 und Gruppe 4 ein statistisch sehr signifikanter Unterschied ( $p \leq 0,01$ ) (B).

Tabelle 30: Deskriptive Statistik zum Vorkommen von CD8+ T-Zellen in Leukozyten

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6
<b>n</b>	14	9	7	12	11	8
<b>Minimum</b>	5,031	5,105	4,595	4,764	9,066	4,908
<b>Maximum</b>	21,91	35,62	26,16	44,24	25,8	26
<b>Median</b>	14,81	17,76	11,41	14,74	17,62	15,27
<b>Mittelwert</b>	14,77	20,19	14,38	17,26	17,61	15,29
<b>SD</b>	4,824	8,802	7,936	10,45	5,659	6,394
<b>SEM</b>	1,289	2,934	2,999	3,016	1,706	2,261

Tabelle 31: Deskriptive Statistik zum Vorkommen von CD8+ T-Zellen in der T-Zellpopulation

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6
<b>n</b>	14	9	7	12	11	8
<b>Minimum</b>	10,33	11,74	8,349	21,09	17,99	16,51
<b>Maximum</b>	36,4	59,31	41,89	63,17	41,51	47,89
<b>Median</b>	27,01	33,83	22,01	41,34	32,31	30,28
<b>Mittelwert</b>	25,81	37,85	25,39	41,84	31,79	31
<b>SD</b>	7,504	13,67	11,97	12,35	8,218	9,991
<b>SEM</b>	2,006	4,556	4,525	3,565	2,478	3,532

Tabelle 32: Gruppenvergleich zum Auftreten von CD8+ T-Zellen in Leukozyten

<b>Gruppen</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Signifikanzniveau</b>
Gruppe 1 vs. Gruppe 2	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Gruppe 3	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 3	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Kontrollgruppe 5 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.

Tabelle 33: Gruppenvergleich zum Auftreten von CD8+ T-Zellen in der T-Zellpopulation

<b>Gruppen</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Signifikanzniveau</b>
Gruppe 1 vs. Gruppe 2	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Gruppe 3	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Gruppe 4	≤ 0,01	**
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 3	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Kontrollgruppe 5 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.

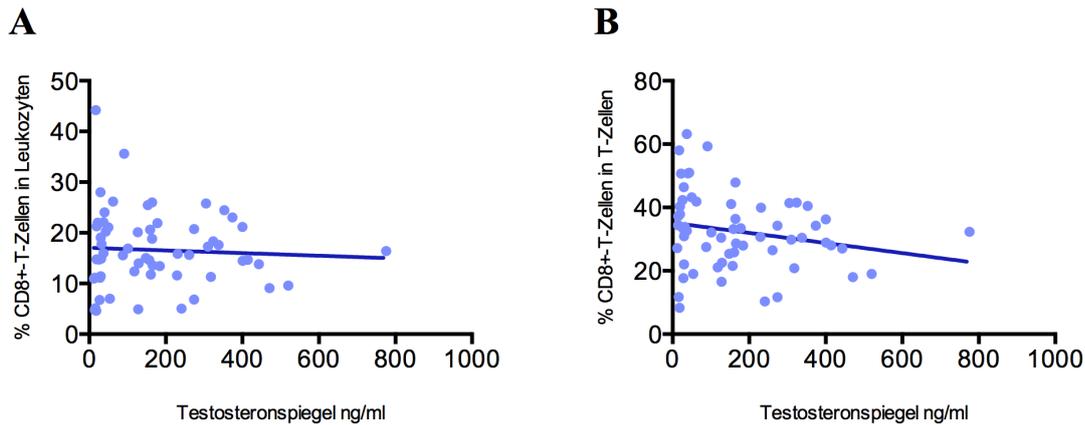


Abbildung 16: Prozentualer Anteil von CD8+ T-Zellen in Leukozyten (A) bzw. in der T-Zellpopulation (B) im Zusammenhang mit dem Testosteronspiegel nach der Spearman-Korrelation. Es ergibt sich für den Korrelationskoeffizienten  $r_s$ :  $r_s = -0,060$  (A) bzw.  $r_s = -0,212$  (B).

### 3.3.2.3 Verhältnis zwischen CD4+ zu CD8+ T-Zellen in Gruppe 4 signifikant erniedrigt im Vergleich zu Gruppe 1

Es wurde das Vorkommen von CD4+ T-Zellen im Verhältnis zum Vorkommen von CD8+ T-Zellen im Gruppenvergleich sowie in Korrelation mit der Testosteronkonzentration untersucht. Auch hier bzw. resultierend aus den vorherigen Analysen in Kapitel 3.3.2.1 und Kapitel 3.3.2.2 zeigte sich erneut statistisch sehr bis hoch signifikant ein Unterschied zwischen den Gruppen 1 und 4: Der Quotient von CD4+ T-Zellen zu CD8+ T-Zellen ist in Gruppe 1 deutlich höher als in Gruppe 4 (s. Abbildung 17).

Die Durchführung des Kruskal-Wallis-Tests bzgl. des Vorkommens von CD4+ T-Zellen im Verhältnis zu CD8+ T-Zellen in Leukozyten ermittelte im Gruppenvergleich einen p-Wert von  $\leq 0,01$  mit einem H-Wert von 16,77. Die deskriptive Statistik hierzu ist Tabelle 34 zu entnehmen. Mittels Dunn's Multiple Comparison Test konnte zwischen Gruppe 1 und 4 ein sehr signifikanter Unterschied nachgewiesen werden ( $p \leq 0,01$ ; s. Tabelle 35). Im Mann-Whitney-U-Test wurde hierzu ein hohes Signifikanzniveau mit einem p-Wert von  $\leq 0,001$  errechnet. In der Spearman-Korrelation wurde mit einem  $r_s$ -Wert von 0,175 kein bis ein geringer signifikanter Zusammenhang zwischen dem Testosteronwert und dem Verhältnis von CD4+ T-Zellen zu CD8+ T-Zellen in Leukozyten ermittelt (s. Abbildung 18).

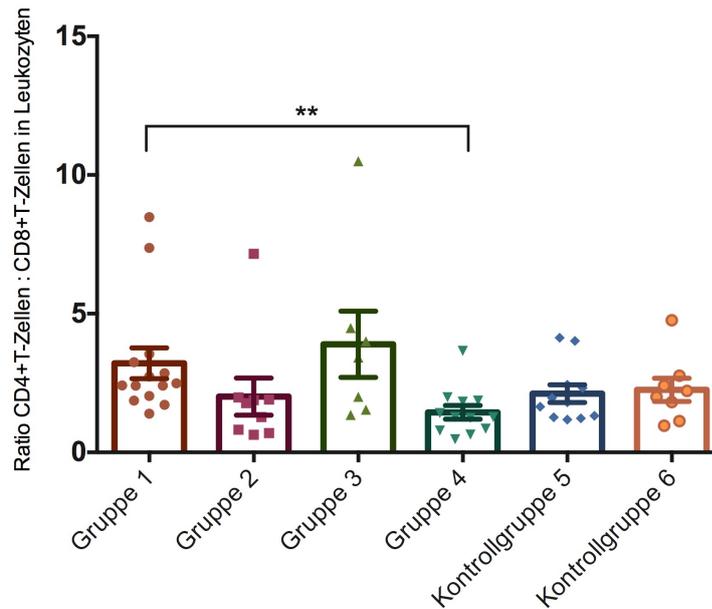


Abbildung 17: Vorkommen von CD4+ T-Zellen in Leukozyten im Verhältnis zum Vorkommen von CD8+ T-Zellen in Leukozyten im Gruppenvergleich. Es zeigte sich ein statistisch sehr signifikanter Unterschied zwischen Gruppe 1 und Gruppe 4 ( $p \leq 0,01$ ).

Tabelle 34: Deskriptive Statistik zum Vorkommen von CD4+ T-Zellen im Verhältnis zum Vorkommen von CD8+ T-Zellen in Leukozyten

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6
<b>n</b>	14	9	7	12	11	8
<b>Minimum</b>	1,397	0,6327	1,35	0,4716	1,185	0,9584
<b>Maximum</b>	8,48	7,157	10,49	3,658	4,13	4,762
<b>Median</b>	2,451	1,777	3,417	1,274	1,803	2,109
<b>Mittelwert</b>	3,212	2,013	3,898	1,442	2,12	2,256
<b>SD</b>	2,089	2,005	3,155	0,8522	1,057	1,182
<b>SEM</b>	0,5582	0,6684	1,192	0,246	0,3187	0,4178

Tabelle 35: Gruppenvergleich zum Auftreten von CD4+ T-Zellen im Verhältnis zu CD8+ T-Zellen in Leukozyten

Gruppen	p-Wert	Signifikanzniveau
Gruppe 1 vs. Gruppe 2	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Gruppe 3	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Gruppe 4	$\leq 0,01$	**
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 3	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.

Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Kontrollgruppe 5 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.

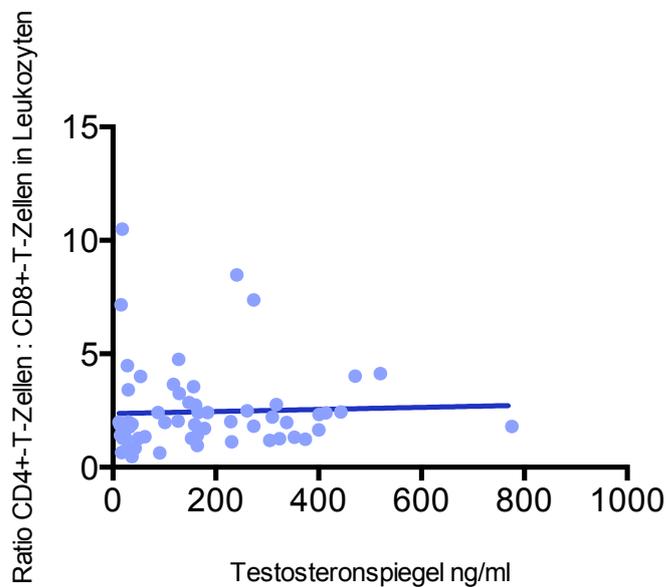


Abbildung 18: Auftreten von CD4+ T-Zellen im Verhältnis zum Auftreten von CD8+ T-Zellen in Leukozyten im Zusammenhang mit dem Testosteronspiegel in der Spearman-Korrelation,  $r_s = 0,175$ .

### 3.3.3 B-Zellzahl in Gruppe 4 im Vergleich zu Gruppe 1 halbiert

B-Zellen wurden anhand ihrer CD19-Expression und Abwesenheit der CD3-Expression identifiziert. Auffällig ist hier die prozentual etwa zweifache B-Zell-Reduktion in Leukozyten in Gruppe 4 im Vergleich zum Vorkommen in Gruppe 1 (s. Abbildung 19).

Der Kruskal-Wallis-Test für das Vorkommen von B-Zellen in Leukozyten ermittelte einen p-Wert von  $\leq 0,05$  mit einem H-Wert von 12,07. Die hierzu ermittelte deskriptive Statistik ist in Tabelle 36 dargestellt. Der Dunn's Multiple Comparison Test zeigte einen signifikanten Unterschied der Daten zwischen den Gruppen 1 und 4 mit einem p-Wert von  $\leq 0,05$  (s. Tabelle 37). Ein p-Wert von  $\leq 0,001$  ergab sich im Mann-Whitney-U-Test zwischen Gruppe 1 und Gruppe 4. Zur Überprüfung eines Zusammenhangs zwischen dem Auftreten von B-Zellen in Leukozyten und dem Testosteronspiegel ergab sich ein Korrelationskoeffizient  $r_s$  von 0,092 und weist somit keinen bis zu einem geringen Zusammenhang nach (s. Abbildung 20).

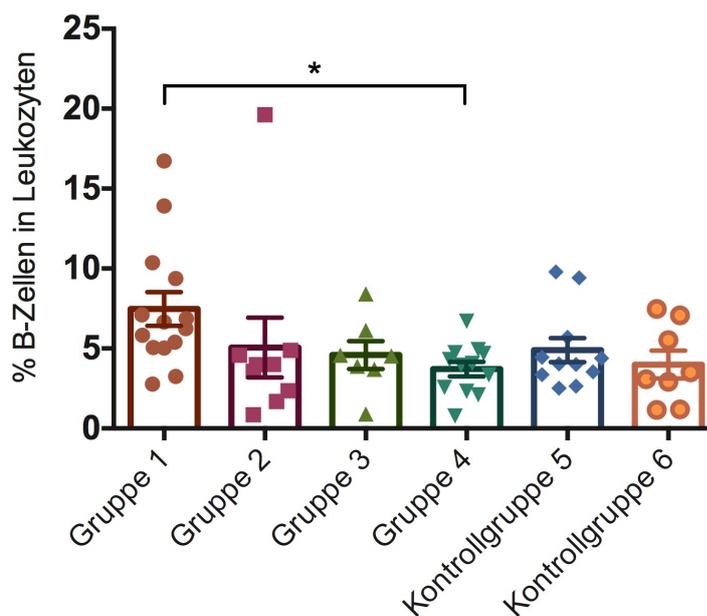


Abbildung 19: Prozentualer Anteil von B-Zellen in Leukozyten im Gruppenvergleich. Statistisch signifikant ergab sich ein in Gruppe 4 prozentual geringeres Vorkommen von B-Zellen in Leukozyten im Vergleich zu Gruppe 1.

Tabelle 36: Deskriptive Statistik zum Vorkommen von B-Zellen in Leukozyten

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6
<b>n</b>	14	9	7	12	11	8
<b>Minimum</b>	2,781	0,8533	0,9036	0,7824	2,511	1,162
<b>Maximum</b>	16,72	19,62	8,418	6,712	9,795	7,476
<b>Median</b>	6,452	3,988	4,536	4,015	4,041	3,297
<b>Mittelwert</b>	7,471	5,06	4,594	3,713	4,895	3,993
<b>SD</b>	3,926	5,626	2,307	1,583	2,49	2,45
<b>SEM</b>	1,049	1,875	0,8718	0,4569	0,7507	0,8663

Tabelle 37: Gruppenvergleich zum Auftreten von B-Zellen in Leukozyten

Gruppen	p-Wert	Signifikanzniveau
Gruppe 1 vs. Gruppe 2	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Gruppe 3	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Gruppe 4	≤ 0,05	*
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 3	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.

Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Kontrollgruppe 5 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.

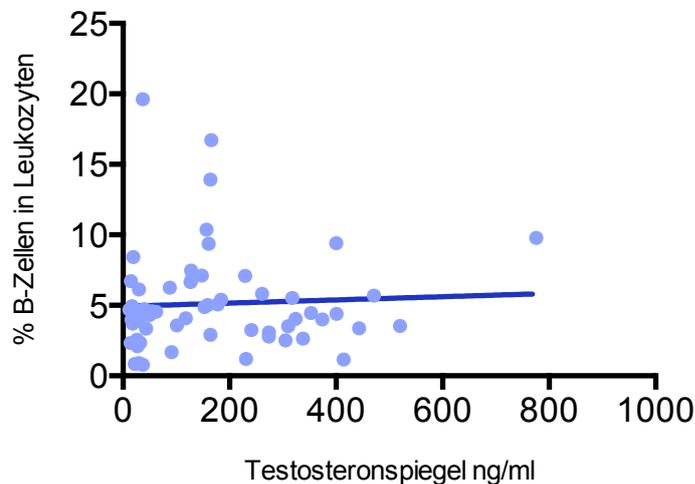


Abbildung 20: Prozentualer Anteil von B-Zellen in Leukozyten im Zusammenhang mit dem Testosteronspiegel nach der Spearman-Korrelation,  $r_s = 0,092$ .

### 3.3.4 Monozytenvorkommen in Gruppe 4 deutlich am höchsten

Innerhalb der Leukozyten zeichnen sich Monozyten durch das ihnen typische Oberflächenprotein CD14 aus. CD14+ Leukozyten wurden somit den Monozyten, nicht CD14-exprimierende Leukozyten den Nicht-Monozyten zugeordnet. Im Gruppenvergleich fanden sich statistisch signifikant in Gruppe 4 mehr Monozyten als in Gruppe 1, umgekehrt resultierend in Gruppe 1 mehr Nicht-Monozyten als in Gruppe 4 (s. Abbildung 21).

Bei der Durchführung des Kruskal-Wallis-Tests für das Vorkommen von Monozyten bzw. Nicht-Monozyten in Leukozyten berechnete sich jeweils ein p-Wert von  $\leq 0,01$  mit einem H-Wert von 15,44 bzw. 15,34. Die Werte zur deskriptiven Statistik sind den Tabellen 38 und 39 zu entnehmen. Die hierauf durchgeführten Dunn's Multiple Comparison Tests zeigten sehr signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen 1 und 4 ( $p \leq 0,01$ ). Dies gilt für das Vorkommen von Monozyten (Tabelle 40) wie auch für das Vorkommen von Nicht-Monozyten in Leukozyten (Tabelle 41). Im Mann-Whitney-U-Test ergaben sich p-Werte von jeweils  $\leq 0,001$  und somit hohem Signifikanzniveau. Korrelationen zwischen dem Testosteronwert und der jeweiligen Zellpopulation

(Monozyten bzw. Nicht-Monozyten) wurden nach Spearman getestet: Mit Korrelationskoeffizienten von  $r_s = -0,216$  bzw.  $r_s = 0,214$  ließen sich schwache bis mäßige Zusammenhänge nachweisen (s. Abbildung 22).

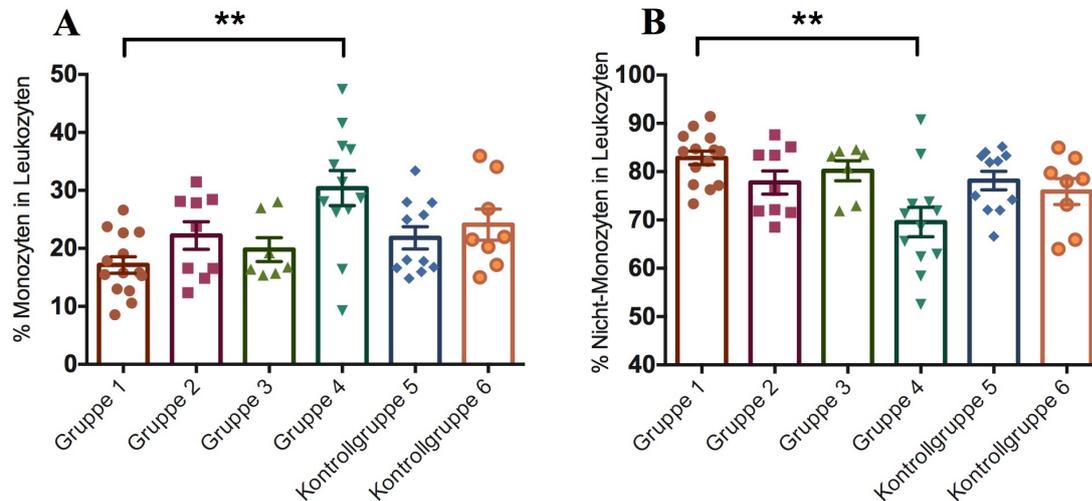


Abbildung 21: Prozentualer Anteil von Monozyten (A) und Nicht-Monozyten (B) in Leukozyten im Gruppenvergleich. Ein statistisch sehr signifikanter ( $p \leq 0,01$ ) Unterschied ließ sich zwischen Gruppe 4 und Gruppe 1 feststellen: In Gruppe 4 fand sich ein deutlich erhöhter prozentualer Anteil von Monozyten in Leukozyten im Vergleich zu Gruppe 1 (A). Hieraus erschließt sich umgekehrt ein erhöhter prozentualer Anteil von Nicht-Monozyten in Leukozyten in Gruppe 1 im Vergleich zu Gruppe 4 (B).

Tabelle 38: Deskriptive Statistik zum Vorkommen von Monozyten in Leukozyten

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6
<b>n</b>	14	9	7	12	11	8
<b>Minimum</b>	8,566	12,36	15,38	9,248	14,81	14,99
<b>Maximum</b>	26,61	31,46	28,07	47,42	33,39	35,95
<b>Median</b>	15,79	23,82	16,77	30,03	18,03	21,74
<b>Mittelwert</b>	17,14	22,22	19,8	30,4	21,82	24,09
<b>SD</b>	5,292	7,15	5,439	10,49	6,329	7,601
<b>SEM</b>	1,414	2,383	2,056	3,029	1,908	2,687

Tabelle 39: Deskriptive Statistik zum Vorkommen von Nicht-Monozyten in Leukozyten

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6
<b>n</b>	14	9	7	12	11	8
<b>Minimum</b>	73,37	68,51	71,9	52,53	66,59	64
<b>Maximum</b>	91,42	87,62	84,61	90,74	85,18	84,99
<b>Median</b>	84,19	76,16	83,22	69,93	81,95	78,24
<b>Mittelwert</b>	82,85	77,75	80,18	69,58	78,16	75,89
<b>SD</b>	5,292	7,153	5,445	10,5	6,33	7,609
<b>SEM</b>	1,414	2,384	2,058	3,032	1,909	2,69

Tabelle 40: Gruppenvergleich zum Auftreten von Monozyten in Leukozyten

<b>Gruppen</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Signifikanzniveau</b>
Gruppe 1 vs. Gruppe 2	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Gruppe 3	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Gruppe 4	≤ 0,01	**
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 3	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Kontrollgruppe 5 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.

Tabelle 41: Gruppenvergleich zum Auftreten von Nicht-Monozyten in Leukozyten

<b>Gruppen</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Signifikanzniveau</b>
Gruppe 1 vs. Gruppe 2	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Gruppe 3	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Gruppe 4	≤ 0,01	**
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 3	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Kontrollgruppe 5 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.

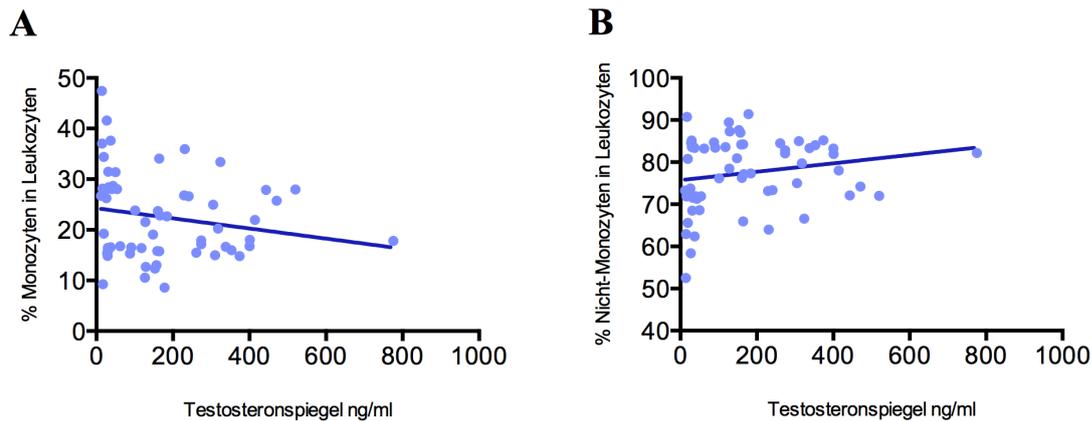


Abbildung 22: Prozentualer Anteil von Monozyten (A) und Nicht-Monozyten (B) in Leukozyten im Zusammenhang mit dem Testosteronspiegel nach der Spearman-Korrelation. Für  $r_s$  ergibt sich:  $r_s = -0,216$  (A) bzw.  $r_s = 0,214$  (B) und weist somit einen mäßigen negativen (A) bzw. positiven (B) Zusammenhang nach.

### 3.3.5 Eosinophile und Neutrophile in Gruppe 4 deutlich vermehrt und Nachweis eines mäßigen negativen Zusammenhangs zwischen ihrer Anzahl und dem Testosteronspiegel

Die Population der Nicht-Monozyten wurde anhand einer hohen Granularität (SSC) und mithilfe der CD16-Expression weiter in Eosinophile (CD16-) und Neutrophile (CD16+) differenziert. Beide Zellpopulationen fallen mit deutlich erhöhtem Vorkommen in Gruppe 4 im Vergleich zu allen anderen Gruppen auf (s. Abbildung 23). Statistisch signifikant zeichnete sich jedoch nur ein erhöhtes Vorkommen von Neutrophilen in Gruppe 4 im Vergleich zu Gruppe 5 ( $p \leq 0,05$ ) aus.

Der Kruskal-Wallis-Test für das Auftreten von Eosinophilen in Leukozyten ergab einen p-Wert von  $> 0,05$  und einen H-Wert von 6,57. Für das Auftreten von Neutrophilen in Leukozyten konnte ein p-Wert von  $p \leq 0,05$  ermittelt werden mit einem H-Wert von 11,85. Die deskriptiven Statistiken sind den Tabellen 42 und 43 zu entnehmen. Bzgl. des Vorkommens von Eosinophilen konnte mittels Dunn's Multiple Comparison Test kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden (s. Tabelle 44). Der Test ergab bzgl. der Population der Neutrophilen einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen 4 und 5 ( $p \leq 0,05$ ), s. Tabelle 45. Der Mann-Whitney-U-Test ermittelte zwischen diesen beiden Gruppen einen p-Wert von  $\leq 0,01$  (sehr signifikanter Unterschied). In der Spearman-Korrelation wurde ein  $r_s$ -Wert von  $r_s = -0,293$  bzw.  $r_s = -0,330$  ermittelt und zeigte somit einen schwachen bis mäßigen

negativen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Eosinophilen bzw. Neutrophilen und dem Testosteronspiegel (s. Abbildung 24).

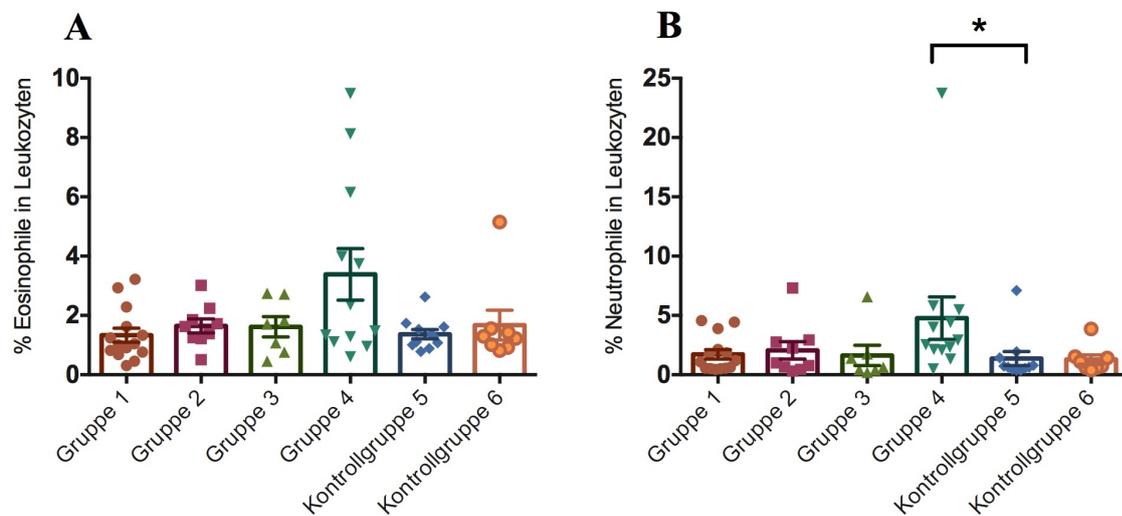


Abbildung 23: Prozentualer Anteil von Eosinophilen (A) und Neutrophilen (B) in Leukozyten im Gruppenvergleich. Das prozentuale Vorkommen von Neutrophilen in Leukozyten erwies sich zwischen Gruppe 4 im Vergleich zu Gruppe 5 als statistisch signifikant erhöht ( $p \leq 0,05$ ).

Tabelle 42: Deskriptive Statistik zum Vorkommen von Eosinophilen in Leukozyten

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6
<b>n</b>	14	9	7	12	11	8
<b>Minimum</b>	0,3083	0,5107	0,4603	0,602	0,7807	0,8135
<b>Maximum</b>	3,217	3,015	2,748	9,483	2,623	5,148
<b>Median</b>	1,026	1,624	1,713	1,919	1,299	1,259
<b>Mittelwert</b>	1,331	1,648	1,615	3,385	1,366	1,674
<b>SD</b>	0,8902	0,7052	0,9049	3,013	0,5161	1,426
<b>SEM</b>	0,2379	0,2351	0,342	0,8697	0,1556	0,5042

Tabelle 43: Deskriptive Statistik zum Vorkommen von Neutrophilen in Leukozyten

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6
<b>n</b>	14	9	7	12	11	8
<b>Minimum</b>	0,4634	0,3121	0,1957	0,4892	0,375	0,386
<b>Maximum</b>	4,569	7,313	6,57	23,73	7,104	3,86
<b>Median</b>	1,134	0,9925	0,6336	2,731	0,6238	0,9147
<b>Mittelwert</b>	1,722	2,051	1,627	4,77	1,364	1,279
<b>SD</b>	1,506	2,215	2,253	6,182	1,963	1,119
<b>SEM</b>	0,4024	0,7383	0,8517	1,785	0,592	0,3956

Tabelle 44: Gruppenvergleich zum Auftreten von Eosinophilen in Leukozyten

<b>Gruppen</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Signifikanzniveau</b>
Gruppe 1 vs. Gruppe 2	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Gruppe 3	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 3	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Kontrollgruppe 5 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.

Tabelle 45: Gruppenvergleich zum Auftreten von Neutrophilen in Leukozyten

<b>Gruppen</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Signifikanzniveau</b>
Gruppe 1 vs. Gruppe 2	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Gruppe 3	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 3	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 5	≤ 0,05	*
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Kontrollgruppe 5 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.

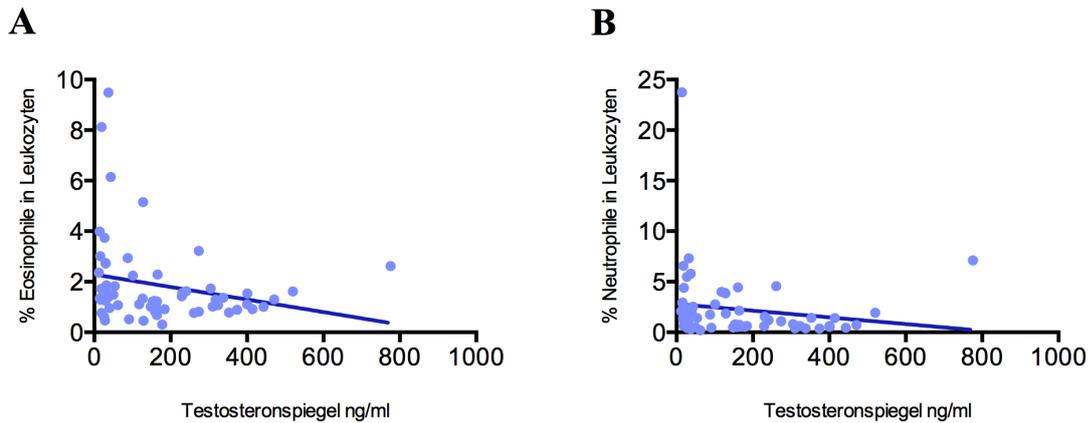


Abbildung 24: Prozentualer Anteil von Eosinophilen (A) und Neutrophilen (B) in Leukozyten im Zusammenhang mit dem Testosteronspiegel anhand der Spearman-Korrelation. Es ergibt sich für  $r_s = -0,293$  (A) bzw.  $r_s = -0,330$  (B), somit ist von einem mäßigen negativen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Eosinophilen (A) bzw. von Neutrophilen (B) mit dem Testosteronspiegel auszugehen.

### 3.3.6 Erniedrigte Anzahl Natürlicher Killer-T-Zellen in Gruppe 1 und erhöhtes Vorkommen von Natürlichen Killerzellen in Gruppe 6

CD16+ Zellen, welche zusätzlich im Seitwärtsstreulicht eine niedrige Granularität und CD56-Expression zeigten, wurden anhand von CD3-Expression in NKT-Zellen (CD3+) und NK-Zellen (CD3-) differenziert. Eminent ist hier das niedrige Vorkommen von NKT-Zellen in Gruppe 1, auch im Vergleich zur im Durchschnitt etwa gleichalten, gesunden Gruppe 5, sowie eine hohe NK-Zellzahl in Gruppe 6 (s. Abbildung 25). Statistische Signifikanz ließ sich hier jedoch nicht nachweisen.

Die Durchführung des Kruskal-Wallis-Tests für das Auftreten von NKT-Zellen bzw. von NK-Zellen in Leukozyten berechnete jeweils einen p-Wert von  $> 0,05$  mit einem H-Wert von 6,85 bzw. einem H-Wert von 7,35. Die hierzu ermittelten deskriptiven Statistiken sind in den Tabellen 46 und 47 dargestellt. Die im Anschluss durchgeführten Dunn's Multiple Comparison Tests (s. Tabellen 48, 49) erwiesen im Gruppenvergleich der NKT-Zellen wie auch der NK-Zellen in Leukozyten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Die Spearman-Korrelationen ergaben keinen Zusammenhang zwischen NKT-Zellen bzw. NK-Zellen und dem Testosteronwert mit errechneten Korrelationskoeffizienten von  $r_s = 0,025$  bzw.  $r_s = -0,062$  (s. Abbildung 26).

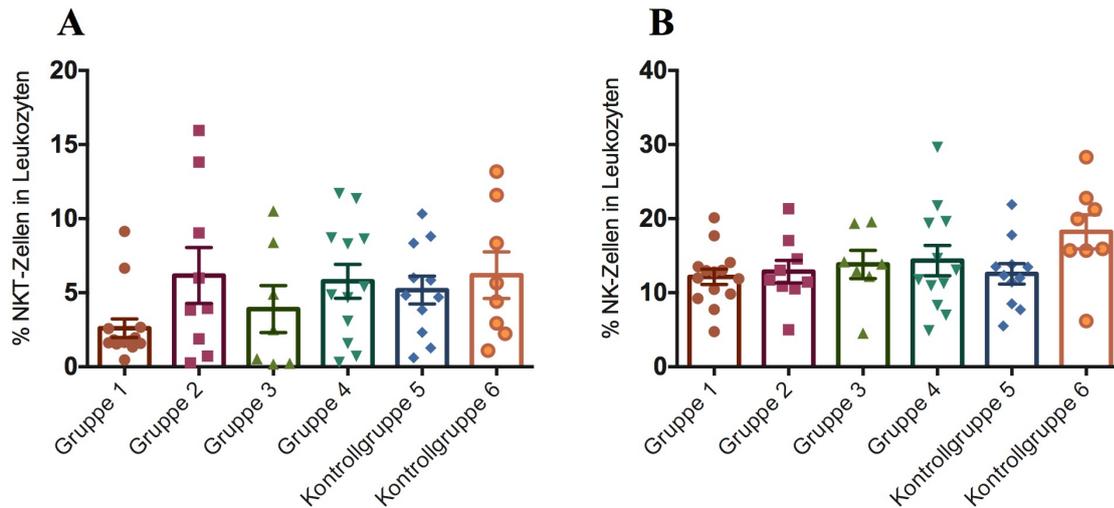


Abbildung 25: Prozentualer Anteil von NKT-Zellen (A) und NK-Zellen (B) in Leukozyten im Gruppenvergleich ohne Nachweis eines statistisch signifikanten Unterschieds. Auffallend sind jedoch eine deutlich geringere NKT-Zellzahl in Gruppe 1 (A) und erhöhte NK-Zellzahlen in Gruppe 6 (B) im Vergleich zu allen anderen Gruppen.

Tabelle 46: Deskriptive Statistik zum Vorkommen von NKT-Zellen in Leukozyten

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6
<b>n</b>	14	9	7	12	11	8
<b>Minimum</b>	0,4675	0,2629	0,1821	0,2996	0,6098	1,097
<b>Maximum</b>	9,134	15,96	10,52	11,7	10,33	13,18
<b>Median</b>	1,705	3,949	2,516	5,127	4,83	5,029
<b>Mittelwert</b>	2,6	6,161	3,898	5,77	5,173	6,18
<b>SD</b>	2,353	5,656	4,191	3,954	3,118	4,447
<b>SEM</b>	0,6289	1,885	1,584	1,141	0,94	1,572

Tabelle 47: Deskriptive Statistik zum Vorkommen von NK-Zellen in Leukozyten

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6
<b>n</b>	14	9	7	12	11	8
<b>Minimum</b>	4,752	5,006	4,552	4,874	5,521	6,165
<b>Maximum</b>	20,11	21,33	19,59	29,63	21,9	28,3
<b>Median</b>	12,39	11,73	13,86	12,39	12,34	17,94
<b>Mittelwert</b>	12,14	12,84	13,82	14,34	12,54	18,22
<b>SD</b>	3,85	4,565	5,06	7,083	4,571	6,525
<b>SEM</b>	1,029	1,522	1,912	2,045	1,378	2,307

Tabelle 48: Gruppenvergleich zum Auftreten von NKT-Zellen in Leukozyten

Gruppen	p-Wert	Signifikanzniveau
Gruppe 1 vs. Gruppe 2	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Gruppe 3	> 0,05	n.s.

Gruppe 1 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 3	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Kontrollgruppe 5 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.

Tabelle 49: Gruppenvergleich zum Auftreten von NK-Zellen in Leukozyten

<b>Gruppen</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Signifikanzniveau</b>
Gruppe 1 vs. Gruppe 2	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Gruppe 3	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 3	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Kontrollgruppe 5 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.

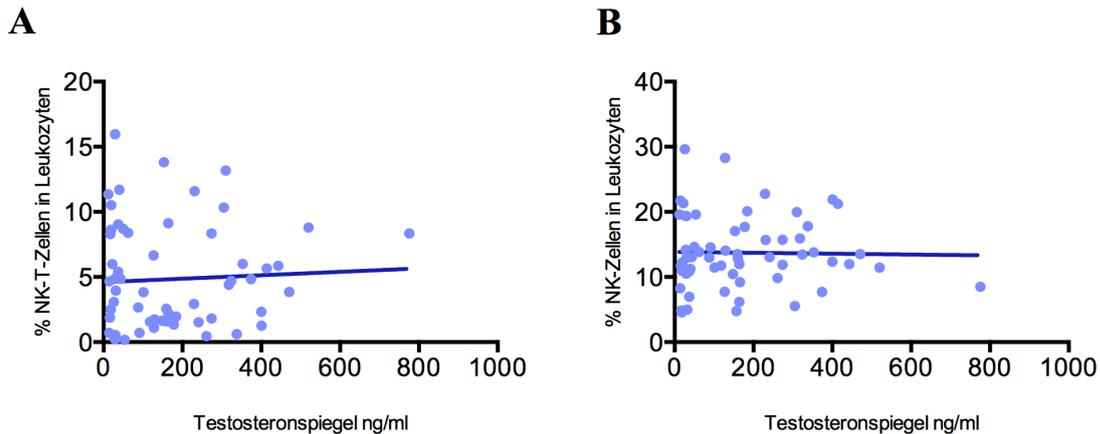


Abbildung 26: Prozentualer Anteil von NKT-Zellen (A) und NK-Zellen (B) in Leukozyten im Zusammenhang mit dem Testosteronspiegel nach der Spearman-Korrelation. Es ergibt sich für den Korrelationskoeffizienten  $r_s$  in (A)  $r_s = 0,025$  bzw. in (B)  $r_s = -0,062$ .

### 3.3.7 Erhöhte Anzahl von Tregs in den Gruppen 1-4 und Nachweis eines geringen bis mäßigen negativen Zusammenhangs zwischen Tregs und dem Testosteronspiegel

Tregs wurden in dieser Arbeit anhand der Expression der Oberflächenproteine CD4, CD25 und Foxp3 identifiziert. Ins Auge fiel hier im Gruppenvergleich, trotz fehlender statistischer Signifikanz, das erhöhte Vorkommen von Tregs in den Gruppen 1-4 im Vergleich zum Vorkommen in den Kontrollgruppen 5 und 6 (s. Abbildung 27).

Der Kruskal-Wallis-Test für das Auftreten von Tregs in PBMC bzw. in der CD4+CD25+ Zellpopulation ergab in beiden Analysen jeweils einen p-Wert von  $> 0,05$  und einen H-Wert von 4,682 bzw. 5,013. Die deskriptive Statistik ist in den Tabellen 50 und 51 dargestellt. Mittels Dunn's Multiple Comparison Test konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden (s. Tabelle 52, 53). In der Spearman-Korrelation wurde ein  $r_s$ -Wert von -0,188 bzw. -0,226 ermittelt und erwies somit einen geringen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Tregs in PBMC und dem Testosteronspiegel bzw. einen mäßigen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Tregs in der CD4+CD25+ Zellpopulation und dem Testosteronspiegel (s. Abbildung 28).

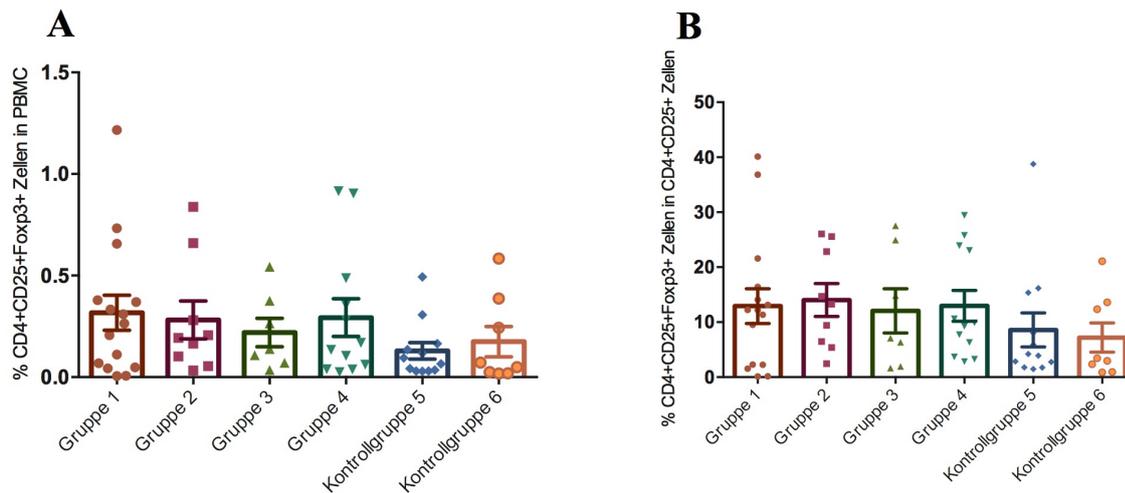


Abbildung 27: Prozentualer Anteil von Tregs in PBMC (A) bzw. in CD4+CD25+ Zellen (B) im Gruppenvergleich. Die Gruppen 1-4 präsentieren im Vergleich zu den Kontrollgruppen 5 und 6 ein prozentual höheres Vorkommen von Tregs, eine statistische Signifikanz verifiziert sich jedoch nicht.

Tabelle 50: Deskriptive Statistik zum Vorkommen von Tregs in PBMC

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6
<b>n</b>	15	9	7	12	12	8
<b>Minimum</b>	0,005454	0,03327	0,03491	0,02482	0,02887	0,01742
<b>Maximum</b>	1,217	0,8381	0,5435	0,9156	0,4938	0,5833
<b>Median</b>	0,2645	0,1934	0,1387	0,1516	0,08013	0,0607
<b>Mittelwert</b>	0,3168	0,2814	0,2195	0,2928	0,1288	0,1745
<b>SD</b>	0,3343	0,2795	0,1855	0,3211	0,1406	0,2119
<b>SEM</b>	0,08633	0,09318	0,07012	0,0927	0,0406	0,07491

Tabelle 51: Deskriptive Statistik zum Vorkommen von Tregs in CD4+CD25+ Zellen

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6
<b>n</b>	15	9	7	12	12	8
<b>Minimum</b>	0,1215	2,465	1,641	2,819	1,487	0,8459
<b>Maximum</b>	40,13	26,06	27,52	29,44	38,78	21,08
<b>Median</b>	12,18	13,27	7,071	9,56	4,063	3,197
<b>Mittelwert</b>	12,92	14,02	12,04	12,97	8,586	7,193
<b>SD</b>	12,25	8,966	10,65	9,728	10,76	7,518
<b>SEM</b>	3,162	2,989	4,025	2,808	3,106	2,658

Tabelle 52: Gruppenvergleich zum Auftreten von Tregs in PBMC

Gruppen	p-Wert	Signifikanzniveau
Gruppe 1 vs. Gruppe 2	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Gruppe 3	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.

Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 3	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Kontrollgruppe 5 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.

Tabelle 53: Gruppenvergleich zum Auftreten von Tregs in CD4+CD25+ Zellen

<b>Gruppen</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Signifikanzniveau</b>
Gruppe 1 vs. Gruppe 2	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Gruppe 3	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 1 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 3	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 2 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Gruppe 4	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 3 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 5	> 0,05	n.s.
Gruppe 4 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.
Kontrollgruppe 5 vs. Kontrollgruppe 6	> 0,05	n.s.

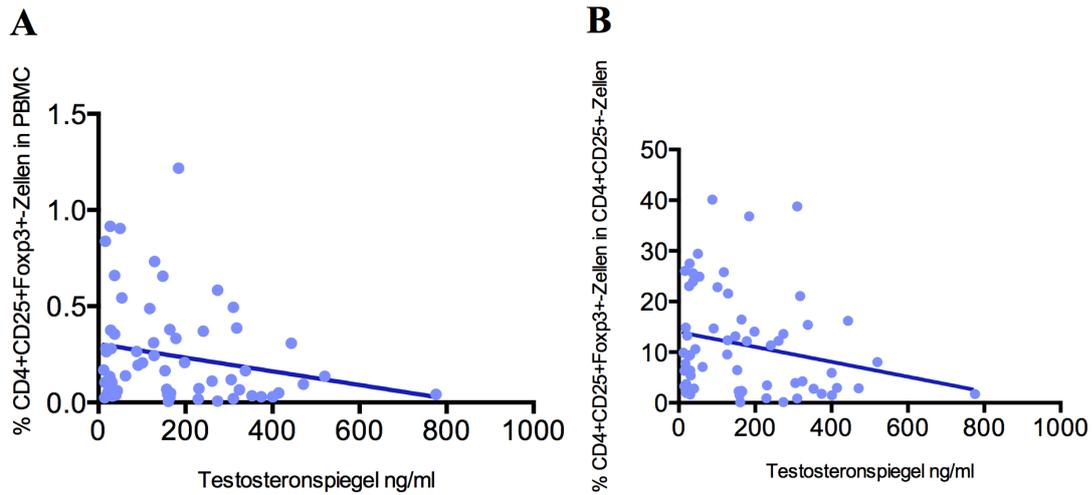


Abbildung 28: Prozentualer Anteil von Tregs in PBMC (A) bzw. in der CD4+CD25+ Zellpopulation (B) im Zusammenhang mit dem Testosteronspiegel. Für den Spearman-Korrelationskoeffizienten  $r_s$  ergibt sich:  $r_s = -0,188$  (A) bzw.  $r_s = -0,226$  (B) und somit Nachweis eines geringen (A) bis mäßigen (B) negativen Zusammenhangs zwischen Tregs und dem Testosteronspiegel.

## 4 Diskussion

### 4.1 Unterschiede im Vorkommen der Immunzellpopulationen insbesondere zwischen den Gruppen 1 und 4

Mittels der Immunophänotypisierungsfärbung wurden Immunzellpopulationen anhand ihrer Oberflächenmarker und dem Streuverhalten in der Durchflusszytometrie differenziert. Hier zeigen sich in den Auswertungen insbesondere zwischen den Patientengruppen 1 und 4 teilweise höchst signifikante Unterschiede.

Die Patientengruppe 1 umfasst 15 Patienten, die durch ein nicht behandeltes Testosterondefizit auffielen. Sie waren zum Zeitpunkt der Studienteilnahme nicht an Krebs erkrankt, erhielten keine ADT und das Durchschnittsalter betrug 50,2 Jahre. Mit einem durchschnittlichen Testosteronwert von 175,67 ng/dl lag der Testosteronserumspiegel deutlich unter dem Normwert (300-1000 ng/dl, Zentrallabor Uniklinik Gießen), aber nicht im Kastrationsbereich von < 50 ng/dl. Die Patientengruppe 4 hingegen wies mit einem durchschnittlichen Testosteronwert von 34,83 ng/dl einen Serumspiegel im Kastrationsbereich auf. Sie bildet sich aus zwölf Patienten, die an einem kastrationsresistenten Prostatakarzinom erkrankt waren und antiandrogen behandelt wurden. Ihr durchschnittliches Alter lag mit 75,5 Jahren deutlich höher als das der Gruppe 1.

In Gruppe 4 fand sich das im Mittelwert geringste Aufkommen von Leukozyten, insbesondere im Vergleich zum Vorkommen in Gruppe 1 mit der dagegen höchsten Leukozytenzahl. Auch im Rahmen der T-Zell-Detektion fand sich in Gruppe 4 ein statistisch signifikantes, erniedrigtes T-Zellaufkommen im Vergleich zu Gruppe 1. Statistisch nicht signifikant, aber deutlich ins Auge fallend, bestätigte sich dies auch im Vergleich von Gruppe 4 zu allen anderen Gruppen, insbesondere zu Gruppe 3. Patientengruppe 3 umfasst sieben Patienten mit einem metastasierten und – im Gegensatz zu Gruppe 4 – hormonsensiblen Prostatakarzinom unter ADT mit einem Durchschnittsalter von 76,71 Jahren und einem durchschnittlichen Testosteronserumspiegel von 34,34 ng/dl.

Unterteilt man die Gruppe der T-Zellen anhand ihrer CD4- bzw. CD8-Expression, ließen sich besonders interessante Ergebnisse konstatieren: Statistisch sehr bis höchst signifikant erwiesen sich die Unterschiede zwischen den Gruppen 3 und 4 bzw. 1 und 4,

in deren Vergleich sich Gruppe 4 mit einer deutlich geringeren CD4+ T-Zellzahl hervorhob. Im Gegensatz dazu fanden sich mehr CD8+ T-Zellen innerhalb der T-Zellpopulation in Gruppe 4 als in Gruppe 1 oder 3. Ebenso deutlich höher in Gruppe 4 im Vergleich zu Gruppe 1 fiel das Vorkommen von NKT-Zellen auf.

Im Mittelwert ca. doppelt so häufig fanden sich B-Zellen in Gruppe 1 im Vergleich zum Auftreten in Gruppe 4. Ebenso signifikant erhöht in Gruppe 1 im Vergleich zu Gruppe 4 wurden Monozyten nachgewiesen.

Bei eosinophilen und neutrophilen Granulozyten zeigten sich wiederum deutlich höhere Anzahlen in Gruppe 4 im Vergleich zu allen anderen Gruppen. Als statistisch signifikant erwies sich hier lediglich das höhere Vorkommen von Neutrophilen in Gruppe 4 im Vergleich zu Gruppe 5. Gruppe 5 umfasst zwölf Kontrollpatienten ohne Prostatakarzinom mit normwertigem Testosteronspiegel und einem durchschnittlichen Alter von 51,25 Jahren.

Statistisch signifikante Unterschiede ließen sich insbesondere zwischen den Gruppen 1 und 4 nachweisen. Statistisch nicht immer signifikant, aber deutlich ins Auge fallend, unterschieden sich die Zellzahlen in Gruppe 4 wiederholt von allen anderen Gruppen. Hauptmerkmal dieser Gruppe – auch im Unterschied zu den ebenfalls ADT-erhaltenden Prostatakarzinompatienten der Gruppen 2 und 3 – ist das kastrationsresistente Tumorstadium der Patienten.

Diese Kastrationsresistenz der Tumorzellen ist unter anderem bedingt durch die Wiederaktivierung des Androgenrezeptors durch dynamische Androgenrezeptor-Veränderungen und somit zunehmender Resistenz gegenüber ADT.<sup>11,52,53,91,96</sup> Die hier von statten gehenden Mechanismen, die zu einem progredienten Versagen der ADT führen, sind von großem Forschungsinteresse.

Wie in einigen Studien belegt (s. ausführlicher in Kapitel 4.2), führt ADT zum Anstieg der Thymusgröße und der T-Zellzahl.<sup>3,19,65</sup> Gruppe 4 präsentiert in dieser Arbeit im Gegensatz zu allen anderen Gruppen jedoch deutlich erniedrigte T-Zellzahlen. Im Vergleich zu der Beobachtung von Akins et al., dass zu Beginn einer ADT erhöhte CD8+ Effektorzellen aufzufinden seien<sup>21</sup>, zeigte sich in dieser Studie allerdings die höchste CD8+ T-Zellanzahl in Gruppe 4 – die Gruppe, mit der vermeintlich längsten ADT-Zeit. Hierauf wird in Kapitel 4.2 näher eingegangen.

Pal et al. konnten 2019 eine niedrigere Anzahl an CD3+ T-Zellen in Patienten mit Abirateron- und/oder Enzalutamid-Therapie-resistenten, metastasierten und kastrationsresistenten Prostatakarzinom im Vergleich zu therapiesensitiven Patienten nachweisen. Im Vorkommen von CD3+CD8+ T-Zellen ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen manifestieren. Anzumerken ist hier eine kleine Patientenzahl von acht therapiesensitiven und sechs therapieresistenten Studienteilnehmern.<sup>74</sup>

Hajashi et al. bewiesen 2017 in ihrer in Japan durchgeführten Studie, dass die Anzahl der Monozyten im peripheren Blut von Patienten mit einem lokalen Prostatakarzinom, die sich einer radikalen Prostatektomie unterzogen, ein prädikativer Faktor für die Tumorprogression und Krankheitsprognose darstellt.<sup>39</sup> Bei Patienten im kastrationsresistenten Tumorstadium eines Prostatakarzinoms nach Docetaxel-Therapie konnten Shigeta et al. 2016 ebenso einen Zusammenhang zwischen hohen Monozytenzahlen und aggressivem Tumorwachstum feststellen.<sup>85</sup> Bezug nehmend auf diese beiden, in der japanischen Bevölkerung durchgeführten Studien, stellten Yirga et al. 2021 ihre in den USA ermittelten Ergebnisse vor: Hier ließ sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem peripheren Monozyten-Aufkommen und dem langfristigen Tumorgeschehen von kastrationsresistenten Prostatakarzinompatienten nach Prostatektomie manifestieren.<sup>95</sup> Umweltfaktoren oder Ethnie könnten hier als ursächliche Faktoren mitwirken.

Bemerkenswert in dieser Studie ist zudem ein unabhängig der Einteilung in die Patientengruppen bestehender, positiver Zusammenhang des prozentualen T-Zellvorkommens in PBMC in Korrelation mit dem Testosteronwert – im Gegensatz hierzu, wie in Kapitel 4.2 näher beschrieben, besteht eine geringe bis mäßige negative Korrelation bei Treg-Zellen und Testosteron.

Zu konstatieren ist, dass Forschungsergebnisse zum numerischen Vorkommen von verschiedenen Immunzellpopulationen im peripheren Blut in Abhängigkeit von Geschlechtshormonen wie Testosteron sowie von diversen Einflussfaktoren wie Alter, Tumorerkrankung, Tumorstadium, Vortherapien, Geschlecht, Ethnie oder geografischer Lage nicht eindeutig und insbesondere bis dato in ihrer Vielzahl nicht ausreichend sind. Es existiert hier ein großer Studienbedarf, um zukünftig den Einfluss von Geschlechtshormonen auf Immunzellmechanismen zu verstehen. Wird dieses

Verständnis ausgebaut, könnten hiervon bevorstehende klinische Studien in der Krebs- und Autoimmuntherapie profitieren und erfolgreicher entwickelt werden.

#### **4.2 Nachweis eines negativen Zusammenhangs zwischen dem Testosteronserumspiegel und dem Vorkommen von Tregs**

Tregs wurden insbesondere anhand der Foxp3-Expression detektiert. Zwischen den Patientengruppen ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Anzahl von Tregs in PBMC oder in der CD4+CD25+ T-Zellpopulation nachweisen. Wenn auch statistisch nicht signifikant nachweisbar, fällt in den Ergebnissen dieser Studie deutlich auf (s. Abbildung 27, s. Tabellen 50 und 51), dass die beiden Kontrollgruppen 5 und 6 die geringsten Treg-Anzahlen im Vergleich zu den untersuchten Probandengruppen Gruppe 1 bis 4 aufweisen. Somit zeigen die beiden Gruppen mit den deutlich höchsten durchschnittlichen Testosteronserumwerten das durchschnittlich geringste Treg-Aufkommen. Unabhängig der Patientengruppen konnte in der Spearman-Korrelation ein negativer Zusammenhang von geringer bis mäßiger statistischer Signifikanz zwischen dem Vorkommen von Tregs und dem Testosteronspiegel verifiziert werden. Dies galt für die Anzahl der Tregs in PBMC wie auch in der CD4+CD25+ T-Zellpopulation (s. Kapitel 3.3.7).

Diese in dieser Arbeit nachgewiesene negative Korrelation ist insbesondere deswegen interessant, da im Gegensatz dazu in vorherigen Studien eine positive Korrelation zwischen dem Vorkommen von Tregs und dem Testosteronspiegel und damit einhergehend immunsuppressive Vorgänge bestätigt werden konnten<sup>24,25,94</sup>, wobei Unterschiede im Studienmodell (*in vitro* vs. *in vivo*; Mensch vs. Tier) zu beachten sind:

*In vitro* wurde bewiesen, dass Testosteron einen Anstieg von Foxp3+ Treg-Zellen innerhalb der T-Zellpopulation induziert. Dieser Effekt war durch die Zugabe des Androgenantagonisten Flutamid reversibel.<sup>24</sup> Auch *in vivo* wurde in der EAO der Ratte ein Anstieg von Tregs unter Testosteronsubstitution mit simultaner Besserung der EAO-Symptomatik beobachtet.<sup>25</sup> Walecki et al. verifizierten 2015 *in vivo* einen Anstieg von Tregs bei Frauen, die sich in der Ovulationsphase des Menstruationszyklus befanden, in der es zu einem Testosteronanstieg kommt. Die Zahl der nachgewiesenen Tregs im Blut zeigte sich signifikant erhöht im Vergleich zu Frauen in der postmenopausalen Phase wie auch im Vergleich zu Männern. Weiter bestätigte sich *in vitro* ein Unterschied zwischen testosteroninduzierter Treg-Entstehung bei Frauen und Männern: Eine

Androgenrezeptor-vermittelte Stimulation zur Differenzierung von humanen T-Zellen zu Tregs konnte aufgezeigt werden und erwies sich bei Frauen als signifikant konzentrationsabhängig. Bei Männern ließ sich dies jedoch nicht nachweisen.<sup>94</sup> Diese Ergebnisse implizieren, dass die Androgenrezeptor-vermittelte Treg-Entstehung geschlechtsspezifisch abläuft. Sie deuten darauf hin, dass T-Zellen weiblicher Probanden stärker auf Androgenstimulation reagieren als T-Zellen männlicher Probanden, die physiologisch einem höheren Testosteronserumspiegel ausgesetzt sind. Dies könnte therapeutische Relevanz haben, indem mittels T-Zellen weiblicher Probanden die Entstehung von Tregs stimuliert und so bspw. überschießende Immunantworten reguliert werden könnten.

Andere Studien zeigen, dass neben Testosteron auch andere Geschlechtshormone wie Östrogen oder Progesteron Tregs beeinflussen. Gold und Voskuhl beschrieben 2009 die Effekte von Testosteron wie auch Östrogen als neuroprotektiv und antiinflammatorisch.<sup>33</sup> Auch Lee und Ulrich zeigten 2011, dass Progesteron die Differenzierung von T-Zellen in regulatorische T-Zellen fördert, ihre Differenzierung in Effektorzellen wie TH17-Zellen dagegen unterdrückt. Tregs wiederum hemmen mittels TGF (Transforming Growth Factor, deutsch: transformierender Wachstumsfaktor)-beta-Produktion inflammatorische Reaktionen.<sup>57</sup> Ebenso konnten Tai et al. 2008 den positiven Einfluss von Östrogen über Östrogenrezeptoren auf die Entstehung von Tregs in ihren *in vivo*- und *in vitro*-Versuchen an Mäusen nachweisen. Foxp3- und IL-10-Expressionen erwiesen sich unter Östrogenstimulation als steigend.<sup>88</sup> Weiter ist ein nicht-steroidaler Einfluss durch myeloide Suppressorzellen (MDSC, englisch: Myeloid-Derived Suppressor Cells) bewiesen: MDSC können aus CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Entstehung von Tregs oder TH17-Effektorzellen generieren.<sup>40</sup> Vermehrte Anzahlen von MDSC wie auch von Tregs im peripheren Blut von Patienten mit einem kastrationsresistenten Prostatakarzinom unter unterschiedlichster Tumorthherapie (ADT, Chemotherapie etc.) im Vergleich zum Auftreten im Blut gesunder Probanden wurden in der Arbeit von Idorn et al. 2014 aufgezeigt.<sup>44</sup> Derhovannessian et al. bewiesen ebenfalls 2009 ein erhöhtes Aufkommen von Tregs, hier definiert als CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>CD25<sup>+</sup>, im peripheren Blut von Prostatakarzinompatienten, verglichen mit Blutproben gesunder Probanden.<sup>23</sup> Flammiger et al. konnten in Gewebeproben einer großen Kohorte von 3261 Prostatakarzinompatienten nach radikaler Prostatektomie feststellen, dass eine höhere Anzahl intratumoraler Tregs mit einem fortgeschrittenem Tumorstadium und

einem ungünstigen klinischen Verlauf, gemessen an der Zeit des rezidivfreien Überlebens, korrelierte.<sup>27</sup>

Idorn et al. konnten außerdem einen positiven Zusammenhang in der Spearman-Korrelation zwischen dem Auftreten von Tregs und MDSC im Blut von Prostatakarzinompatienten feststellen. Obwohl dieser Zusammenhang statistisch signifikant war, fand sich in manchen Patienten mit wenigen MDSC eine hohe Treg-Anzahl und umgekehrt.<sup>44</sup> Auch in dieser Studie zeigten sich zwischen dem Testosteronspiegel und der Tregs-Anzahl ebenso wie bei Idorn Ausreißer: Teilweise fanden sich bei Patienten mit hohem Testosteronwert auch hohe Tregs-Zahlen und umgekehrt. Diese Ergebnisse unterstreichen die verschiedenen Einflussfaktoren auf das Vorkommen von Tregs. Der Einfluss auf die Entstehung von Tregs ist somit als multifaktoriell anzusehen.

Es ist Fakt, dass ADT eine Apoptose des Primärtumors induziert. ADT fördert zudem das Thymuswachstum, stimuliert die Entwicklung peripherer T-Zellen und erhöht die T-Zell-Antwort auf Prostatakarzinomantigene.<sup>3,19,65</sup> Tang et al. deckten jedoch in einer *in vivo*-Studie mit Mäusen ADT-vermittelte, gegensätzliche (stimulierende wie auch hemmende) Immunantworten bzgl. der Bekämpfung von Prostatakrebs auf: Kastration bedingt die Apoptose hormon-abhängiger Prostatakarzinomepithelzellen. Die hiermit freigesetzten Tumorantigene bzw. deren Präsentation stimulieren das Wachstum CD8+ zytotoxischer T-Zellen innerhalb des Tumors, welche wiederum IL-2 produzieren und hierüber die Entstehung von Tregs anregen. Diese wiederum haben einen hemmenden Einfluss auf die CD8+ T-Zellfunktion. Nachgewiesen wurde zudem, dass durch eine Kastration mit zusätzlicher Treg-Depletion der Effekt von CD8+ T-Zellen verstärkt und länger aufrechterhalten werden konnte.<sup>89,90</sup> Dieser soeben beschriebene Kreislauf ist eine mögliche Erklärung für die nur vorübergehende Wirkung von ADT und die Entstehung bzw. den Tumorprogress in ein kastrationsresistentes Prostatakarzinomstadium. Auch Akins et al. untersuchten 2010 die Auswirkungen von Androgendeprivation auf T-Zellen im Prostatakarzinom in prostataspezifischen Pten-Knockout-Mäusen. Es erwies sich, dass zu Beginn einer Androgendeprivation die Anzahl der Tumor-bekämpfenden CD8+ Effektorzellen ansteigt, im Verlauf jedoch wieder eine Zellzahl wie zu Beginn bzw. vor Therapie erreicht wird. Eine Auswirkung auf die Treg-Anzahl zeigte sich jedoch nicht.<sup>21</sup> In dieser Studie fällt innerhalb der ADT-erhaltenden Patientengruppen (Gruppen 2-4) Gruppe 3

mit einem erniedrigtem prozentualen Treg-Aufkommen in PBMC im Vergleich zu den Gruppen 2 und 4 auf (s. Abbildung 27). Dieses Phänomen springt bei der Untersuchung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen ebenfalls ins Auge: Es konstatiert sich in Gruppe 3 ein geringerer prozentualer Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Leukozyten bzw. in T-Zellen als in den Gruppen 2 und 4 (s. Abbildung 15). Hier ist zu beachten, dass aufsteigend von Gruppe 2, zu Gruppe 3, zu Gruppe 4 von einem progredienten Tumorgeschehen mit entsprechend fortschreitender ADT-Zeit auszugehen ist. Zudem ist eine erhöhte Anzahl von Treg-Zellen in allen drei ADT-erhaltenden Prostatakarzinompatientengruppen (Gruppen 2-4) im Vergleich zu den Prostatakarzinompatienten ohne ADT (Kontrollgruppe 6) hervorzuheben. Das Verständnis eines langen Einsatzes von ADT und Auswirkungen auf Tregs und andere Immunzellpopulationen könnte zukünftig der Entwicklung von effektiveren Immuntherapien für das fortgeschrittene Prostatakarzinom insbesondere im kastrationsresistenten Stadium bedeuten.

Immuntherapien mit Einsatz von Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICI) sind in der medikamentösen Tumorthherapie bei vielen Tumorentitäten klinisch bereits mit teilweise großem Erfolg im Einsatz. Durch eine PD-1 (Programmed Cell Death Protein 1)-Rezeptorblockade oder eine Blockade des Liganden (PDL-1, Programmed Death-Ligand 1) fördern ICI die körpereigene Tumorabwehr. Auch im Bereich der Behandlung von Prostatakrebs im kastrationsresistenten Stadium konnten neueste Erfolge mit einem ICI erzielt werden: Eine Monotherapie mit Pembrolizumab, einem PD1-Inhibitor, zeigte bspw. in der KEYNOTE-199-Studie bei Patienten mit einem kürzlich progredient metastasierenden, kastrationsresistenten Prostatakarzinom nach bereits erfolgter Chemotherapie mit Docetaxel oder mindestens nach einer Hormontherapie eine Antitumoraktivität und Krankheitskontrolle.<sup>2</sup> Weitere klinische Studien mit Pembrolizumab zusätzlich zu einer weiteren Medikation im Sinne einer Kombinationstherapie scheinen vielversprechend und werden aktuell durchgeführt: Die Phase-III-Studie KEYNOTE-991 bei einem neu diagnostizierten, hormonsensitiven, metastasierten Prostatakarzinom in Kombination mit Enzalutamid und ADT, die Phase-III-Studie KEYNOTE-641 mit Enzalutamid bei Patienten mit einem progredienten kastrationsresistenten Prostatakarzinom unter Abiraterontherapie oder die Phase-III-Studie KEYNOTE-921 mit einer Kombinationstherapie mit Docetaxel bei Patienten, die zuvor ein Tumorwachstum unter einer Therapie mit Abirateron oder Enzalutamid aufwiesen.

PD-1-Rezeptoren sind auf verschiedenen Immunzellpopulationen wie Tregs, Effektor-T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen zu finden. Eine Interaktion mit diesen kann bspw. bei Effektor-T-Zellen eine Hemmung der Zelle bewirken, dagegen konnte bei Tregs eine Proliferation, Stabilisierung und erhöhte Suppressorfunktion durch PD-1-Rezeptor-Aktivierung festgestellt werden.<sup>29</sup> Je nach Aktivierung von Effektor- oder Treg-Zellpopulation über den PD-1-Rezeptor konnte eine Tumorregression bzw. -progression beobachtet werden.<sup>1,72</sup> In anderen Studien zeigte Pembrolizumab jedoch keine Auswirkung auf die vorherrschenden Treg-Subpopulationen, allerdings eine Erneuerung von CD8+ T-Effektorzellen.<sup>93</sup>

Nicht nur bei Prostatakarzinompatienten, auch in anderen soliden Tumor- und hämatologischen Krebserkrankungen sind erhöhte Treg-Zahlen bekannt.<sup>6,44</sup> Weiter wiesen Gregg et al. eine altersabhängige Anzahl von Tregs nach: Die Anzahl von Tregs korrelierte positiv mit dem Alter.<sup>35</sup> Nishikawa und Sakaguchi fassten 2010 zusammen, dass Tregs mit dem Eindämmen von Anti-Tumorantworten bzw. mit Tumorprogress in Verbindung stehen.<sup>70</sup> Beyer und Schultze sprachen bereits 2006 davon, dass ein Tumorstadium-abhängiges Auftreten von Tregs in Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben stehen könne.<sup>6</sup> Von therapeutischen Erkenntnissen könnten somit nicht nur Prostatakarzinompatienten profitieren und weitere Studien in anderen Krebsarten folgen.

In der Zukunft ist mit einer zunehmend individualisierten Krebstherapie zu rechnen, abhängig einerseits von fixen Faktoren wie Geschlecht, Alter und Vortherapien, andererseits von variablen bzw. gezielt beeinflussbaren Faktoren wie Hormon- und Immunzellstatus. Die individuelle Regulation dieser beeinflussbaren Faktoren könnte eine weitere Verbesserung der zukünftigen Karzinomtherapie bedeuten.

## **4.3 Methodenkritik**

### **4.3.1 Patientenkollektiv**

Die sechs Gruppen, bestehend aus männlichen Patienten der Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, beinhalten vier Gruppen mit Prostatakarzinompatienten (Gruppe 2-4 unter ADT, Kontrollgruppe 6 ohne ADT) mit einem durchschnittlichen Alter zwischen 72-77 Jahren und zwei Gruppen mit Patienten ohne Prostatakarzinom (Gruppe 1 mit erniedrigtem Testosteronspiegel, Kontrollgruppe 5 mit normwertigen

Testosteronspiegel) mit einem durchschnittlichen Alter zwischen 50 und 52 Jahren (s. Kapitel 3.1.7, Tabelle 19). Zu beachten ist somit, dass zwei Altersgipfel unter den Patientengruppen bestehen. Die durchschnittlich älteren Patientengruppen umfassen Patienten mit einem akuten Karzinomgeschehen. Weiter weisen ältere Menschen in der Regel mehr Komorbiditäten auf und nehmen damit einhergehend mehr Medikamente ein. In dieser Arbeit wurden Patienten mit bspw. akuten anderen Karzinomerkrankungen oder Infektionen ausgeschlossen, jedoch waren unterschiedliche Komorbiditäten und Medikationen vorhanden. Weiter haben die Patientengruppen 2-4 verschiedene in die Testosteronsynthese bzw. -wirkung eingreifende Medikationen erhalten, die notiert, aber nicht weiter unterschieden wurden. Darunter sind u.a. auch Patienten, die neben LHRH-Analoga zusätzlich Antiandrogene und damit eine komplette Androgenblockade erhalten haben. Zudem wurde die Dauer der Medikation nicht berücksichtigt.

Im Zusammenhang mit dem Patientenkollektiv ist die Schwierigkeit der Ermittlung von Vergleichswerten zum prozentualen (geschlechtsspezifischen) Treg-Aufkommen im Blut eines möglichst großen gesunden Patientenkollektivs zu erwähnen. Neben eher kleinen Patientenkollektiven unterscheidet sich zudem die Identifikation bzw. die Markierung von Treg-Zellen zwischen Arbeiten, was wiederum die Vergleichbarkeit und die Erstellung von Normwerten erschwert: Während in dieser Studie der Mittelwert von Tregs in PBMC der Kontrollgruppe 5 (Männer ohne Prostatakarzinom, durchschnittliches Alter von 51,25 Jahren, n=12) 0,1288 % betrug, fanden Idorn et al. Mittelwerte von ca. 3 % bei Gesunden (n=36).<sup>44</sup> Das Geschlecht war jedoch nicht angegeben, die untersuchten Blutproben entstammten einer Blutbank, und Tregs waren definiert als CD3+CD4+CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> Zellen. Weiter fanden sich bspw. bei Walecki et al. Mittelwerte von Tregs in PBMC männlicher Gesunder von 0,91 % (23-35 Jahre, n=6) bzw. 1,08 % (> 60 Jahre, n=6). Tregs waren ebenso wie in dieser Arbeit als CD4+CD25+Foxp3+ T-Zellen definiert.<sup>94</sup>

Für folgende Studien wäre es interessant, wenn Komorbiditäten, Medikationen sowie Art und Dauer der antiandrogenen Therapie unterschieden werden. Um signifikante Analysen durchführen zu können, sind hierzu große Patientenkollektive und somit bestenfalls multizentrische Untersuchungen notwendig.

### **4.3.2 Studienmodell**

Innerhalb dieser Arbeit wurden Immunzellpopulationen aus dem peripheren Blut der teilnehmenden Patienten zu einem Zeitpunkt analysiert und mit dem Ergebnis anderer Patienten verglichen. Es fand kein intraindividueller Vergleich statt, bspw. vor und unter ADT oder vor und unter Testosteronsubstitutionstherapie. Da sich Immunzellzahlen intraindividuell über die Zeit deutlich unterscheiden können, wäre es von Interesse zu sehen, wie sich unter der jeweiligen Therapie die Immunzellzahl verändert. Aufgrund von geringer einzuschließender Patientenzahl (bspw. neu diagnostizierter Prostatakarzinompatienten, die sodann antiandrogene Therapie erhalten sollen) und langer Studienteilnahme (bspw. viele Jahre ab Erstdiagnose eines lokal begrenzten Prostatakarzinoms unter Active Surveillance bis zur Entwicklung eines kastrationsresistenten Prostatakarzinoms) konnte ein solches Studiendesign nicht durchgeführt werden. Ergebnisse auf der Basis dieses Studienmodells wären jedoch weiterhin interessant. Da jedoch die Immunzellfärbungen am Tag der Blutentnahme durchgeführt werden müssen und die Proben nicht gesammelt werden können, um dann gemeinsam analysiert zu werden, ist dieses Studienmodell sehr aufwendig.

### **4.3.3 Testosteronbestimmung**

Für eine optimale Vergleichbarkeit sollte der Ablauf einer Studie von Patientenauswahl, Probengewinnung bis hin zur Probenanalyse standardisiert erfolgen. Hierunter fallen neben gleichen Abnahmebedingungen (wie Uhrzeit, Blutentnahmeset) auch die weitere Verarbeitung, Lagerung und Analyse der Proben. Die Abläufe hierzu sind in Kapitel 2.2.3 ausführlich beschrieben. In dieser Studie wurden Testosteronwerte aus dem Blutserum teilweise am Tag der Abnahme, teilweise erst im Verlauf nach einigen Monaten bestimmt und zuvor eingefroren bei -20 °C zwischengelagert. In zukünftigen Studien sollte dies einheitlich ablaufen. (Die Analyse erfolgte jedoch stets im Zentrallabor des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen.)

### **4.3.4 Treg-Detektion**

Wie in Kapitel 4.3.3 bereits angesprochen, ist auf eine optimale Vergleichbarkeit von Probenanalysen zu achten. Hierunter fällt auch eine einheitliche Gating-Strategie im Rahmen der Durchflusszytometrie. Auf eine einheitliche Durchführung wurde in dieser Studie geachtet, allerdings können kleine Änderungen im Gating bereits Auswirkungen auf die gezählten Zellzahlen und somit auf die gesamte Arbeit haben. So ist

insbesondere auf eine optimale Färbung zur möglichst genauen Detektion von sehr spezifischen, raren Zellpopulationen zu achten. In dieser Studie trifft dies auf Foxp3<sup>+</sup> Treg-Zellen zu. Wie in Kapitel 1.3.1.1 erläutert, ist der Transkriptionsfaktor Foxp3 nicht nur als Hauptregulator der Funktion von Tregs, sondern auch als deren Marker etabliert.<sup>41</sup> Jedoch sind nicht alle Foxp3<sup>+</sup> Zellen immunsuppressive regulatorische T-Zellen. Sie können auch T-Effektorzellen beinhalten und so kontaminiert sein.<sup>51</sup> In dieser Studie erfolgte die Detektion und das Gating anhand von intrazellulärer Foxp3-Expression kombiniert mit der Expression der Oberflächenproteine CD4 und CD25 (s. Kapitel 2.2.9). Kleinewietfeld et al. konnten 2009 eine negative Korrelation von Tregs mit den Oberflächenproteinen CD127 und CD49d aufzeigen, sodass durch Verwendung dieser eine Kontamination von Tregs durch Effektorzellen vermieden und eine höhere Reinheit der Treg-Population erreicht werden könnte.<sup>51</sup> In folgenden Studien sollten weitere Strategien zur bestmöglichen Detektion von Tregs kritisch überdacht und diese an den aktuellen Stand der Wissenschaft angepasst durchgeführt werden.

#### **4.4 Zukunftsblick**

Der medikamentöse Einsatz von Hormonen, bspw. von Geschlechtshormonen, bzw. der Eingriff in Hormonkaskaden zu therapeutischen Zwecken ist Alltag in der medizinischen Patientenversorgung. Im Falle des Hypogonadismus kann es die Testosteronsubstitution, im Falle des Prostatakarzinoms die ADT bedeuten. Dass Sexualhormone Einfluss auf Physiologie, Funktion, Wachstum und Tumorentstehung in Geschlechtsorganen und in anderen Organen, wie bspw. dem Gehirn, sowie auf Zellen des Immunsystems haben, gerät zunehmend in den Fokus der Forschung.

In dieser Studie ließ sich ein geringer bis mäßiger negativer Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Treg-Zellen in Abhängigkeit des Testosteronspiegels im Blutserum nachweisen. So könnte der medikamentöse Einsatz von Testosteron zur Beeinflussung von Tregs ein zukünftiger Therapieansatz in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen und Karzinomen darstellen.

Wie in Kapitel 4.2 dargelegt könnte dies insbesondere für die zukünftige Behandlung des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms einen neuen Therapieansatz darstellen. In der Regel impliziert dieses Tumorstadium diverse medikamentöse Vortherapien und gilt laut Leitlinie als nicht heilbar, sodass hier die Medizin an ihre Grenzen stößt. Könnte

man zukünftig in routinemäßigen Blutbildkontrollen anhand der Tregs-Anzahl bzw. der Tregs-Zahl im Zusammenhang mit dem Testosteronserumspiegel den aktuellen Stand der Karzinomprogression oder den Therapieerfolg der Krebstherapie besser einschätzen und auch beeinflussen, würde dies neue individualisierte Therapiewege eröffnen und besonders für das kastrationsresistente Prostatakarzinom von Bedeutung sein.

Es konnten direkte Wirkungen von ICI auf die Treg-Population nachgewiesen werden (s. Kapitel 4.2). Das Verständnis von der Entstehung und Funktion von Treg-Zellen, von molekularen Mechanismen und der Beeinflussung des Foxp3-Transkriptionsfaktors könnte somit einen durchbrechenden Einfluss auf die Entwicklung von Immuntherapien im Rahmen von Karzinom- wie auch Autoimmunerkrankungen haben. Klinische Studien, bspw. die in Kapitel 4.2 angesprochenen, derzeit noch laufenden KEYNOTE-Studien, könnten von einem fundierteren Grundlagenverständnis profitieren und ihr Aufbau im Vorfeld optimiert werden, um die Wirkung und den Ausgang dieser besser vorhersagen zu können.

Hierzu wäre ein Ausbau der Studie, wie in Kapitel 4.3.1 angesprochen, interessant: Multizentrische, langfristige Studien zum inter- und intraindividuellen Vergleich von Immunzellpopulationen (insbesondere von Tregs) von Patienten vor und nach einer ADT bzw. einer antiandrogenen Therapie im Falle von Prostatakarzinompatienten wie auch von Patienten vor und nach Testosteronsubstitution im Falle von hypogonadalen Patienten könnten wegweisende Erkenntnisse erzielen.

## 5 Zusammenfassung

Im Fokus der heutigen Forschung steht die Optimierung der existierenden Therapien von Autoimmun- und Krebserkrankungen. Hier spielt das körpereigene Immunsystem eine große Rolle, das durch Geschlechtshormone wie Testosteron beeinflusst wird.

Um in diesem Zusammenhang das Verständnis von Testosteron weiterzuentwickeln, wurde in dieser Arbeit das Vorkommen von verschiedenen Immunzellpopulationen, insbesondere von Tregs, bei männlichen Patienten mit Testosterondefizit untersucht. Eingeschlossen wurden Männer mit erniedrigtem Testosteronserumspiegel (Gruppe 1), Prostatakarzinompatienten in unterschiedlichen Tumorstadien unter ADT (Gruppen 2-4) und Kontrollgruppen mit Patienten mit normwertigen Testosteronserumwerten (Gruppe 5) bzw. Prostatakarzinompatienten ohne ADT (Gruppe 6). *Ex vivo* wurde anhand des Blutserums von insgesamt 63 Patienten das Vorkommen von Leukozyten, verschiedenen T-Zellpopulationen, mit besonderem Augenmerk auf CD4+CD25+Foxp3+ Treg-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten und Nicht-Monozyten wie auch eosinophile und neutrophile Granulozyten untersucht. Dies erfolgte zum einen im Vergleich zwischen den Patientengruppen, zum anderen in Korrelation mit dem Testosteronserumspiegel.

Es konnte ein geringer bis mäßiger negativer Zusammenhang zwischen dem Testosteronspiegel und der Treg-Anzahl nachgewiesen werden. Tregs fanden sich in den Kontrollgruppen auffallend weniger als in den Untersuchungsgruppen mit Testosterondefizit. Es manifestierten sich insbesondere in der Gruppe der Patienten mit einem kastrationsresistenten Prostatakarzinom deutliche Unterschiede im Zellaufkommen im Vergleich zu allen anderen Gruppen: CD8+ T-Zellen, Eosinophile, Neutrophile und Monozyten zeigten hier ein erhöhtes Vorkommen.

Multizentrische Studien mit hohen Patientenzahlen und langfristigen Studienverläufen inklusive der Beobachtung von Immunzell- und Hormonverläufen könnten bahnbrechende Informationen für die Entwicklung von Krebs- und Autoimmuntherapien hervorbringen. Der medikamentöse Einsatz von Testosteron könnte der nächste Schritt in der Optimierung individualisierter Immuntherapien zur Behandlung von Karzinom- und Autoimmunerkrankungen sein.

## 6 Summary

Today's research focuses on optimising existing therapies for autoimmune and cancer diseases. Here, the body's immune system plays a major role, which is influenced by sex hormones such as testosterone.

In order to further develop the understanding of testosterone in this context, this work investigated the occurrence of different immune cell populations, especially Tregs, in male patients with testosterone deficiency. Men with low testosterone levels (group 1), prostate cancer patients at different tumour stages on androgen deprivation therapy (ADT) (groups 2-4), and control groups with patients with normal testosterone serum levels (group 5) and prostate cancer patients without ADT (group 6) were included. *Ex vivo*, the blood serum of a total of 63 patients was used to investigate the occurrence of leukocytes, various T cell populations, with special emphasis on CD4+CD25+Foxp3+ Treg cells, B cells, NK cells, monocytes and non-monocytes as well as eosinophilic and neutrophilic granulocytes - on the one hand in comparison between the patient groups, on the other hand in correlation with the testosterone serum level.

A small to moderate negative correlation between testosterone level and Treg count could be demonstrated. There were remarkably fewer Tregs in the control groups than in the testosterone-deficient groups. Especially in the group of patients with castration-resistant prostate carcinoma, there were clear differences in cell occurrence compared to all other groups: CD8+ T cells, eosinophils, neutrophils and monocytes showed an increased occurrence here.

Multi-centre studies with high patient numbers and long-term study courses including the observation of immune cell and hormone courses could provide pioneering information for the development of cancer and autoimmune therapies. The medicinal use of testosterone could be the next step in the optimisation of individualised immunotherapies for the treatment of carcinoma and autoimmune diseases.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
AZF	Azoospermiefaktor
ADT	Androgendeprivationstherapie, englisch: androgen deprivation therapy
B	Faktor der Bürker-Zählkammer
B-Zellen	B-Lymphozyten
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation, deutsch: Unterscheidungsgruppen
Treg(s)	regulatorische T-Zelle(n), auch: Treg-Zelle(n), in dieser Arbeit definiert als CD4+CD25+Foxp3+ regulatorische T-Zelle(n)
CPSS	Chronic Pelvic Pain Syndrome, deutsch: Chronisches Beckenschmerzsyndrom
CT	Computertomografie
cTNM	„c“ von englisch „clinical“, deutsch: klinische Tumor-Nodus-Metastasen-Klassifikation
DHT	Dihydrotestosteron
DRU	Digital-rektale Untersuchung
EAO	Experimentelle Autoimmunorchitis
EAU	European Association of Urology
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FcR	Fc-Rezeptor
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
Foxp3	Forkhead Box Protein 3
FSC	Forward Scatter, deutsch: Vorwärtsstreulicht
g	Erdbeschleunigung $g = 9,81 \text{ m/s}^2$
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
Gy	Gray
HDR	High Dose Rate, deutsch: hohe Dosisleistung
HIFU	HochIntensiver Fokussierter Ultraschall
ICI	Immun-Checkpoint-Inhibitoren
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPP	Induratio Penis Plastica
LDR	Low Dose Rate, deutsch: niedrige Dosisleistung
LH	Luteinisierendes Hormon
LHRH	Luteinisierendes Hormon Releasing-Hormon
LUTS	Lower Urinary Tract Symptoms, deutsch: Symptome des unteren Harntrakts
M	Mittelwert
MACS	Magnetic Cell Separation, deutsch: magnetische Zellseparation
MDSC	Myeloid-Derived Suppressor Cell(s), deutsch: myeloide

	Suppressorzelle(n)
MHC	Major Histocompatibility Complex, deutsch: Haupthistokompatibilitätskomplex
mM	Millimol
MRT	Magnetresonanztomografie
N	Zellzahl
N	Zellzahl pro Milliliter
n	Patientenzahl
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NKT-Zellen	Natürliche Killer-T-Zellen
p	Wahrscheinlichkeit
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell(s), deutsch: mononukleare Zelle(n) des peripheren Blutes
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, deutsch: Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1
PDL-1	Programmed Death-Ligand 1
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll
PSA	Prostata Spezifisches Antigen
PSMA-	Prostata-Spezifisches-Membran-Antigen-
PET/CT	Positronenemissionstomographie/Computertomografie
pTNM	„p“ von englisch „pathological“, deutsch: pathologische Tumor-Nodus-Metastasen-Klassifikation
$r_s$	Korrelationskoeffizient
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler (englisch: Standard Error of the Mean)
SHBG	Sexualhormon-bindendes-Globulin
SSC	Side Scatter, deutsch: Seitwärtsstreulicht
T-Zellen	T-Lymphozyten
TESE	Testikuläre Spermienextraktion
TGF	Transforming Growth Factor, deutsch: transformierender Wachstumsfaktor
TH	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	Tumor-Nodus-Metastasen-Klassifikation
TRUS	Transrektaler Ultraschall
TUR-P	Transurethrale Prostataresektion
UICC	Union Internationale Contre le Cancer, deutsch: Internationale Vereinigung gegen Krebs
V	Verdünnungsfaktor
Z. n.	Zustand nach

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1<sup>17</sup>: Überblick über die Abstammung von Immunzellen, Erythrozyten und Thrombozyten. Quelle: Deutsche Gesellschaft für Immunologie e.V. <http://das-immunsystem.de/fuer-jedermann/unser-immunsystem/die-menschlichen-immunzellen>. Accessed October 13, 2017. Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Agnes Giniewski.

Abbildung 2: Medikamentöse Therapieansätze zur Unterdrückung der Testosteronsynthese (mittels LHRH-Agonisten/ Antagonisten) bzw. der Testosteronwirkung (mittels Antiandrogenen)

Abbildung 3: Isolation von PBMC aus humanem Blut

Abbildung 4<sup>30</sup>: Funktionsprinzip des Durchflusszytometers. Quelle: Gienger JC. Schemazeichnung zur Funktionsweise eines optischen Durchflusszytometers. <https://www.ptb.de/cms/ptb/fachabteilungen/abt8/fb-84/ag-841/flowzytometrie-841.html>. Accessed August 08, 2021. Ursprüngliche Abbildung: Schematic of an optical flowcytometer, aus der Dissertation "Determination of optical and geometrical properties of blood cells and microparticle from light scattering measurements", Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB), PTB Bericht, Wissenschaftliche Veröffentlichungen, OPT-85, 2019, S. 114, Figure 6.1. doi:10.7795/110.20190913. Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Jonas Constantin Gienger und Prof. Dr. Markus Bär.

Abbildung 5: Patientenalter im Gruppenvergleich in Jahren

Abbildung 6: Testosteronspiegel im Gruppenvergleich in ng/dl

Abbildung 7: Gating-Schritte der Immunophänotypisierungsfärbung

Abbildung 8: Gating-Schritte der Treg-Färbung

Abbildung 9: Prozentualer Anteil von Leukozyten in PBMC im Gruppenvergleich

Abbildung 10: Prozentualer Anteil von Leukozyten in PBMC im Zusammenhang mit dem Testosteronspiegel

Abbildung 11: Prozentualer Anteil von T-Zellen in Leukozyten im Gruppenvergleich

Abbildung 12: Prozentualer Anteil von T-Zellen in Leukozyten im Zusammenhang mit dem Testosteronspiegel

Abbildung 13: Prozentualer Anteil von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Leukozyten (A) und in der T-Zellpopulation (B) im Gruppenvergleich

Abbildung 14: Prozentualer Anteil von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Leukozyten (A) und in der T-Zellpopulation (B) im Zusammenhang mit dem Testosteronspiegel

Abbildung 15: Prozentualer Anteil von CD8+ T-Zellen in Leukozyten (A) bzw. in der T-Zellpopulation (B) im Gruppenvergleich

Abbildung 16: Prozentualer Anteil von CD8+ T-Zellen in Leukozyten (A) bzw. in der T-Zellpopulation (B) im Zusammenhang mit dem Testosteronspiegel

Abbildung 17: Vorkommen von CD4+ T-Zellen in Leukozyten im Verhältnis zum Vorkommen von CD8+ T-Zellen in Leukozyten im Gruppenvergleich

Abbildung 18: Auftreten von CD4+ T-Zellen im Verhältnis zum Auftreten von CD8+ T-Zellen in Leukozyten im Zusammenhang mit dem Testosteronspiegel

Abbildung 19: Prozentualer Anteil von B-Zellen in Leukozyten im Gruppenvergleich

Abbildung 20: Prozentualer Anteil von B-Zellen in Leukozyten im Zusammenhang mit dem Testosteronspiegel

Abbildung 21: Prozentualer Anteil von Monozyten (A) und Nicht-Monozyten (B) in Leukozyten im Gruppenvergleich

Abbildung 22: Prozentualer Anteil von Monozyten (A) und Nicht-Monozyten (B) in Leukozyten im Zusammenhang mit dem Testosteronspiegel

Abbildung 24: Prozentualer Anteil von Eosinophilen (A) und Neutrophilen (B) in Leukozyten im Zusammenhang mit dem Testosteronspiegel

Abbildung 25: Prozentualer Anteil von NKT-Zellen (A) und NK-Zellen (B) in Leukozyten im Gruppenvergleich

Abbildung 26: Prozentualer Anteil von NKT-Zellen (A) und NK-Zellen (B) in Leukozyten im Zusammenhang mit dem Testosteronspiegel

Abbildung 27: Prozentualer Anteil von Tregs in PBMC (A) bzw. in CD4+CD25+ Zellen (B) im Gruppenvergleich

Abbildung 28: Prozentualer Anteil von Tregs in PBMC (A) bzw. in der CD4+CD25+ Zellpopulation (B) im Zusammenhang mit dem Testosteronspiegel

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: T-Stadium

Tabelle 2: N-Stadium

Tabelle 3: M-Stadium

Tabelle 4: Symptome des Androgenmangels und des Late-onset-Hypogonadismus

Tabelle 5: Verwendete Antikörper für die Immunophänotypisierungsfärbung

Tabelle 6: Protokoll Immunophänotypisierungsfärbung

Tabelle 7: Verwendete Antikörper für die Treg-Färbung

Tabelle 8: Protokoll Oberflächenfärbung Tregs

Tabelle 9: Protokoll Intrazelluläre Färbung Tregs

Tabelle 10: Einteilung des Signifikanzniveaus

Tabelle 11: Interpretation des Korrelationskoeffizienten  $r_s$

Tabelle 12: Übersicht der Patientengruppen 1-6

Tabelle 13: Patientengruppe 1

Tabelle 14: Patientengruppe 2

Tabelle 15: Patientengruppe 3

Tabelle 16: Patientengruppe 4

Tabelle 17: Patientengruppe 5

Tabelle 18: Patientengruppe 6

Tabelle 19: Gruppenübersicht zu Patientenzahl, Alter und Testosteronwert der 6 Patientengruppen

Tabelle 20: Gruppenvergleich des Patientenalters

Tabelle 21: Gruppenvergleich des Testosteronspiegels

Tabelle 22: Deskriptive Statistik zum Vorkommen von Leukozyten in PBMC

Tabelle 23: Gruppenvergleich zum Auftreten von Leukozyten in PBMC

Tabelle 24: Deskriptive Statistik zum Vorkommen von T-Zellen in Leukozyten

Tabelle 25: Gruppenvergleich zum Auftreten von T-Zellen in Leukozyten

Tabelle 26: Deskriptive Statistik zu CD4+ T-Zellen in Leukozyten

Tabelle 27: Deskriptive Statistik zu CD4+ T-Zellen in der T-Zellpopulation

Tabelle 28: Gruppenvergleich zum Auftreten von CD4+ T-Zellen in Leukozyten

Tabelle 29: Gruppenvergleich zum Auftreten von CD4+ T-Zellen in der T-Zellpopulation

Tabelle 30: Deskriptive Statistik zum Vorkommen von CD8+ T-Zellen in Leukozyten

Tabelle 31: Deskriptive Statistik zum Vorkommen von CD8+ T-Zellen in der T-Zellpopulation

Tabelle 32: Gruppenvergleich zum Auftreten von CD8+ T-Zellen in Leukozyten

Tabelle 33: Gruppenvergleich zum Auftreten von CD8+ T-Zellen in der T-Zellpopulation

Tabelle 34: Deskriptive Statistik zum Vorkommen von CD4+ T-Zellen im Verhältnis zum Vorkommen von CD8+ T-Zellen in Leukozyten

Tabelle 35: Gruppenvergleich zum Auftreten von CD4+ T-Zellen im Verhältnis zu CD8+ T-Zellen in Leukozyten

Tabelle 36: Deskriptive Statistik zum Vorkommen von B-Zellen in Leukozyten

Tabelle 37: Gruppenvergleich zum Auftreten von B-Zellen in Leukozyten

Tabelle 38: Deskriptive Statistik zum Vorkommen von Monozyten in Leukozyten

Tabelle 39: Deskriptive Statistik zum Vorkommen von Nicht-Monozyten in Leukozyten

Tabelle 40: Gruppenvergleich zum Auftreten von Monozyten in Leukozyten

Tabelle 41: Gruppenvergleich zum Auftreten von Nicht-Monozyten in Leukozyten

Tabelle 42: Deskriptive Statistik zum Vorkommen von Eosinophilen in Leukozyten

Tabelle 43: Deskriptive Statistik zum Vorkommen von Neutrophilen in Leukozyten

Tabelle 44: Gruppenvergleich zum Auftreten von Eosinophilen in Leukozyten

Tabelle 45: Gruppenvergleich zum Auftreten von Neutrophilen in Leukozyten

Tabelle 46: Deskriptive Statistik zum Vorkommen von NKT-Zellen in Leukozyten

Tabelle 47: Deskriptive Statistik zum Vorkommen von NK-Zellen in Leukozyten

Tabelle 48: Gruppenvergleich zum Auftreten von NKT-Zellen in Leukozyten

Tabelle 49: Gruppenvergleich zum Auftreten von NK-Zellen in Leukozyten

Tabelle 50: Deskriptive Statistik zum Vorkommen von Tregs in PBMC

Tabelle 51: Deskriptive Statistik zum Vorkommen von Tregs in CD4+CD25+ Zellen

Tabelle 52: Gruppenvergleich zum Auftreten von Tregs in PBMC

Tabelle 53: Gruppenvergleich zum Auftreten von Tregs in CD4+CD25+ Zellen

## 10 Literaturverzeichnis

1. Aksoylar HI, Boussiotis VA. PD-1+ Treg cells: a foe in cancer immunotherapy? *Nat Immunol.* 2020;21:1311-1312. doi:10.1038/s41590-020-0801-7.
2. Antonarakis ES, Piulats JM, Gross-goupil M, Goh J. Pembrolizumab for Treatment-Refractory Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Multicohort, Open-Label Phase IIKEYNOTE-199 Study. *J Clin Oncol.* 2019;38(5):395-405.
3. Aragon-Ching, JB. Impact of androgen-deprivation therapy on the immune system: implications for combination therapy of prostate cancer. *Front Biosci.* 2007;12(12):4957. doi:10.2741/2441.
4. Bebo BF Jr, Zelinka-Vincent E, Adamus G, Amundson D, Vandembark AA OH. Gonadal hormones influence the immune response to PLP 139–151 and the clinical course of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroimmunol.* 1998;84:122-130.
5. Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol.* 2005;6(4):353-360. doi:10.1038/ni1181.
6. Beyer M, Schultze JL. Regulatory T cells in cancer. *Blood.* 2006;108(804-811).
7. Bizzarro A, Valentini G, Di Martino A, Daponte A, De Bellis D, Iacono G. Influence of Testosterone Therapy on Clinical and Immunological Features of Autoimmune Diseases Associated with Klinefelter's Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987;64(1):32-36.
8. Bosland MC. The Role of Steroid Hormones in Prostate Carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2000;No. 27:39-66.
9. Cao X, Cai SF, Fehniger TA, et al. Granzyme B and Perforin Are Important for Regulatory T Cell-Mediated Suppression of Tumor Clearance. *Immunity.* 2007;27(4):635-646. doi:10.1016/j.immuni.2007.08.014.
10. Chen X, Oppenheim JJ. Th17 cells and Tregs: unlikely allies. *J Leukoc Biol.* 2014;95(5):723-731. doi:10.1189/jlb.1213633.
11. Chen Y, Sawyers CL, Scher HI. Targeting the androgen receptor pathway in prostate cancer. *Curr Opin Pharmacol.* 2008;8(4):440-448.

doi:10.1016/j.coph.2008.07.005.

12. Chrysohoou C, Panagiotakos D, Pitsavos C, et al. Low total testosterone levels are associated with the metabolic syndrome in elderly men: The role of body weight, lip-ids, insulin resistance, and inflammation; the Ikaria study. *Rev Diabet Stud.* 2013;10(1):27-38. doi:10.1900/RDS.2013.10.27.
13. Corona G, Baldi E, Maggi M. Androgen regulation of prostate cancer: Where are we now? *J Endocrinol Invest.* 2011;34(3):232-243.
14. Cutolo M, Balleari E, Giusti M, Intra E, Accardo S. Androgen Replacement Therapy in Male Patients with Rheumatoid Arthritis. *Off J Amercian Coll Rheumatol.* 1991;34(1):1-5.
15. D'Agostino P, Milano S, Barbera C, et al. Sex hormones modulate inflammatory mediators produced by macrophages. *Ann NY Acad Sci.* 1999;876:426-429.
16. Danke NA, Koelle DM, Yee C, Beheray S, Kwok WW. Autoreactive T Cells in Healthy Individuals. *J Immunol.* 2004;172(10):5967-5972. doi:10.4049/jimmunol.172.10.5967.
17. Deutsche Gesellschaft für Immunologie e.V. Immunologie für Jedermann. <http://das-immunsystem.de/fuer-jedermann/unser-immunsystem/die-menschlichen-immunzellen>. Accessed October 13, 2017. Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Agnes Giniewski.
18. Dohle GR, Arver S, Bettocchi C, Kliesch S, Punab M, de Ronde W. Leitlinie Männlicher Hypogonadismus. *Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinol.* 2013;10 (5-6):279-292.
19. Drake CG, Doody ADH, Mihalyo MA, et al. Androgen ablation mitigates tolerance to a prostate/prostate cancer-restricted antigen. *Cancer Cell.* 2005;7(3):239-249. doi:10.1016/j.ccr.2005.01.027.
20. Effert P, Heidenreich A. *Auf Einen Blick, Diagnose Und Behandlungspfade Des Prostatakarzinoms, 3. Auflage.*; 2018.
21. Elizabeth J Akins, Miranda L Moore, Shuai Tang, Mark C Willingham, Janet A Tooze PD. In situ vaccination combined with androgen ablation and regulatory T-cell depletion reduces castration-resistant tumor burden in prostate-specific pten knockout mice. *Cancer Res.* 2010;70(9):3473-3482. doi:10.1158/0008-

- 5472.CAN-09-2490.
22. European Association of Urology. EAU Guidelines. Edn. presented at the EAU Annual Congress Milan 2021. ISBN 978-94-92671-13-4.
  23. Evelyn Derhovanessian, Victoria Adams, Karin Hähnel, Andrea Groeger, Hardev Pandha, Stephen Ward GP. Pretreatment frequency of circulating IL-17+ CD4+ T-cells, but not Tregs, correlates with clinical response to whole-cell vaccination in prostate cancer patients. *Int J Cancer*. 2009;125:1372-1379.
  24. Fijak M, Damm L-J, Wenzel J-P, et al. Influence of Testosterone on Inflammatory Response in Testicular Cells and Expression of Transcription Factor Foxp3 in T Cells. *Am J Reprod Immunol*. 2015;74(1):12-25. doi:10.1111/aji.12363.
  25. Fijak M, Schneider E, Klug J, et al. Testosterone Replacement Effectively Inhibits the Development of Experimental Autoimmune Orchitis in Rats: Evidence for a Direct Role of Testosterone on Regulatory T Cell Expansion. *Journal of Immunol*. 2011;186(9):5162-5172. doi:10.4049/jimmunol.1001958.
  26. Fitzpatrick F, Lepault F, Homo-Delarche F, Bach JF DM. Influence of castration, alone or combined with thymectomy, on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Endocrinology*. 1991;129(3):1382-1390.
  27. Flammiger A, Weisbach L, Huland H, et al. High tissue density of FOXP3+ T cells is associated with clinical outcome in prostate cancer. *Eur J Cancer*. 2013;49:1273-1279. doi:10.1016/j.ejca.2012.11.035.
  28. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4(4):330-336. doi:10.1038/ni904.
  29. Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med*. 2009;206(13):3015-3029. doi:10.1084/jem.20090847.
  30. Gienger JC. Schemazeichnung zur Funktionsweise eines optischen Durchflusszytometers. <https://www.ptb.de/cms/ptb/fachabteilungen/abt8/fb-84/ag-841/flowzytometrie-841.html>. Accessed August 08, 2021. Ursprüngliche Abbildung: Schematic of an optical flowcytometer, aus der Dissertation

- "Determination of optical and geometrical properties of blood cells and microparticle from light scattering measurements", Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB), PTB Bericht, Wissenschaftliche Veröffentlichungen, OPT-85, 2019, S. 114, Figure 6.1. doi:10.7795/110.20190913. Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Jonas Constantin Gienger und Prof. Dr. Markus Bär.
31. Gleason DF, Mellinger GT. Prediction of Prognosis for Prostatic Adenocarcinoma by Combined Histological Grading and Clinical Staging. *Journal of Urology*. 1974;111:58-64.
  32. Goktas S, Ziada A, Crawford ED. Combined androgen blockade for advanced prostatic carcinoma. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 1999;2(4):172-179. doi:10.1038/sj.pcan.4500323.
  33. Gold SM, Voskuhl RR. Estrogen and Testosterone Therapies in Multiple Sclerosis. *Prog Brain Res*. 2009;175:239-251. doi:10.1016/S0079-6123(09)17516-7.
  34. Gordetsky J, Epstein J. Grading of prostatic adenocarcinoma: Current state and prognostic implications. *Diagn Pathol*. 2016;11(25)(1):2-9. doi:10.1186/s13000-016-0478-2.
  35. Gregg R, Smith C, Clark F, Dunnion D, Khan N, Chakraverty R, Nayak L, Moss P. The number of human peripheral blood CD4+ CD25high regulatory T cells increases with age. *Clin Exp Immunol*. 2005;140(540-546).
  36. Gronberg H. Prostate Cancer Epidemiology. *Lancet*. 2003;361:859-864.
  37. Haider A, Kurtz W, Giltay EJ, Gooren LJ SF. Administration of testosterone to elderly hypogonadal men with Crohn's disease improves their Crohn's Disease Activity Index: a pilot study. *Horm Mol Biol Clin Invest*. 2010;2(3):287-292.
  38. Haverkamp J, Charbonneau B, Ratliff TL. Prostate inflammation and its potential impact on prostate cancer: A current review. *J Cell Biochem*. 2008;103(5):1344-1353. doi:10.1002/jcb.21536.
  39. Hayashi T, Fujita K, Nojima S, et al. Peripheral blood monocyte count reflecting tumor-infiltrating macrophages is a predictive factor of adverse pathology in radical prostatectomy specimens. *Prostate*. 2017;77(14):1383-1388. doi:10.1002/pros.23398.

40. Hoechst B, Gamrekelashvili J, Manns MP, Greten TF; Korangy F. Plasticity of human Th17 cells and iTregs is orchestrated by different subsets of myeloid cells. *Blood*. 2011;117:6532-6541.
41. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science* (80- ). 2003;299(5609):1057-1061. doi:10.1126/science.1079490.
42. Horn F. *Biochemie Des Menschen, Das Lehrbuch Für Das Medizinstudium, 4., Aktualisierte Und Erweiterte Auflage*. Thieme Verlag KG Stuttgart; 2009.
43. Huggins C, Hodges CV. Studies on Prostatic Cancer I. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate. *Cancer Res*. 1941;1:293-297.
44. Idorn M, Køllgaard T, Kongsted P, Sengeløv L, Thor SP. Correlation between frequencies of blood monocytic myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and negative prognostic markers in patients with castration-resistant metastatic prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2014;63(11):1177-1187. doi:10.1007/s00262-014-1591-2.
45. Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Langversion 4.0, 2016. *Leitlinienprogr Onkol (Deutsche Krebsgesellschaft, Dtsch Krebshilfe, AWMF) Konsult AWMF Regist 043/022OL*. 2016;(043):1-352.
46. Kaufman JM, Vermeulen A. The decline of androgen levels in elderly men and its clinical and therapeutic implications. *Endocr Rev*. 2005;26(6):833-876. doi:10.1210/er.2004-0013.
47. Kelle ET, Chang C, Ershler WB. Inhibition of NFKappaB Activity through Maintenance of IKappaB Levels Contributes to Dihydrotestosterone-mediated Repression of the Interleukin-6 Promoter. *J Biol Chem*. 1996;271(42):26267-26275.
48. Klein SL. Immune cells have sex and so should journal articles. *Endocrinology*. 2012;153(6):2544-2550. doi:10.1210/en.2011-2120.
49. Klein SL. The effects of hormones on sex differences in infection: From genes to behavior. *Neurosci Biobehav Rev*. 2000;24(6):627-638. doi:10.1016/S0149-

7634(00)00027-0.

50. Klein SL, Jedlicka A, Pekosz A. The Xs and Y of immune responses to viral vaccines. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(5):338-349. doi:10.1016/S1473-3099(10)70049-9.
51. Kleinewietfeld M, Starke M, Di Mitri D, et al. CD49d provides access to “untouched” human Foxp3+ Treg free of contaminating effector cells. *Blood.* 2009;113(4):827-836. doi:10.1182/blood-2008-04-150524.
52. Knudsen KE, Penning T. Partners in crime: deregulation of AR activity and androgensynthesis in prostate cancer. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(5):315-324. doi:doi:10.1016/j.tem.2010.01.002.
53. Knudsen KE, Scher HI. Starving the addiction: New opportunities for durable suppression of AR signaling in prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(15):4792-4798. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2660.
54. Krebs in Deutschland für 2015/2016. *Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der Epidemiol Krebsregister Deutschl eV (Hrsg) Berlin, 2019.* 2019;12:98-101.
55. Kryczek I, Wei S, Zou L, et al. Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. *J Immunol.* 2007;178(11):6730-6733. doi:178/11/6730.
56. Kursar M, Bonhagen K, Fensterle J, et al. Regulatory CD4+CD25+ T cells restrict memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med.* 2002;196(12):1585-1592. doi:10.1084/jem.20011347.
57. Lee JH, Ulrich B, Cho J, Park J, Kim CH. Progesterone Promotes Differentiation of Human Cord Blood Fetal T Cells into T Regulatory Cells but Suppresses Their Differentiation into Th17 Cells. *J Immunol.* 2011;187(4):1778-1787. doi:10.4049/jimmunol.1003919.
58. van Leeuwen PJ, Emmett L, Ho B, et al. Prospective evaluation of 68Gallium-prostate-specific membrane antigen positron emission tomography/computed tomography for preoperative lymph node staging in prostate cancer. *BJU Int.* 2017;119(2):209-215. doi:10.1111/bju.13540.
59. Li W, Katoh H, Wang L, et al. FOXP3 regulates sensitivity of cancer cells to irradiation by transcriptional repression of BRCA1. *Cancer Res.*

- 2013;73(7):2170-2180. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2481.
60. Liva SM, Voskuhl RR. Testosterone Acts Directly on CD4+ T-Lymphocytes to Increase IL-10 Production. *J Immunol.* 2001;167(4):2060-2067. doi:10.4049/jimmunol.167.4.2060.
  61. Longobardi GA. *Flow Cytometry: First Principles. Second Edition.* Wiley-Liss, Inc.; 2001.
  62. Lüllmann-Rauch R. *Taschenlehrbuch Histologie, 3. Vollständig Überarbeitete Auflage.* Thieme Verlag KG Stuttgart; 2009.
  63. Mak TW, Saunders ME. *The Immune Response: Basic and Clinical Principles.* Elsevier Science; 2006.
  64. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(4):256-269. doi:10.1038/nrc2090.
  65. Mercader M, Bodner BK, Moser MT, et al. T cell infiltration of the prostate induced by androgen withdrawal in patients with prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci.* 2001;98(25):14565-14570. doi:10.1073/pnas.251140998.
  66. Nguyen DP, Li J, Tewari AK. Inflammation and prostate cancer: The role of interleukin 6 (IL-6). *BJU Int.* 2014;113(6):986-992. doi:10.1111/bju.12452.
  67. Nie J, Li YY, Zheng SG, Tsun A, Li B. FOXP3+ Treg cells and gender bias in autoimmune diseases. *Front Immunol.* 2015;6(SEP):493. doi:10.3389/fimmu.2015.00493.
  68. Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S. *Andrologie - Grundlagen Und Klinik Der Reproduktiven Gesundheit Des Mannes, 3. Auflage.;* 2009.
  69. Nishikawa H, Jäger E, Ritter G, Old LJ, Gnjjatic S. CD4+ CD25+ regulatory T cells control the induction of antigen-specific CD4+ helper T cell responses in cancer patients. *Blood.* 2005;106(3):1008-1011. doi:10.1182/blood-2005-02-0607.
  70. Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer.* 2010;127(4):759-767. doi:10.1002/ijc.25429.
  71. Oertelt-Prigione S. The influence of sex and gender on the immune response. *Autoimmun Rev.* 2011;11:479-485.

72. Ohue Y, Nishikawa H. Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? *Cancer Sci.* 2019;110(7):2080-2089. doi:10.1111/cas.14069.
73. Olsen NJ, Kovacs WJ. Case Report: Testosterone Treatment of Systemic Lupus Erythematosus in a Patient with Klinefelter's Syndrome. *Am J Med Sci.* 1995;310(4):158-160.
74. Pal SK, Moreira D, Won H, et al. Reduced T-cell numbers and Elevated Levels of Immunomodulatory Cytokines in Metastatic Prostate Cancer Patients De Novo Resistant to Abiraterone and/or Enzalutamide therapy. *Int J Mol Sci.* 2019;20:1-12. doi:10.3390/ijms20081831.
75. Pellerin L, Jenks JA, Bégin P, Bacchetta R, Nadeau KC. Regulatory T cells and their roles in immune dysregulation and allergy. *Immunol Res.* 2014;58(2-3):358-368. doi:10.1007/s12026-014-8512-5.
76. Pitteloud N, Durrani S, Raivio T, et al. Complex Genetics in Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism. *Front Horm Res.* 2010;39:142-153.
77. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. *Duale Reihe Biochemie, 2. Aktualisierte Auflage.* Thieme Verlag KG Stuttgart; 2008.
78. Raynaud J-P. Prostate Cancer Risk in Testosterone-Treated Men. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006;102:261-266.
79. Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell.* 2000;101(5):455-458. doi:10.1016/S0092-8674(00)80856-9.
80. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell.* 2008;133(5):775-787. doi:10.1016/j.cell.2008.05.009.
81. Schmelz H-U, Sparwasser C, Weidner W. *Facharztwissen Urologie, 3. Auflage;* 2014.
82. Sfanos K, De Marzo A. Prostate cancer and inflammation: the evidence. *Histopathology.* 2012;60(1):199-217. doi:10.1111/j.1365-2559.2011.04033.x.
83. Shakespeare TP. Effect of prostate-specific membrane antigen positron emission tomography on the decision-making of radiation oncologists. *Radiat Oncol.* 2015;10(1):8-11. doi:10.1186/s13014-015-0548-8.

84. Shapiro HM. *Practical Flow Cytometry, Fourth Edition.*; 2003.
85. Shigeta K, Kosaka T, Kitano S, et al. High Absolute Monocyte Count Predicts Poor Clinical Outcome in Patients with Castration-Resistant Prostate Cancer Treated with Docetaxel Chemotherapy. *Ann Surg Oncol.* 2016;23(12):4115-4122. doi:10.1245/s10434-016-5354-5.
86. Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol.* 1999;163(10):5211-5218. doi:ji\_v163n10p5211.
87. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours. 7th Edition.* International Union Against Cancer. Wiley-Blackwell.; 2009.
88. Tai P, Wang J, Jin H, et al. Induction of Regulatory T cells by Physiological Level Estrogen. *J Cell Physiol.* 2008;214(2):456-464. doi:10.1002/jcp.21221.
89. Tang S, Dubey P. Opposing effects of androgen ablation on immune function in prostate cancer. *Oncoimmunology.* 2012;1(7):1220-1221. doi:10.4161/onci.20448.
90. Tang S, Moore ML, Grayson JM, Dubey P. Increased CD8+ T-cell Function following Castration and Immunization Is Countered by Parallel Expansion of Regulatory T cells. *Cancer Res.* 2012;72(8):1975-1985. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2499.
91. Taplin ME. Drug Insight: Role of the androgen receptor in the development and progression of prostate cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 2007;4(4):236-244. doi:10.1038/ncponc0765.
92. Toka FN, Suvas S, Rouse BT. CD4+ CD25+ T Cells Regulate Vaccine-Generated Primary and Memory CD8 + T-Cell Responses against Herpes Simplex Virus Type 1. *J Virol.* 2004;78(23):13082-13089. doi:10.1128/jvi.78.23.13082-13089.2004.
93. Toor SM, Syed Khaja AS, Alkurd I, Elkord E. In-vitro effect of pembrolizumab on different T regulatory cell subsets. *Clin Exp Immunol.* 2018;191(2):189-197. doi:10.1111/cei.13060.
94. Walecki M, Eisel F, Klug J, et al. Androgen receptor modulates Foxp3

expression in CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T-cells. *Mol Biol Cell*. Published online 2015. doi:10.1091/mbc.E14-08-1323.

95. Yirga A, Oyekunle T, Howard LE, et al. Monocyte counts and prostate cancer outcomes in white and black men: results from the SEARCH database. *Cancer Causes Control*. 2021;32(2):189-197. doi:10.1007/s10552-020-01373-2.
96. Yuan X, Balk SP. Mechanisms Mediating Androgen Receptor Reactivation After Castration. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2009;27(1):36-41. doi:10.1016/j.urolonc.2008.03.021.

# 11 Anhang

## 11.1 Fragebogen

### Fragebogen zum Forschungsvorhaben

#### „Einfluss von Testosteron auf Zellen der körpereigenen Abwehr“

1. Haben Sie schon einmal eine **Chemotherapie** bekommen?

Nein

Ja

Wenn ja: Wann zuletzt und weshalb?

2. Haben Sie schon einmal eine **Bestrahlung** bekommen?

Nein

Ja

Wenn ja: Wann zuletzt und weshalb?

3. Sind Sie **Dialyse**-Patient?

Nein

Ja

Wenn ja: Wann war Ihre letzte Dialyse?

4. Leiden Sie derzeit unter einer **Infektion mit Fieber**?

Nein

Ja

5. Nehmen Sie eines dieser **Medikamente** ein (als Tablette, Spritze, ...)?

Zutreffendes bitte ankreuzen.

Testosteron

Trenantone<sup>®</sup>, Enantone<sup>®</sup>, Sixantone<sup>®</sup> oder Lucrin<sup>®</sup>

Abirateronacetat (Zytiga<sup>®</sup>)

Bicalutamid (Casodex<sup>®</sup>)

Cyproteronacetat (Androcur<sup>®</sup>)

Flutamid (Flucinom<sup>®</sup>)

Enzalutamid (Xtandi<sup>®</sup>)

Nilutamid

Ein anderes Medikament, das Ihres Wissens nach in den Testosteronhaushalt eingreift:

**Bitte notieren Sie daneben das ungefähre Datum der letzten Einnahme bzw. Spritze des oben angekreuzten Medikaments/ der oben angekreuzten Medikamente.**

## 11.2 Aufklärungsbogen und Einwilligungserklärung

### **Einfluss von Testosteron auf Zellen der körpereigenen Abwehr**

#### **Aufklärungsbogen und Einwilligungserklärung**

**Vollständige Bezeichnung des Forschungsvorhabens:**

**Einfluss von Androgenen auf die Differenzierung von regulatorischen T-Zellen – Implikationen bei klinisch indizierten Manipulationen des Testosteronhaushaltes bei Männern sowie bei Patienten mit Prostatakarzinom**

**Verantwortlicher Träger und Leiter des Forschungsvorhabens:**

Prof. Dr. Florian Wagenlehner, Dr. med. Adrian Pilatz, Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie

**Patient (Name, Vorname):**

....., geb. am ..... Teiln.-Nr. ....

## **Sehr geehrter Patient, sehr geehrter Angehörige,**

unsere Arbeitsgruppe ist sehr daran interessiert, neue wissenschaftliche Erkenntnisse zum Einfluss des männlichen Geschlechtshormons Testosteron auf die körpereigene Abwehr zu erhalten. Wir wären Ihnen daher sehr dankbar, wenn Sie sich zu einer Teilnahme bereit erklären würden. Diese ist selbstverständlich freiwillig, Sie werden in dieses Forschungsvorhaben also nur dann einbezogen, wenn Sie Ihre Einwilligung erklären. Um Sie über das Vorhaben und über die etwaigen Vorteile und Risiken Ihrer Teilnahme zu informieren, wird der verantwortliche Arzt ein ausführliches Gespräch mit Ihnen führen. Vor diesem Gespräch möchten wir Sie bitten, die nachfolgenden Ausführungen zu lesen. Sie können sich dadurch bereits einen eingehenden Überblick verschaffen.

## **Das Forschungsvorhaben**

### **Worum geht es?**

Das männliche Geschlechtshormon Testosteron kann viele Ereignisse im Körper bestimmen u.a. auch die körpereigene Abwehr beeinflussen. Von besonderer Bedeutung ist es z. B. bei der männlichen Fruchtbarkeit oder auch Veränderungen der Vorsteherdrüse (Prostata).

Wir möchten bei Ihnen im Rahmen Ihrer normalen klinischen Untersuchung und Therapie zusätzlich etwas Blut (ca. 7,5 ml) abnehmen und auf spezielle körpereigene Abwehrzellen untersuchen (sog. Regulatorische T-Zellen).

**Zusammenfassend möchten wir bei Ihnen im Rahmen der Untersuchung neben den Routineuntersuchungen zusätzlich etwas Blut (ca. 7,5 ml) abnehmen, auf körpereigene Abwehrzellen untersuchen und gegebenenfalls Ihren Krankheitsverlauf in der Zukunft weiterverfolgen.**

### **Bringt die Teilnahme mir persönliche Vorteile?**

**Nein**, die bei Ihnen bestimmten regulatorischen T-Zellen könnten allerdings in der Zukunft hilfreich sein Therapien effektiver zu gestalten.

### **Welche Risiken und Belastungen sind zu befürchten?**

- Die entnommene Blutmenge ist gering, so dass nur die üblichen Gefahren der Blutentnahme (Blutung, Nachblutung, Infektion, Verletzung) bestehen.

## Woran ist noch zu denken?

### Die persönlichen Daten werden geschützt.

Die Durchführung des Forschungsvorhabens erfordert es, dass von Ihnen personenbezogene Daten, insbesondere Angaben über die Gesundheit, erhoben, aufgezeichnet und verarbeitet werden. Die erhobenen Daten werden für die **wissenschaftliche Auswertung** des Forschungsvorhabens verwendet, für die **Überwachung** des Forschungsvorhabens durch die zuständigen Überwachungsbehörden sowie für die **Archivierung** der Forschungsergebnisse. Die Verwendung der Daten kann darüber hinaus für eine **Veröffentlichung** der Forschungsergebnisse (beispielsweise in medizinischen Fachzeitschriften) nötig sein.

Die Erhebung, Verarbeitung, Weitergabe und Speicherung der Daten unterliegt strengen **gesetzlichen Bestimmungen**, die grundsätzlich eingehalten werden. Dementsprechend erfolgt eine Weitergabe und Einsichtnahme der personenbezogenen Daten nur durch die zuständigen Überwachungsbehörden und durch zur Verschwiegenheit verpflichtete Mitarbeiter der Einrichtung, die die Durchführung des Forschungsvorhabens finanziell fördert. Im Übrigen unterliegen die Daten den allgemeinen Bestimmungen des **hessischen Datenschutzgesetzes**. Insbesondere eine Veröffentlichung der Daten in wissenschaftlichen Publikationen erfolgt nur, wenn zuvor jeder Bezug zu der Person unkenntlich gemacht worden ist, durch **Anonymisierung**.

**Ansprechpartner** für die Verwaltung Ihrer Daten ist: Prof. Dr. med. Florian Wagenlehner, Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie, Rudolf-Buchheim-Str. 7, 35392 Giessen, Tel.: 0641-985-44516, Fax: 0641-985-44598, Email: [florian.wagenlehner@chiru.med.uni-giessen.de](mailto:florian.wagenlehner@chiru.med.uni-giessen.de)

### Es besteht Versicherungsschutz.

Für die Studie besteht nach schriftlicher Bestätigung des Versicherers Versicherungsschutz nach den Grundsätzen der allgemeinen Betriebshaftpflichtversicherung des Klinikums. Bitte beachten Sie, dass Sie bei Auftreten einer Gesundheitsschädigung, wenn sie Folge des Forschungsvorhabens sein könnte, gehalten sind, diesen Schaden dem Versicherer unverzüglich anzuzeigen. In einem solchen Fall sind Sie zudem gehalten, zweckmäßige Maßnahmen zu treffen, die der Aufklärung der Ursache und des Umfangs des eingetretenen Schadens und der Minderung dieses Schadens dienen. Ausführlichere Informationen hierüber erhalten Sie im Arztgespräch, auch darüber, wie Sie sich verhalten müssen, um Ihren Versicherungsschutz nicht zu gefährden. Auf Wunsch können Sie auch gerne Einsicht in die Versicherungsbedingungen nehmen.

## Sie können die Teilnahme jederzeit beenden.

Wenn Sie aus dem Forschungsvorhaben ausscheiden möchten, können Sie Ihre Einwilligung jederzeit und **ohne Angabe von Gründen** widerrufen. Durch den Widerruf entstehen Ihnen **keinerlei Nachteile**.

Zum Zeitpunkt des Widerrufs bereits erhobene **personenbezogene Daten** werden von dem Widerruf jedoch nur dann erfasst, wenn deren weitere Verwendung nicht erforderlich ist. Häufig ist eine solche **weitere Verwendung** der bereits erhobenen Daten jedoch erforderlich, um die **wissenschaftliche Auswertung** des Forschungsvorhabens nicht zu gefährden. Sollten bei dem Ausscheiden aus dem Forschungsvorhaben bereits einzelne Maßnahmen durchgeführt worden sein, läge eine Löschung der bereits erhobenen Daten auch gar nicht **in Ihrem eigenen Interesse**. Denn sollten im Nachhinein Risiken oder Nebenwirkungen dieser Maßnahmen bekannt werden, können wir Sie nur dann über eine medizinische Nachsorge informieren, wenn uns zu diesem Zeitpunkt Ihre Daten noch vorliegen.

Wir werden daher im Fall eines Widerrufs **unverzüglich prüfen**, ob die Daten aus den genannten Gründen weiter benötigt werden. Sollte dies nicht der Fall sein, werden die Daten je nach den technischen Gegebenheiten umgehend gesperrt, gelöscht oder vernichtet. Anderenfalls werden Ihre Daten erst mit Wegfall der genannten längerfristigen Verwendungszwecke gelöscht, unabhängig hiervon jedoch spätestens mit Ablauf der vorgeschriebenen Aufbewahrungsfrist.

### Einwilligungserklärung:

## Einfluss von Testosteron auf Zellen der körpereigenen Abwehr

Ich habe mir anhand des ausgehändigten Aufklärungsbogens einen Überblick über das Forschungsvorhaben verschafft.

Anschließend hat ..... am ..... um ..... Uhr ein ausführliches Gespräch mit mir geführt. Gegenstand des Gesprächs war insbesondere

- der nähere Inhalt und der praktische Ablauf des Vorhabens, vor allem  
.....  
.....

- die Frage, inwieweit Vorteile, Risiken oder Belastungen zu erwarten sind, vor allem  
.....  
.....
- Fragen des Daten- und Versicherungsschutzes sowie der Hinweis auf mein jederzeitiges Widerrufsrecht.

Ich hatte Gelegenheit, Fragen zu stellen, und habe eine Kopie der vorliegenden Unterlagen erhalten. Anschließend wurde mir ausreichend Zeit gewährt, um in Ruhe über meine Teilnahme nachzudenken. Derzeit habe ich keine weiteren Fragen.

<b>Mit der Teilnahme an dem Forschungsvorhaben bin ich einverstanden.</b>	
<b>Meine Einwilligung umfasst auch die beschriebene Verwendung der personenbezogenen Daten, insbesondere die Erhebung und Verarbeitung von Angaben über die Gesundheit.</b>	
.....	.....
(Ort, Datum)	(Unterschrift Patient)

**Vielen Dank für Ihre Hilfe!** Selbstverständlich werden wir Sie umgehend informieren, falls im Verlauf des Forschungsvorhabens Informationen bekannt werden, die Ihre Bereitschaft zur weiteren Mitwirkung beeinflussen könnten.

.....	.....
(Ort, Datum)	(Unterschrift Untersuchungsleiter / Stellvertreter)

## 12 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## 13 Danksagung

All den Personen, die mich auf dem Weg zur Dissertation begleitet und unterstützt haben, freue ich mich, an dieser Stelle meinen großen Dank aussprechen zu können:

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Florian Wagenlehner und Frau Dr. Monika Fijak für die für mich auserlesene Möglichkeit der Promotion in einem sehr spannenden Thema, die hervorragende Betreuung bei der Realisierung der gesamten Arbeit, verbunden mit intensiver wissenschaftlicher Einarbeitung und Anregung sowie exzellenter und unermüdlicher Unterstützung.

Weiter möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe Reproduktionsbiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Andreas Meinhardt am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen für den freundlichen Empfang in ihrem Team und das anregende Arbeitsklima danken. Frau Dr. Magdalena Walecki, Frau Suada Fröhlich, Frau Eva Wahle, Herrn Dr. Sudhanshu Bhushan und Herrn Miguel Keidel danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, insbesondere im Rahmen der Begleitung meiner ersten Schritte im Labor.

Außerdem möchte ich dem pflegerischen Team der onkologischen Tagesklinik der Uniklinik Gießen für ihre Unterstützung im Patientenkontakt meinen Dank aussprechen.

Meinen Eltern, Thomas und Sabine, wie auch meinen Brüdern, Dominik und Benjamin, danke ich zutiefst, dass ihre immer währende Unterstützung mir Mut und Rückhalt bereiten und mir diesen Weg ermöglichten. Auch meinem Großvater, Dr. Joachim Knöner, danke ich sehr für anregende Gespräche und steten Zuspruch.

Zudem danke ich von Herzen meinem Mann, Philipp, sowie meinen Freunden für ihren Rat und tatkräftigen Beistand.

Abschließend gilt ein besonderer Dank all den Patienten, die sich bereit erklärt haben, Zeit und Blut zu widmen, um diese Forschungsarbeit zu ermöglichen.