

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Urologische Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. J. E. Gschwend)

Immunomagnetische Detektion zirkulierender Tumorzellen (CTCs) im Kontinuum der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms

Veronika M. F. Kreß

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. M. Retz

2. Univ.-Prof. Dr. J. E. Gschwend

Die Dissertation wurde am 09.07.2014 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.01.2015 angenommen.

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	05
1 EINLEITUNG	07
1.1 Fragestellung	19
2 MATERIAL UND METHODEN	20
2.1 Studiendesign	20
2.2 Patientenkollektiv	21
2.3 Detektion der zirkulierenden Tumorzellen mit dem <i>CellSearch® System</i> 23	
2.3.1 Technischer Aufbau des <i>CellSearch® Systems</i>	23
2.3.2 CTC-Detektion mit dem <i>CellSearch® System</i>	25
2.4 Bildgebung	28
2.4.1 Nuklearmedizinische Auswertung bei Skelettmetastasen	28
2.4.2 Radiologische Auswertung bei viszeralen Metastasen	29
2.5 Routinelaborparameter	30
2.6 Lebensqualität und Leistungsfähigkeit	31
2.6.1 Evaluation der Lebensqualität	31
2.6.2 Evaluation der Leistungsfähigkeit mittels ECOG-Status	32
2.7 Gesamtüberleben	33
2.8 Statistische Auswertung	33
3 ERGEBNISSE	35
3.1 Demographische Auswertung des Studienkollektivs	35
3.2 Detektion zirkulierender Tumorzellen im Kontinuum der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms	38
3.2.1 CTC-Detektion bei gesunden Kontrollen	38
3.2.2 CTC-Detektion bei LAPC-Patienten	38
3.2.3 CTC-Detektion bei Patienten mit metastasiertem PC	39
3.2.4 Subgruppenanalyse der CTC-Detektion bei mPC-Patienten	39
3.3 CTC-Schwellenwertanalyse für den Nachweis eines metastasierten PC	41

3.4	Assoziation der CTC-Zahl mit dem Vorliegen von Metastasen	42
3.4.1	Assoziation der CTC-Zahl mit dem Metastasierungsmuster	42
3.4.2	Assoziation der CTC-Zahl mit der ossären Tumormasse	45
3.5	Assoziation der CTC-Zahl mit Routinelaborparametern	47
3.6	Assoziation der CTC-Zahl mit Lebensqualität und Leistungsfähigkeit	49
3.6.1	Assoziation der CTC-Zahl mit der subjektiven Lebensqualität	49
3.6.2	Assoziation der CTC-Zahl mit der objektiven Leistungsfähigkeit ...	52
3.7	Assoziation der CTC-Zahl mit dem Gesamtüberleben	53
4	DISKUSSION	58
4.1	Detektion zirkulierender Tumorzellen beim lokalisierten PC	58
4.2	Detektion zirkulierender Tumorzellen beim metastasierten PC	59
4.2.1	Zusammenhang der CTC-Zahl mit dem Metastasierungsmuster ...	59
4.2.2	Zusammenhang der CTC-Zahl mit der ossären Tumormasse	61
4.2.3	Zusammenhang der CTC-Zahl mit Routinelaborparametern	62
4.2.4	Zusammenhang der CTC-Zahl mit Lebensqualität und Leistungsfähigkeit	64
4.3	CTC-Schwellenwert für den Nachweis eines metastasierten PC	65
4.4	Prognostische Bedeutung der CTC-Zahl	66
4.5	Kritische Betrachtung des <i>CellSearch® Systems</i>	67
4.6	Kritische Betrachtung der Studie	70
4.7	Ausblick	71
5	ZUSAMMENFASSUNG	73
6	ABSTRACT ZUR PUBLIKATION DIESER ARBEIT	75
7	PUBLIKATIONEN IM ZUSAMMENHANG DIESER ARBEIT	76
8	LITERATURVERZEICHNIS	77
9	ABBILDUNGS- / TABELLENVERZEICHNIS	84
10	DANKSAGUNG	86

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Active Surveillance
AUC	Area under the curve
BLC	Bone Lesion Count
BSI	Bone Scan Index
CD45	Cluster of differentiation 45
CD45-APC	CD45-Antikörper, der an Allophycocyanin gebunden ist
CK-PE	Zytokeratin-Antikörper, der an Phycoerythrin gebunden ist
CSS	<i>CellSearch® System</i>
CT	Computertomographie
CTC	Zirkulierende Tumorzelle
CTCs	Zirkulierende Tumorzellen
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DRU	Digital rektale Untersuchung
EAU	European Association of Urology
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EpCAM	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül
FDA	Food and Drug Association <i>(behördliche Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten von Amerika)</i>
g/dl	Gramm pro Deziliter
GS	Gleason Score
Hb	Hämoglobin
IMS	Immunomagnetische Selektion
KI	Konfidenzintervall
LAPC	Lokal fortgeschrittenes Prostatakarzinom

LDH	Laktatdehydrogenase
mCRPC	metastasiertes kastrationsrefraktäres Prostatakarzinom
mmol/l	Millimol pro Liter
mPC	metastasiertes Prostatakarzinom
mTRPC	metastasiertes taxanrefraktäres Prostatakarzinom
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
PC	Prostatakarzinom
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PSA-VZ	Prostata-spezifisches Antigen-Verdopplungszeit
QLQ-C30	Quality of Life Questionnaire-Core 30
ROC-Kurve	Receiver Operating Characteristic-Kurve
RRP	Retropubische radikale Prostatektomie
Tab.	Tabelle
TNM	Klassifikation zur Einstufung des Tumorstadiums: T=Tumor, N=Lymphknoten, M=Metastasen
TRUS	Transrektale Ultrasonographie
U/l	Units pro Liter
WHO	World Health Organisation
WW	Watchful waiting

1 EINLEITUNG

Die Anatomie der Prostata

Die Prostata ist die größte akzessorische Drüse des Mannes. Sie ist etwa kastaniengroß, bis 20 g schwer und von einer derben Capsula prostaticae umhüllt. Anatomisch lässt sie sich in zwei Seitenlappen und einen Mittellappen gliedern. Weiterhin lassen sich eine periurethrale Mantelzone sowie die zentrale und die periphere Zone unterscheiden (siehe Abbildung (Abb.) 1). Letzt genannte entspricht in etwa den Seitenlappen und ist die bevorzugte Lokalisation des Prostatakarzinoms (PC) [58].

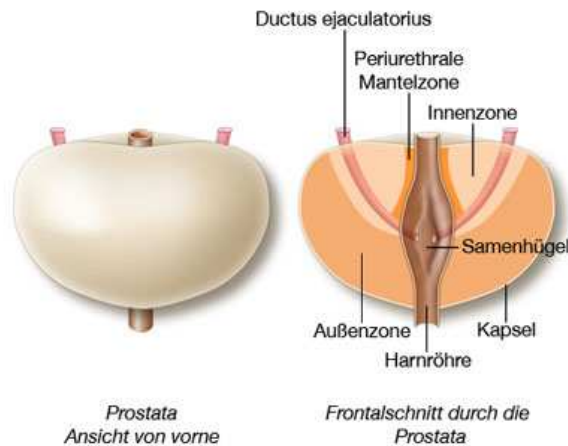


Abb. 1: Zoneneinteilung der Prostata [64]

Inzidenz und Mortalität des Prostatakarzinoms

Das PC stellte in Bayern im Jahr 2008 den häufigsten malignen Tumor in der männlichen Bevölkerung dar. Es machte 27% der Krebsfälle bei Männern aus und war für 11% der Krebssterbefälle verantwortlich. Das mittlere Erkrankungsalter lag bei 70 Jahren. Dementsprechend erhielten in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 2008 über 63000 Männer die Diagnose eines PC. Somit erkrankt in Deutschland einer von acht Männern an einem PC, wobei einer von 31 Männern

daran verstirbt. Aufgrund des meist langsamen Fortschreitens der Krankheit sowie aufgrund von Früherkennungsmaßnahmen und adäquaten Therapieansätzen lag das Sterberisiko mit 3,3% deutlich unter dem Erkrankungsrisiko von 13% [52].

Risikofaktoren der Entstehung eines Prostatakarzinoms

Das Risiko an einem PC zu erkranken ist wesentlich vom Alter abhängig. Anhand einer Datenanalyse aus dem Jahr 2008 beträgt die Wahrscheinlichkeit für einen 40-Jährigen innerhalb der nächsten 10 Jahre an einem Prostatakarzinom zu erkranken lediglich 0,1%. Für einen 70-Jährigen hingegen liegt das Risiko bei 6,6% [52]. Die seit Jahren ansteigende Inzidenz des PC in Deutschland und ganz Europa erklärt sich durch das stetig steigende Durchschnittsalter der Bevölkerung und verbesserte Screeningmethoden mit frühzeitiger Diagnose des PC. Epidemiologische Studien zeigen außerdem, dass auch die ethnische Herkunft Einfluss auf die Pathogenese hat. So ist die Inzidenz des PC in den USA und Nordeuropa viel höher als zum Beispiel in Südostasien [80]. Dass jedoch die Herkunft alleine nicht ausschlaggebend ist, zeigen Migrantenstudien. Ein japanischer Immigrant, der in Kalifornien lebt, hat sogar ein höheres Erkrankungsrisiko als ein in Kalifornien geborener Amerikaner [98]. Andererseits zeigen post mortem Prostatabiopsien, dass so genannte latente Prostatakarzinome, also Karzinome die zu Lebzeiten nie klinisch manifest wurden, in ihrer Häufigkeit kaum geographische Unterschiede aufweisen [9]. Diese Erkenntnis legt nahe, dass neben der ethnischen Herkunft auch äußere Faktoren, im besonderen die Ernährung und der Lebensstil, den Übergang des latenten zum klinisch relevanten PC beeinflussen können.

Ein weiterer anerkannter Risikofaktor ist das Vorkommen von Prostatakarzinomen in der Familienanamnese. Ist ein Verwandter ersten Grades erkrankt, so verdoppelt sich das eigene Risiko. Wurde das Karzinom bei zwei Verwandten ersten Grades diagnostiziert, steigt es sogar um das fünf- bis elffache an [37, 87].

Bei etwa 9% aller PC handelt es sich um eine genetisch bedingte Form. Für die Diagnose eines familiären Prostatakarzinoms werden die Kriterien nach Carter angewendet. Hierfür müssen mindestens drei Verwandte ersten Grades oder in drei aufeinander folgenden Generationen oder mindestens zwei Brüder, deren Karzinom noch vor dem 55. Lebensjahr festgestellt wurde, an einem PC erkrankt sein [13]. Des Weiteren werden lokal entzündliche Prozesse, Vasektomie, Diabetes mellitus und Adipositas als mögliche Risikofaktoren diskutiert [39]. Hohe Testosteronserumwerte scheinen keinen prädiktiven Wert für die Entstehung eines PC zu haben [26].

Diagnostik des Prostatakarzinoms

Hinweise auf ein vorliegendes PC können ein erhöhter Serumspiegel des prostataspezifischen Antigens (PSA), eine auffällige digital rektale Untersuchung (DRU) oder die transrektale Ultrasonographie (TRUS) liefern. Die Diagnose kann jedoch erst gestellt werden, wenn das Karzinom histologisch durch eine Biopsie nachgewiesen wurde [39].

Die DRU ist ein wichtiger Bestandteil des Screenings und der Früherkennung, da die meisten Karzinome in der peripheren Zone der Prostata entstehen. Ab einem Volumen von 0,2 ml kann ein Karzinom ertastet werden. Aufgrund einer auffälligen DRU werden 18% der Erstdiagnosen gestellt [81]. Ist zusätzlich der PSA-Wert größer 2 ng/ml, beträgt der positiv prädiktive Wert 5-30% [15]. Eine suspekta DRU ist eine absolute Indikation zur Stanzbiopsie [39].

Zusätzlich kann eine TRUS der Prostata durchgeführt werden. Die TRUS stellt karzinomverdächtige echoarme Areale dar. Dies gelingt bei 60% der Karzinome [41]. Eine wichtige Rolle spielt die TRUS bei der sonographiegesteuerten Stanzbiopsie der Prostata.

Ein weiterer Parameter bei der Diagnostik des PC ist der PSA-Wert. Das prostataspezifische Antigen ist eine Serinprotease, die fast ausschließlich von Epithelzellen der Prostata gebildet wird. Es wird dem Ejakulat beigemischt und spaltet dort das Protein Semenogelin-1, wodurch sich das Ejakulat verflüssigt. Zwar ist dieses Enzym nahezu organspezifisch, jedoch nicht karzinomspezifisch, da der Serumspiegel auch bei benignen Erkrankungen der Prostata, wie der Hypertrophie oder einer Entzündung erhöht sein kann [73]. Ein unauffälliger PSA-Wert schließt ein Prostatakarzinom jedoch nicht aus. Die Leitlinie der European Association of Urology (EAU) empfiehlt deshalb eine erste PSA-Bestimmung bis zum 40. Lebensjahr, um einen Ausgangswert für künftige Kontrollen zu haben [7]. Liegt der Wert unter 1 ng/ml, ist ein Screeningintervall von 8 Jahren ausreichend [83]. Bei Männern, die älter als 75 sind und einen PSA-Ausgangswert von unter 3 ng/ml hatten, macht ein PSA-Screening keinen Sinn mehr, da ihr Risiko, an dem Prostatakarzinom zu versterben, aufgrund ihrer Lebenserwartung kaum mehr eine Rolle spielt [14]. Als unabhängige Variable ist der PSA-Wert im Vergleich zu einer TRUS oder DRU der beste Screeningparameter für ein PC [16].

Eine Stanzbiopsie bei erhöhtem PSA-Wert aber unauffälliger DRU und TRUS sollte in der Regel erst durchgeführt werden, wenn auch eine zweite Messung einige Wochen später erhöht ist. Vor der Blutentnahme darf keine Manipulation der Prostata, wie eine Tastuntersuchung oder das Legen eines Blasenkatheters, stattgefunden haben. Auch ein Harnwegsinfekt muss ausgeschlossen werden, um falsch hohe PSA-Werte zu vermeiden [25, 89].

Neben PSA-Wert, suspekter DRU oder TRUS sollte auch das Patientenalter, die Komorbidität und der therapeutische Nutzen in die Entscheidung, eine Prostatastanzbiopsie durchzuführen, miteinbezogen werden. Um die falsch negativ Rate gering zu halten, wird empfohlen, zehn bis zwölf Stanzzyylinder unter transrektalsonographischer Kontrolle vor allem aus den peripheren Anteilen zu entnehmen. Mehr als 12 Stanzzyylinder bringen keinen signifikanten Vorteil [27]. Ist kein Karzinom nachweisbar, die DRU bleibt jedoch auffällig oder der PSA-Wert hoch, ist eine weitere Biopsie indiziert [40].

Stadieneinteilung und Grading des Prostatakarzinoms

Therapie und Prognose des PC sind wesentlich vom Stadium der Erkrankung abhängig. Daher ist die richtige Zuordnung des Stadiums bei der Diagnose von grundlegender Bedeutung. Die Computertomographie (CT), die Magnetresonanztomographie, die Sonographie und die Skelettszintigraphie sind gängige Stagingmethoden.

Um die Ausdehnung des Tumors zu beschreiben, empfiehlt sich die Tumor Node Metastasis (TNM) Klassifikation, die in Tabelle (Tab.) 1 dargestellt ist.

Tab. 1: TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms [103]

Tx	Primärtumor nicht beurteilbar oder positive Zytologie
T0	Kein Hinweis auf Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Klinisch nicht erkennbarer Tumor, der weder tastbar noch in bildgebenden Verfahren sichtbar ist
T1a	Tumor zufälliger histologischer Befund ("incidental carcinoma") in 5% oder weniger des resezierten Gewebes
T1b	Tumor zufälliger histologischer Befund ("incidental carcinoma") in mehr als 5% des resezierten Gewebes
T1c	Tumor durch Nadelbiopsie diagnostiziert (z.B. wegen erhöhter PSA-Werte)
T2	Tumor begrenzt auf Prostata
T2a	Tumor befällt die Hälfte eines Lappens oder weniger
T2b	Tumor befällt mehr als die Hälfte eines Lappens
T2c	Tumor in beiden Lappen
T3	Tumor durchbricht die Prostatakapsel
T3a	Extrakapsuläre Ausbreitung (einseitig oder beidseitig)
T3b	Tumor infiltriert Samenblase(n)
T4	Tumor ist fixiert oder infiltriert andere benachbarte Strukturen als Samenblasen, z.B. Blasen Hals, Sphincter externus, Rektum, und/ oder Levatormuskel und/oder ist an Beckenwand fixiert
Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
M1a	Nichtregionäre(r) Lymphknoten
M1b	Knochen
M1c	Andere Lokalisation(en)

Bei der Konstellation T1-T2 N0 M0 handelt es sich um ein lokal begrenztes PC. T3-T4 NX-0 M0 werden unter dem Begriff des lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinoms (LAPC) zusammengefasst. Finden sich Absiedlungen des Karzinoms in anderen Organen, spricht man von einem metastasierten Prostatakarzinom (mPC) [42, 43, 44].

Neben der Tumorausdehnung hat auch die histologische Differenzierung des Tumors eine therapeutische und vor allem eine prognostische Konsequenz. Standard für das Grading ist in Europa der sogenannte Gleason Score (GS). Er ist die Summe der beiden am schlechtesten differenzierten Areale der Biopsate, wobei Grad 1 sehr gut differenziertes und Grad 5 entdifferenziertes Gewebe darstellt. Der GS ist einzeln betrachtet der beste Parameter zur Vorhersage von klinischem Verlauf und Therapieansprechen und somit wichtiger Bestandteil so genannter Nomogramme, die der Risikoabschätzung dienen [71].

Zusätzlich wird ein Grading gemäß der World Health Organisation (WHO) genutzt (Grad 1-3). Ein GS von 2 bis 4 entspricht in der WHO-Klassifikation einer G1 Differenzierung, ein GS von 5 und 6 einer G2 Differenzierung und ein GS von 7 bis 10 bedeutet eine G3/4 Differenzierung nach WHO [72] (siehe Tab. 2).

Tab. 2: *Histopathologisches Grading nach WHO und Gleason Score [72]*

WHO-Grading		Gleason Score
G 1	Gut differenziert	2-4
G 2	Mäßig differenziert	5-6
G 3/4	Schlecht differenziert oder undifferenziert	7-10

Therapieoptionen und Prognose des Prostatakarzinoms

Bei der Wahl der für den Patienten geeigneten Therapie zeigt sich die grundlegende Schwierigkeit, dass auch ohne Intervention lange Überlebenszeiten möglich sind. Aufgrund des oft hohen Erkrankungsalters wäre daher in vielen Fällen keine Therapie nötig. Es stellt sich daher die Frage, welche Patienten von einer Therapie profitieren. Aus dieser Überlegung heraus entwickelten sich zwei unterschiedliche Behandlungskonzepte: das verzögerte Vorgehen und die sofortige Einleitung einer aktiven Therapie.

Das verzögerte Vorgehen beinhaltet zum einen die Strategie des watchful waiting (WW) und zum anderen das Konzept der active surveillance (AS). Die Gemeinsamkeit besteht darin, den Therapiebeginn so lange wie möglich hinauszuzögern und somit einer aktiven Behandlung, die sehr belastend sein kann, unter Umständen ganz zu entgehen. Der Unterschied zwischen beiden Konzepten liegt darin, dass beim WW nach Progress ein palliatives Therapieregime eingeleitet wird. Hingegen ist das Ziel der AS, durch engmaschige Kontrollen und dadurch rechtzeitigen Therapiebeginn weiterhin eine Heilung zu erzielen. Da sich gerade in frühen Stadien die Frage stellt, ob das Karzinom für den Patienten jemals klinisch relevant wird, sollte auch die Möglichkeit des verzögerten Vorgehens in Erwägung gezogen werden. Vor allem ältere Patienten mit einer Lebenserwartung von unter zehn Jahren und einem gut differenzierten Tumor könnten davon profitieren [74].

Im Gegensatz dazu steht das Behandlungskonzept der sofortigen aktiven Therapie. Diese beinhaltet einerseits eine lokale Therapie, wie die operative Entfernung oder die Bestrahlung der Prostata, andererseits systemische Therapiemodalitäten, wie zum Beispiel die Hormontherapie. Hierbei müssen die individuellen Voraussetzungen und Wünsche des Patienten berücksichtigt werden. Grundsätzlich ist zwischen einem kurativen und einem palliativen Therapieregime zu unterscheiden, da eine Heilung derzeit nur in nicht metastasierten Stadien möglich ist.

Das lokal begrenzte PC stellt mit über 90% den weitaus größten Anteil der neu diagnostizierten Tumore dar [54]. Aufgrund von meist fehlender Symptomatik ist

dies vor allem auf verbesserte Screeningmethoden zurückzuführen. Die retro-pubische radikale Prostatektomie (RRP) ist hier der Goldstandard der Therapie mit einem 5-Jahres-Überleben von 69-95% und einer 5-Jahres-Progressionsfreiheit von 82-92% bei lokal begrenzten Tumoren [57]. Bei der RRP werden neben der Prostata beide Samenbläschen und das umliegende Gewebe entfernt. Ziel ist die R0-Resektion, das heißt die komplette Entfernung im Gesunden. Wenn möglich sollten Potenz und Kontinenz erhalten bleiben. Trotz kurativ intentionierter Operation kommt es bei knapp einem Drittel der Patienten zu einem Rezidiv [55]. Die perkutane Strahlentherapie mit einem 5-Jahres-Überleben von 51-93% oder die Brachytherapie mit ähnlich guten Ergebnissen sind Therapiealternativen, besonders für Patienten, die ein hohes Operations- oder Narkoserisiko tragen [74].

Hat der Tumor die Organkapsel durchbrochen und eventuell Nachbarorgane infiltriert, spricht man von einem lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinom (LAPC), sofern keine Metastasen auszumachen sind. Durch die RRP mit einer R0-Resektion kann eine 10-Jahres-Überlebensrate von 50-60% erreicht werden [97]. Aufgrund der erhöhten Gefahr von Lymphknotenmetastasen ist beim LAPC eine regionale Lymphadenektomie entscheidend. Durch eine alleinige Strahlentherapie wird beim LAPC eine 10-Jahres-Überlebensrate von lediglich 34% erzielt [84], ähnlich dem Ergebnis einer WW-Therapie mit einer 9-Jahres-Überlebensrate von 37% [1].

Das Progressionsrisiko des Tumors kann anhand der Risikostratifizierung nach D'Amico abgeschätzt werden [19]. Hierfür werden das TNM-Stadium, der PSA-Wert und der GS berücksichtigt. Eine weitere Möglichkeit die Wahrscheinlichkeit der Progression nach RRP abzuschätzen ist das Kattan Nomogramm. Der Kattan Score errechnet sich wiederum aus dem PSA-Wert, dem klinischen Stadium und dem GS [50]. Um die Rezidivwahrscheinlichkeit zu minimieren, sollte das Risikoprofil in die Therapieplanung miteinbezogen werden.

Streut das Karzinom, finden sich die Läsionen meist im Stammskelett und der Leber, seltener auch in der Lunge. In einem primär metastasierten Stadium werden etwa 10% der Patienten diagnostiziert, die 5-Jahres-Überlebensrate liegt

bei ca. 23% [90]. Kommt es nach einem kurativen Therapieansatz zu Metastasen, beträgt die mediane Zeit bis zum Tod fünf Jahre [78].

Das PC ist in einem metastasierten Stadium nicht mehr heilbar. Durch eine Hormontherapie kann jedoch das Fortschreiten der Erkrankung bei mehr als 75% der Patienten temporär verhindert werden [5]. Nach im Durchschnitt 24 Monaten reicht eine alleinige Hormonablation nicht mehr aus. Man spricht nun von einem metastasierten kastrationsrefraktären Prostatakarzinom (mCRPC). Die Überlebenszeit liegt bei 12-24 Monaten und es werden drei Stadien durchlaufen. Zu Beginn kommt es zu einem PSA-Anstieg ohne Auftreten neuer Metastasen. Wichtig ist nun, die Möglichkeiten der Hormonmanipulation voll auszuschöpfen. Treten neue Metastasen auf, spricht dies für die zweite und zugleich längste Phase, der Patient ist typischerweise nach wie vor symptomlos. Die dritte Phase ist gekennzeichnet durch Symptome, welche durch neue Filiae hervorgerufen werden. Neben Miktionsstörungen äußern sich die Beschwerden häufig durch Knochenschmerzen oder durch pathologische Frakturen aufgrund der Skelettmetastasen. Spätestens hier ist die Einleitung einer Chemotherapie zur Verbesserung der Lebensqualität indiziert [75]. Hierfür sind in Deutschland mehrere Substanzen zugelassen, doch nur für das Taxanderivat Docetaxel ist eine Lebensverlängerung von im Median drei Monaten nachgewiesen. Bei etwa der Hälfte der Patienten kann unter einer Docetaxeltherapie eine partielle Remission mit Verbesserung der Symptome erreicht werden. Aufgrund von zwei Phase-III-Studien (SWOG 99-16 und TAX 327) ist Docetaxel die Standardtherapie in der Erstlinienchemotherapie des mCRPC [77, 91].

Kommt es unter der Docetaxeltherapie zu einem Fortschreiten der Erkrankung, wurde bisher im weiteren Verlauf von einem metastasierten taxanrefraktären Prostatakarzinom (mTRPC) gesprochen. Therapieansätze mit anderen Chemotherapeutika oder speziellen Antikörpern sind derzeit Gegenstand zahlreicher Forschungsstudien. Seit kurzem ist ein neues Präparat namens Cabazitaxel, das ebenfalls ein Taxanderivat ist, nach Versagen einer Docetaxeltherapie zugelassen [23].

Hintergrund der Studie

Das PC stellt die häufigste Tumorentität in der männlichen Bevölkerung Deutschlands dar. Deshalb bestehen hohe Anforderungen an die Früherkennung sowie eine stadiengerechte und individuell angepasste Therapie. Hierfür werden Biomarker benötigt, die einerseits eine hohe Sensitivität und zugleich Spezifität aufweisen. Sie sollen Hinweise liefern, ob ein PC vorliegt, wie weit es bereits fortgeschritten ist, ob eine Therapie erfolgreich ist oder gegebenenfalls ein alternatives Therapieregime eingeleitet werden muss. Zudem soll durch einen solchen Marker eine Aussage über die Prognose des Patienten möglich sein.

Bisher wurde für die Diagnose und Beurteilung des Therapieerfolges der PSA-Wert als serologischer Tumormarker genutzt, obwohl er sich als nur bedingt geeignet erwiesen hat. Vor allem zu Screeningzwecken hat sich die Bestimmung des PSA-Wertes etabliert, wobei die hohe falsch positiv Rate von fast 75% in Kauf genommen wird [31]. Gerade das lokal begrenzte PC betreffend, hat der PSA-Wert einen nur geringen positiv prädiktiven Wert. Zudem sind keine Rückschlüsse auf die Ausdehnung des Tumors möglich [21]. Nach radikaler Prostatektomie jedoch ist der PSA-Wert ein sicherer Marker eines Rezidives. So zeigen zwei konsekutive Anstiege des PSA-Wertes um 0,2 ng/ml ein Rezidiv an [6, 61]. In metastasierten Stadien werden jedoch häufig diskrepante Befunde zwischen PSA-Verlauf und den Ergebnissen in bildgebenden Stagingverfahren beobachtet [22], sodass PSA-Veränderungen nicht zwingend die Tumoraktivität widerspiegeln [67]. Während der Therapie mit Docetaxel kann ein sogenanntes PSA Flare-up auftreten. Hierbei kann bei bis zu 13% der Patienten kurze Zeit nach Einleitung einer Docetaxeltherapie ein PSA-Anstieg beobachtet werden. Dieser kann bis zu acht Wochen andauern, bevor der PSA-Wert dann unter den Ausgangswert fällt. Das Gesamtüberleben der Patienten mit einem Flare-up Phänomen entspricht dem der Patienten mit einem sofortigen PSA-Abfall nach Einleitung der Therapie [63]. Folglich ist der PSA-Wert zur Beurteilung des Frühansprechens bei Einleitung einer Chemotherapie nur bedingt geeignet. Das gilt auch für die Beurteilung des Ansprechens im weiteren Verlauf, da weder der PSA-Wert, noch Veränderungen in

der Skelettszintigraphie den klinischen Benefit während der Therapie widerspiegeln [30, 86]. Bildgebende Verfahren zur Verlaufskontrolle haben den großen Nachteil einer geringen Sensitivität und Spezifität. Der Therapieerfolg oder Misserfolg kann deshalb oft erst mit großer zeitlicher Verzögerung erkannt werden. Ein neuer Marker für die individualisierte Therapieplanung und Verlaufskontrolle ist also dringend erforderlich, um durch eine exakte Diagnose das Therapieregime anpassen zu können.

Bereits 1869 wurde der Zusammenhang zwischen einem Tumorleiden und tumorähnlichen Zellen im peripheren Blut erkannt [3]. Bis heute ist nicht endgültig geklärt, wie zirkulierende Tumorzellen in den Blut- und Lymphstrom gelangen und welche Voraussetzungen hierfür erfüllt sein müssen. Am Bekanntesten ist die Seed-and-Soil-Hypothese. Diese geht von einer kleinen Subpopulation von Zellen des Primärtumors aus, die einer so genannten epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) unterliegen. Hierbei durchlaufen die Tumorzellen eine Veränderung von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Phänotyp und erlangen so die Fähigkeit, in der Blutstrombahn zu überleben, angrenzende Strukturen zu infiltrieren und Endothelgrenzen zu durchbrechen. Folglich ist die EMT als Voraussetzung für invasives Wachstum und Metastasierung zu verstehen. Daher werden zirkulierende Tumorzellen (CTCs) als verlässlicher Marker der Tumoraktivität und Tumorlast vermutet [70].

Grundsätzlich können für die Isolation der CTCs zwei Verfahren unterschieden werden: das auf molekulargenetischer Basis mittels Polymerasenkettenreaktion (PCR) funktionierende und die Anreicherung in biologischen Flüssigkeiten. Hierzu zählen zum Beispiel die Zentrifugation im Dichtegradient, die Filtration und die immunomagnetische Selektion [70].

Das in dieser Arbeit verwendete *CellSearch® System* basiert auf immunomagnetischer Selektion (IMS). Es ist die einzige von der amerikanischen *Food and Drug Administration (FDA)* zugelassene Methode zur CTC-Detektion. Die Selektion der CTCs erfolgt hierbei über einen ferromagnetisch markierten Antikörper gegen das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM), ein

epithelspezifisches Oberflächenmolekül. EpCAM ist aufgrund der Überexpression bei soliden Tumoren und der fehlenden Expression auf Blutzellen, die mesenchymalen Ursprungs sind, besonders geeignet [95].

CTCs können bei Patienten mit lokal begrenzten und metastasierten Tumorerkrankungen, in der Regel jedoch nicht bei Gesunden nachgewiesen werden [2, 60, 62]. Sie stehen dadurch seit fast einem halben Jahrhundert im Interesse der Forschung. Ihnen wird hohes Potential in vielerlei Hinsicht zugesprochen [18, 36, 96], so konnte die Bedeutung als prognostischer Marker beim metastasierten PC bereits in mehreren Studien nachgewiesen werden [22, 60, 67]. Trotzdem hat die CTC-Detektion das PC betreffend noch keine breite Anwendung im klinischen Alltag gefunden. Lediglich beim Mammakarzinom ist das in spezialisierten Zentren der Fall, da gezeigt werden konnte, dass CTCs für die Verlaufskontrolle bessere Ergebnisse erzielten als die konventionelle Bildgebung [12]. Für die Etablierung der CTCs im klinischen Alltag ist das Verständnis über den Zusammenhang und die Ursache des Auftretens der CTCs entscheidend.

Die Studie wurde initiiert, weil sich zwar viele Studien mit der Detektion von CTCs beschäftigt haben, dabei jedoch konträre Ergebnisse erzielt wurden. Dies betrifft besonders die Korrelation mit klinischen Parametern. Zudem wurde kaum auf die CTC-Detektion in den unterschiedlichen Stadien des PC eingegangen. Besonders das lokal fortgeschrittene PC (LAPC) betreffend wurde bisher der Nutzen der CTCs als Prognosefaktor nicht ausreichend untersucht. Es wurde nun zum einen die Anzahl von CTCs sowie der Anteil der prognostisch ungünstigen CTC-Zahl ≥ 5 [59] im Kontinuum der verschiedenen Stadien des PC untersucht und zwar vom lokal fortgeschrittenen PC (LAPC) über das metastasierte kastrationsrefraktäre PC (mCRPC) bis hin zum taxanrefraktären PC (mTRPC). Zum anderen wurden Schwellenwertanalysen zur Vorhersage eines metastasierten Stadiums sowie in Bezug auf das Gesamtüberleben durchgeführt. Des Weiteren wurde der Zusammenhang der CTC-Zahl mit Routinelaborparametern, dem Metastasierungsmuster, der ossären Tumormasse und der Anzahl ossärer Läsionen untersucht. Auch der Zusammenhang der CTC-Zahl mit der Lebensqualität und Leistungsfähigkeit wurde beleuchtet.

1.1 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erhebung der CTC-Zahl in den verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms. Die CTC-Detektion erfolgte mit dem *CellSearch® System* der Firma *Veridex*. Auf folgende Endpunkte wurde in der Studie eingegangen:

- Detektion zirkulierender Tumorzellen im Kontinuum der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms
- Durchführung einer CTC-Schwellenwertanalyse für das Vorliegen von Metastasen
- Assoziation der CTC-Zahl mit dem Metastasierungsmuster
- Assoziation der CTC-Zahl mit der ossären Tumormasse sowie der Anzahl ossärer Läsionen, ermittelt durch nuklearmedizinische Verfahren
- Assoziation der CTC-Detektion mit Routinelaborparametern
- Assoziation der CTC-Zahl mit der subjektiven Lebensqualität anhand der Auswertung eines Fragebogens und mit der objektiven Leistungsfähigkeit anhand des ECOG-Status
- Durchführung einer CTC-Schwellenwertanalyse für das Gesamtüberleben
- Assoziation der CTC-Zahl mit dem Gesamtüberleben

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Studiendesign

Die prospektive Studie wurde der Ethikkommission der technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar, am 09.12.2008 vorgelegt und unter der Projektnummer 2265/08 bewilligt. Alle teilnehmenden Patienten wurden ausführlich vom Studienarzt über den Ablauf und das Ziel der Studie aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis.

Insgesamt erklärten sich von Juni 2008 bis November 2010 15 gesunde Freiwillige und 75 Männer mit einem histologisch gesicherten Adenokarzinom der Prostata bereit, sich Blut aus einer peripheren Vene in der urologischen Abteilung des Klinikums rechts der Isar, Technische Universität München, entnehmen zu lassen. Die Blutentnahme erfolgte bei Patienten mit einem lokal fortgeschrittenen PC (LAPC) vor einer geplanten retropubischen radikalen Prostatektomie (RRP). Metastasierte Patienten wurden entweder vor der Einleitung einer Chemotherapie mit Docetaxel (mCRPC) untersucht, oder vor Beginn einer Secondline Chemotherapie, sofern es sich um docetaxel- und somit taxanrefraktäre Patienten (mTRPC) handelte. Im Zuge der Blutentnahme wurde zudem eine ausführliche Anamnese erhoben.

Um die Ergebnisse der CTC-Detektion mit den Ergebnissen der Staginguntersuchungen mittels Bildgebung vergleichen zu können, wurde versucht, die CTC-Entnahme bei allen Patienten mit einem PC möglichst zeitnah zu einer Skelettszintigraphie und einer Computertomographie vorzunehmen. Die genannten Staginguntersuchungen erfolgten entsprechend der klinischen Notwendigkeit standardisiert im Therapieverlauf.

2.2 Patientenkollektiv

Die Detektion von CTCs erfolgte bei Patienten mit einem lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinom (LAPC), sowie bei metastasierten Patienten mit einem kastrationsrefraktären (mCRPC) oder einem taxanrefraktären PC (mTRPC). Als Kontrollen dienten gesunde Freiwillige. Als Einschlusskriterium für die Kontrollen galt ein maximales Alter von 35 Jahren oder ein stanzbioptisch ausgeschlossenes PC.

Patienten wurden der LAPC-Gruppe zugeordnet, wenn sie ein neu diagnostiziertes lokal fortgeschrittenes Prostatakarzinom mit einer hohen Progressionswahrscheinlichkeit aufwiesen. Die Wahrscheinlichkeit der Progression nach RRP wurde anhand des präoperativen Kattan Scores ermittelt. In unserem Patientenkollektiv sollte dieser mindestens 120 Punkte betragen. Dies entspricht laut Kattan-Nomogramm einem Progressionsrisiko von mindestens 40% in den folgenden fünf Jahren nach RRP (siehe Abb. 2). Der Kattan Score errechnet sich durch Punktaddition aus dem PSA-Wert, dem klinischen Stadium und dem Gleason Score [50]. Patienten in dieser Gruppe sollten zuvor weder eine andere Therapie bezüglich des PC, noch PSA senkende Medikamente erhalten haben.

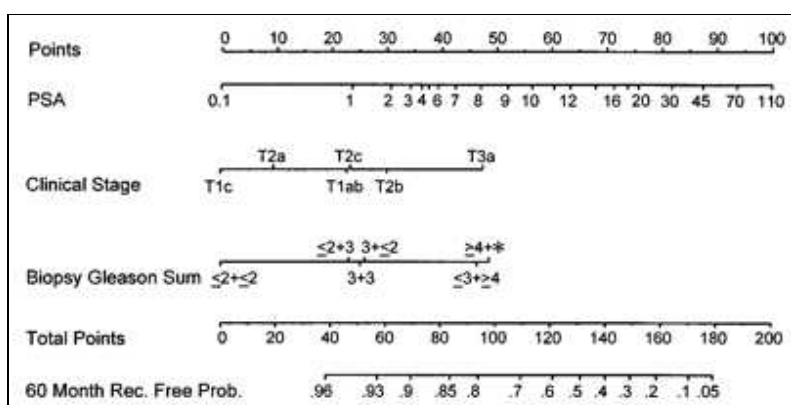


Abb. 2: Kattan-Nomogramm zur Berechnung des Rezidivrisikos nach Prostatektomie [50]

Entsprechend der EAU Guidelines wurden metastasierte Patienten als kastrationsrefraktär klassifiziert (mCRPC), wenn es trotz einer Androgenentzugstherapie mit LH-RH-Analoga und Antiandrogenen oder einer chirurgischen Kastration zu einem Progress kam [45]. Der Progress wurde entweder aufgrund neu aufgetretener oder größenprogredienter Metastasen in der Bildgebung oder aufgrund eines PSA-Anstieges diagnostiziert. Alle mCRPC-Patienten wurden im weiteren Therapieverlauf einer Erstlinienchemotherapie mit Docetaxel zugeführt. Weitere Ein-, beziehungsweise Ausschlusskriterien sind in Tab. 3 dargestellt. Als Hauptausschlusskriterium galt ein Zweitmalignom innerhalb der letzten fünf Jahre.

Tab. 3: Ein- und Ausschlusskriterien der Studie für mCRPC-Patienten [92]

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none"> • Unterschriebene Einverständniserklärung • Alter ≥ 18 Jahre • ECOG-Status ≤ 2 • Histologisch gesichertes, hormonrefraktäres Adenokarzinom der Prostata • Hormonrefraktäres PC nach therapeutischer Androgendeprivation • Keine vorausgegangene oder begleitende zytotoxische Chemotherapie • Serum Kreatinin ≤ 2 mg/dl oder eine kalkulierte Kreatininclearance von ≥ 50 ml/min • Angemessene hämatologische und hepatische Funktion gemäß den folgenden Definitionen: <ul style="list-style-type: none"> - Neutrophilenzahl $\geq 1500/\mu\text{l}$ - Thrombozyten $\geq 100000/\mu\text{l}$ - Hämoglobin ≥ 8 g/dl - Gesamtbilirubin \leq obere Grenze des Normbereichs - Alkalische Phosphatase ≤ 6 x obere Grenze der Norm - GOT und GPT $\leq 3,5$ x obere Grenze der Norm 	<ul style="list-style-type: none"> • Zerebrale Metastasen • Andere maligne Erkrankungen innerhalb der letzten fünf Jahre • Kontraindikationen für die Therapie mit Kortikosteroiden • Kontraindikationen für die Therapie mit Docetaxel • Aktive Infektionen • Schwerwiegende kardiale Funktionsstörung • Schwerwiegende neurologische Erkrankung

Als dritte Studiengruppe wurden Patienten eingeschlossen, die refraktär auf eine Erstlinienchemotherapie mit dem Taxanderivat Docetaxel waren. Somit konnten sie als Patienten mit einem metastasierten taxanrefraktären Prostatakarzinom (mTRPC) definiert werden. Die Anzahl vorheriger Therapien wurde dabei nicht als Ausschlusskriterium berücksichtigt. Die rekrutierten mTRPC-Patienten waren aufgrund des Gesundheitszustandes zumeist keiner weiteren systemischen Therapie zuführbar, sodass lediglich eine supportive palliative Therapie durchgeführt wurde.

2.3 Detektion der zirkulierenden Tumorzellen mit dem *CellSearch*® System

2.3.1 Technischer Aufbau des *CellSearch*® Systems

Die Anzahl der CTCs wurde mit dem *CellSearch*® System (CSS) der Firma *Veridex* (*Veridex*, Raritan, NJ, USA) bestimmt. Das CSS ist ein semi-automatisiertes Verfahren, das die Detektion von CTCs mit Hilfe einer immunomagnetischen Selektion erlaubt.

Hierfür benötigt man *CellSave Preservative Tubes*® (siehe Abb. 3A) zur Gewinnung und Aufbewahrung der zu untersuchenden Vollblutprobe. Diese wird mithilfe des *CellSearch Epithelial Cell Kit*®, das unter anderem Pufferlösungen und die zur Identifikation der Tumorzellen benötigten Antikörper enthält, weiter aufgearbeitet.

Das *CellTracks AutoPrep*® System (siehe Abb. 3B) ist eine automatisierte Teilkomponente des CSS und wird zur Aufbereitung der Probe benutzt, indem diese zentrifugiert, von Blutplasma getrennt und mit den Bestandteilen des *CellSearch Epithelial Cell Kit*® vermischt wird. Die Probe wird anschließend in die *MagNest*® Kammer pipettiert.

Die *MagNest® Kammer* (siehe Abb. 3C) besteht aus einem Probenbehälter und zwei parallel angeordneten Magneten. Sinn dieser Anordnung ist die magnetische Ausrichtung und gleichmäßige Verteilung der Zellen, um Überlagerungen beim Abscannen zu verhindern. Die *MagNest® Kammer* wird in den *CellTracks Analyzer II®* eingelegt.

Der *CellTracks Analyzer II®* (siehe Abb. 3D) beinhaltet ein halbautomatisches Vier-Farben-Fluoreszenzmikroskop, das eine computergenerierte Rekonstruktion und ein Erkennen der Zellbilder erlaubt. Das resultierende Bildmaterial wird abschließend benutzerdefiniert für die endgültige Identifikation und Zählung der CTCs ausgewertet. In dieser Studie erfolgte die abschließende Auswertung des Bildmaterials durch zwei unabhängige, geblindete Untersucher.

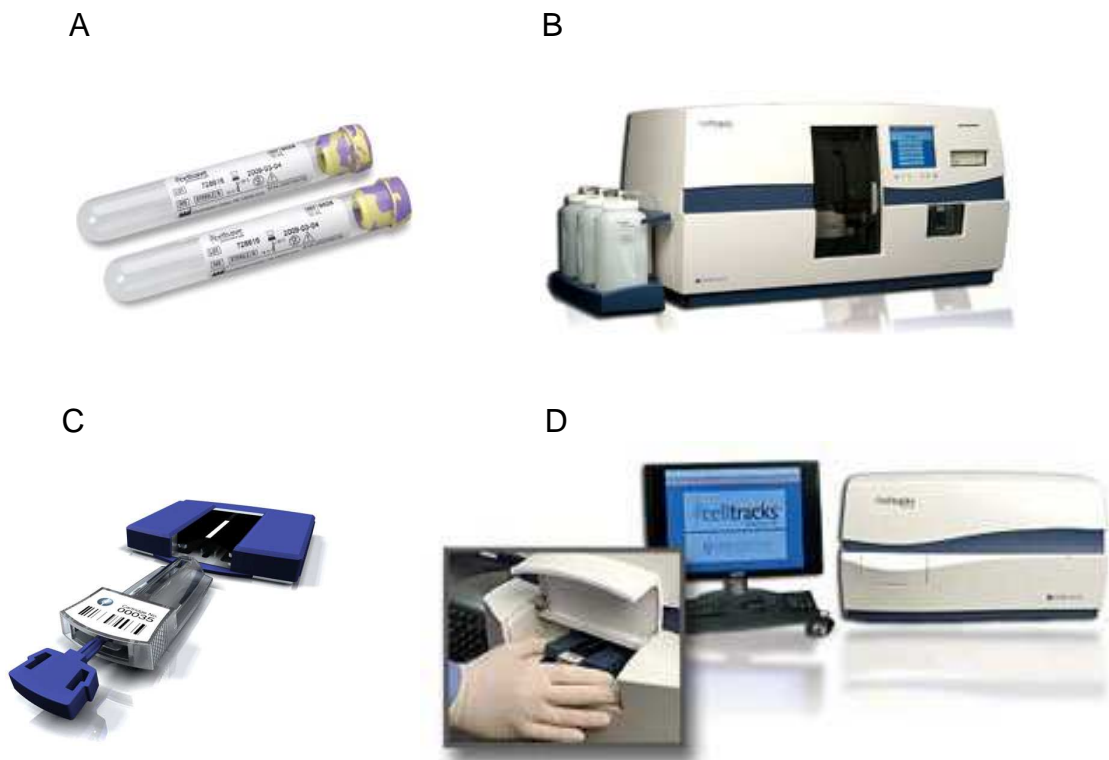


Abb. 3: CellSave Preservative Tubes® (A), CellTracks AutoPrep® System (B), MagNest® Kammer (C) und CellTracks Analyzer II® (D) [102, 105, 106]

2.3.2 CTC-Detektion mit dem *CellSearch*[®] System

Dem Patienten wird aus einer peripheren Vene Blut mit dem *CellSave Preservative Tube*[®] entnommen. Diese Vakuurröhrchen, die maximal 10 ml Blut fassen, enthalten zum einen Ethylendiamintetraacetat (EDTA) als Antikoagulans und zum anderen einen Zellschutz, der von der Firma nicht weiter spezifiziert wird. Dieser erlaubt, dass die Proben bei Raumtemperatur gelagert werden können und ermöglicht ein Zeitfenster von 96 Stunden, in welchem die Proben analysiert werden können. Aus den *CellSave Preservative Tubes*[®] werden dann 7,5 ml Blut mit 6 ml Pufferlösung aus dem *CellSearch Epithelial Cell Kit*[®] vermengt. Hierdurch soll vor allem das Vermischen der Zellen mit den Reagenzien vereinfacht werden. Außerdem verhindern darin enthaltene Proteine das Anhaften der Reagenzien an die Systemkomponenten [49]. Des Weiteren ist darin der Farbstoff 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) enthalten, der durch Anfärben des Zellkerns intakte Zellen besser erkennen lässt. Die Probe wird nun in das *CellTracks AutoPrep*[®] System plaziert und bei 800 g (mittlere Erdbeschleunigung) zehn Minuten zentrifugiert. Anschließend wird die Schicht aus Plasma und Puffer aspiriert. Zu der übrig gebliebenen Zellmasse werden nun 6 ml Puffer und 100 µl des entscheidenden Markers für die CTC-Selektion zugegeben. Die Selektion der CTCs aus dem venösen Vollblut erfolgt durch einen EpCAM-Antikörper, der an magnetische Nanopartikel gekoppelt ist. EpCAM ist ein transmembranes Glykoprotein, das auf allen Zellen epithelialen Ursprungs exprimiert wird. Es spielt sowohl bei Zell-Zell-Interaktionen, Zelladhäsion und nach neueren Erkenntnissen auch bei der intrazellulären Signaltransduktion und Proliferationsregulation eine Rolle [11]. Während einer Inkubationszeit von 20 Minuten bewegen sich sowohl die gebundenen als auch die ungebundenen Ferropartikel entlang eines magnetischen Feldes an den Rand des Reagenzröhrchens. Eine Sonde, die langsam in das Röhrchen gesenkt wird, entfernt nun ungebundene Zellen, Puffer und eventuell verbliebenes Plasma. Anschließend werden wieder 3 ml Pufferlösung hinzugefügt und der magnetische Trennschritt wiederholt. Nach zehn Minuten wird erneut durch eine Sonde EpCAM-negatives Material aspiriert.

Um die über den EpCAM-Antikörper immunomagnetisch selektierten Zellen für die Fluoreszenzkamera sichtbar zu machen, werden Antikörper benötigt, die an fluoreszierende Stoffe gekoppelt sind. Zum einen ist das ein an Phycoerythrin gebundener Antikörper gegen Zytokeratin 8, 18 und 19 (CK-PE), zum anderen ein Antikörper gegen CD45 (Cluster of differentiation 45), der an Allophycocyanin gebunden ist (CD45-APC) [2]. CD45 wird nur von Lymphozyten exprimiert und nicht von Zellen epithelialen Ursprungs und dient somit der Unterscheidung zu den Tumorzellen (siehe Abb. 4).

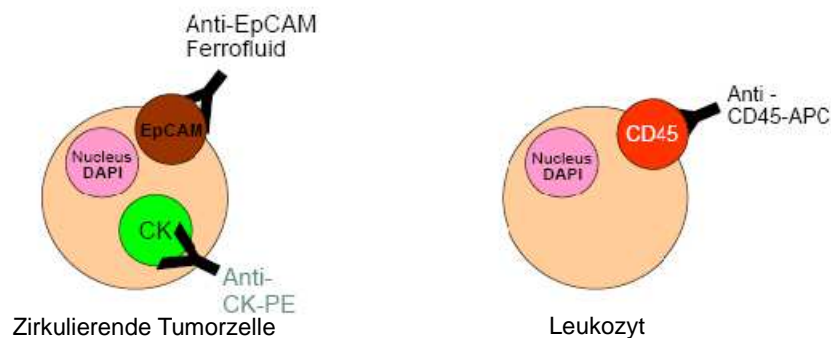


Abb. 4: Schematische Darstellung einer Tumorzelle und eines Leukozyten mit den jeweiligen Antikörpern [104]

Im Folgenden werden 60 µl der fluoreszierenden Marker zusammen mit 200 µl *Immuniperm*® der Probe hinzugefügt und vermischt. Bei *Immuniperm*® handelt es sich um eine spezielle Lösung, die die Permeabilität der Plasmamembran der Zellen erhöht, um das Eindringen der Marker in die Zellen zu ermöglichen. Nach 15 Minuten Inkubationszeit wird der Überschuss an Antikörpern und Flüssigkeiten entfernt. Daraufhin werden für weitere zehn Minuten 250 µl einer zellstabilisierenden Lösung (*Cellfix*®) zugeführt, bevor die Probe in die *MagNest*® Kammer gegeben wird. Dort erfolgt die magnetische Ausrichtung der Zellen. Die *MagNest*® Kammer wird anschließend in den *CellTracks Analyzer II*® eingelegt und von einem vier Farben Fluoreszenzmikroskop abgescannt. Die Informationen werden anschließend an einen Computer weitergeleitet, der die Daten auf dem Bildschirm visualisiert [49]. Nach einem Zeitaufwand von etwa vier Stunden sind

alle Zellen und Zellfragmente, die mit Hilfe des *CellSearch® Systems* aus dem Blut gefiltert und mit einem fluoreszierenden Antikörper markiert werden konnten, dargestellt.

Um falsch negative Ergebnisse zu vermeiden, wurden in regelmäßigen Abständen Kontrollansätze durchgeführt. Für die abschließende Zählung der Tumorzellen bestimmt eine eigens geschulte Person, ob es sich bei dem jeweilig gezeigten Gebilde um eine intakte Tumorzelle oder um einen Lymphozyten beziehungsweise ein Zellfragment handelt. Dabei hält sich der Untersucher an festgelegte Kriterien, die für die Erkennung von Tumorzellen etabliert wurden. Die Morphologie der Zelle muss rund bis oval sein und größer 5 µm. Außerdem sollte die Zelle einen DAPI-positiven Zellkern haben. Des Weiteren gilt eine Zelle nur dann als CTC, wenn sie für Zytokeratin positiv ist, für CD45 jedoch keine Antikörper aufweist [67]. Abb. 5 zeigt zwei Tumorzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop.

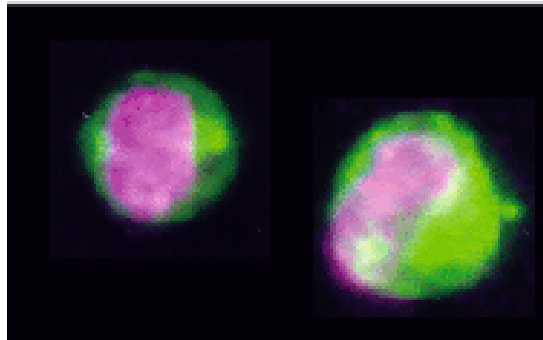


Abb. 5: Zwei zirkulierende Tumorzellen dargestellt mit einem Fluoreszenzmikroskop. Der Zellkern repräsentiert sich rot (DAPI positiv), das Zytokeratin imponiert grün (CK-PE positiv) [107].

2.4 Bildgebung

Bei den LAPC-Patienten wurden aufgrund des klinischen Verdachtes auf ein lokal fortgeschrittenes high-risk Prostatakarzinom erweiterte Staginguntersuchungen durchgeführt. Die Blutentnahme erfolgte in Verbindung mit einer Ganzkörper-skelettszintigraphie, sowie einer Computertomographie (CT) zum Ausschluss von Fernmetastasen. Zusätzlich wurde für eine lokale Ausdehnungsdiagnostik eine Magnetresonanztomographie der Prostata mit einer Endorektalspule durchgeführt.

Die mCRPC-Patienten erhielten die Blutentnahme im Rahmen der routinemäßigen Staginguntersuchungen vor dem ersten Zyklus der geplanten Chemotherapie mit Docetaxel. Es wurde eine CT des Thorax, Abdomens und Beckens, sowie eine Ganzkörperskelettszintigraphie durchgeführt.

Die mTRPC-Patienten wurden ebenfalls mittels CT und Skelettszintigraphie untersucht. Aufgrund der oft sehr schlechten Verfassung der mTRPC-Patienten und des palliativen Therapieregimes wurden die Blutentnahmen teilweise nicht in unmittelbarer zeitlicher Abfolge mit den Staginguntersuchungen vorgenommen. In diesen Fällen wurde auf die letzten verfügbaren Aufnahmen zurückgegriffen, um das Ausmaß und die Lokalisation der Metastasierung zu bestimmen. Lagen die bildgebenden Untersuchungen zu lange zurück, wurde der Patient nicht in die jeweiligen Berechnungen miteinbezogen. Das maximale Zeitintervall wurde für die CT mit sieben Wochen und für die Skelettszintigraphie mit sechs Wochen festgelegt. Sämtliche Ergebnisse der Bildgebung wurden von einem Radiologen beziehungsweise einem Nuklearmediziner geblindet ausgewertet.

2.4.1 Nuklearmedizinische Auswertung bei Skelettmastasen

Die Ganzkörperskelettszintigraphie wurde in der Nuklearmedizinischen Klinik im Klinikum rechts der Isar München mit den Gammakameras *Forte* oder *Skylight* der Firma *Philips* mit einer Scangeschwindigkeit von 10 Zentimetern pro Minute (Matrix 256x1024, Zoom 1) unter Verwendung des Radiopharmakons Technetium-99m-Dicarboxipropandiphosphonat durchgeführt. In einzelnen Fällen wurden bei den mTRPC-Patienten auf extern angefertigtes Bildmaterial zurückgegriffen. Die Auswertung der Untersuchung erfolgte durch einen Facharzt der Nuklearmedizin in geblindeter Weise. Das Ausmaß der Knochenmetastasierung wurde anhand der Skelettszintigraphie mithilfe des sogenannten Bone Scan Index (BSI) bestimmt. Dieser beschreibt den Prozentanteil am gesamten Skelett, der metastatisch verändert ist. Ein BSI <1,4% gilt in der Literatur als prognostisch günstig, ein BSI von >5,1% ist mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet [48].

Außerdem wurden, unabhängig von der Größe der Läsionen, die einzelnen Knochenmetastasen jedes Patienten gezählt. Das Ergebnis wurde als Bone Lesion Count (BLC) bezeichnet.

2.4.2 Radiologische Auswertung bei viszerale Metastasen

In der Regel wurde die CT im Institut für diagnostische und interventionelle Radiologie im Klinikum rechts der Isar München mit den Geräten *Siemens Somatom Sensation Cardiac 64* oder *Philips iCT 256* mit einer Schichtdicke von 5 Millimetern durchgeführt. Hatte der Patient bereits zeitnah eine CT außerhalb dieses Klinikums bekommen, wurden die Bilder angefordert und nochmals befundet. Die Beurteilung der Bilder erfolgte von einem auf urologische Tumorerkrankungen spezialisierten Radiologen. Die Auswertung der CT-Schnittbilder für diese Studie diente der Zuordnung der Metastasenlokalisierung.

2.5 Routinelaborparameter

Neben der Probengewinnung zur CTC-Bestimmung wurde zusätzlich ein Routinelabor abgenommen. Die Bestimmung der Routinelaborparameter erfolgte im Institut für klinische Chemie am Klinikum rechts der Isar München. Primär wurde der PSA-Wert als Prostatakarzinom spezifischer Tumormarker evaluiert und in Nanogramm pro Milliliter (ng/ml) angegeben. Die Bestimmung erfolgte mittels Elektrochemilumineszenz-Immunoassay am Analyseautomaten *Cobas e 411* des Herstellers *Roche*. Bei Vorliegen von älteren PSA-Werten wurde außerdem die PSA-Verdopplungszeit (PSA-VZ) in Monaten berechnet. Sie gibt an, in welchem Zeitraum sich der PSA-Wert verdoppelt hat und gibt einen Anhalt dafür, wie aggressiv ein PC ist [8]. Die PSA-VZ wurde anhand eines Kalkulators des *Memorial Sloan-Kettering Cancer Centers* aus allen verfügbaren PSA-Werten der letzten drei Monate ermittelt [101].

Zusätzlich wurden die Laktatdehydrogenase, die alkalische Phosphatase, das Kalzium und der Hämoglobinwert bestimmt. Diese Parameter können in der klinischen Routine für die Beurteilung des Tumorstadiums und gegebenenfalls des Therapieverlaufs herangezogen werden. Die Laktatdehydrogenase (LDH) in Units pro Liter (U/l) findet sich häufig bei malignen Erkrankungen im Serum erhöht [10]. Die alkalische Phosphatase (AP) in U/l und das Kalzium in Millimol pro Liter (mmol/l) sind Marker des Knochenstoffwechsels. Man beobachtet erhöhte Serumkonzentrationen der AP bei lytischen Prozessen im Zuge einer Skelettmetastasierung [56]. Erniedrigte Hämoglobin-Werte (Hb) in Gramm pro Deziliter (g/dl) im Sinne einer Tumoranämie sind häufig Ausdruck eines fortgeschrittenen Tumorstadiums, zum Beispiel infolge einer Knochenmarksdepression bei Tumorphiltrafiltration [88].

Des Weiteren wurden unspezifische Blutwerte bestimmt, wie das Gesamteiweiß in g/dl, das Albumin in g/dl, die Leukozyten und die Thrombozyten jeweils mal Tausend pro Mikroliter ($\times 1000/\mu\text{l}$).

2.6 Lebensqualität und Leistungsfähigkeit

2.6.1 Evaluation der Lebensqualität

32 Patienten der mCRPC-Gruppe erklärten sich bereit, einen Fragebogen auszufüllen (siehe Tab. 4). Die ausgewählten sechs Fragen entstammen dem Quality of Life Questionnaire-Core 30 (QLQ-C30). Der QLQ-C30 Fragebogen wurde von der European Organisation for Research and Treatment of Cancer erstellt. Die von uns genutzte Version ist seit 1997 in Gebrauch. Der Fragebogen wurde den Patienten am Tag der Blutentnahme ausgehändigt und noch am gleichen Tag von den Patienten ausgefüllt. Die Antworten sollten sich auf den Zeitraum der letzten sieben Tage beziehen und wurden je nach Fragetyp dreistufig kategorisiert in "gut", "mittel" und "schlecht", beziehungsweise in "überhaupt nicht", "mäßig" und "sehr".

Die erste Frage sollte erörtern, ob der Patient während der letzten sieben Tage Schmerzen verspürte. Die zweite Frage lautete, wie der Patient selbst seinen Gesundheitszustand einschätzt. Die dritte Frage bezog sich auf die subjektive Einschätzung der Lebensqualität. Die folgenden drei Fragen wurden gewählt, weil sie die Symptome der Tumor-assoziierten Fatigue widerspiegeln. Dieses nimmt großen Einfluss auf die Lebensqualität von Tumorpatienten und ist sogar mit einer erhöhten Sterblichkeit verbunden [47]. Es wurde nach Müdigkeit sowie nach fehlender Energie und verminderter Leistungsfähigkeit gefragt. Für die Auswertung wurden die Ergebnisse dieser drei Fragen zusammengefasst, indem der Mittelwert berechnet wurde.

Tab. 4: Fragen zur Evaluation der Lebensqualität

Verspürten Sie in den letzten sieben Tagen Schmerzen?	überhaupt nicht <input type="radio"/>	mäßig <input type="radio"/>	sehr <input type="radio"/>
Wie würden Sie selbst Ihren Gesundheitszustand einschätzen?	gut <input type="radio"/>	mittel <input type="radio"/>	schlecht <input type="radio"/>
Wie würden Sie selbst Ihre Lebensqualität einschätzen?	gut <input type="radio"/>	mittel <input type="radio"/>	schlecht <input type="radio"/>
Frage 1 zur Fatigue: Verspürten Sie in den letzten sieben Tagen Müdigkeit?	überhaupt nicht <input type="radio"/>	mäßig <input type="radio"/>	sehr <input type="radio"/>
Frage 2 zur Fatigue: Verspürten Sie in den letzten sieben Tagen ein Fehlen an Energie?	überhaupt nicht <input type="radio"/>	mäßig <input type="radio"/>	sehr <input type="radio"/>
Frage 3 zur Fatigue: Verspürten Sie in den letzten sieben Tagen eine verminderte Leistungsfähigkeit?	überhaupt nicht <input type="radio"/>	mäßig <input type="radio"/>	sehr <input type="radio"/>

2.6.2 Evaluation der Leistungsfähigkeit mittels ECOG-Status

Zum Zeitpunkt der Blutentnahme bestimmte ein Studienarzt den ECOG-Status (Eastern Cooperative Oncology Group). Dieser dient der Einschätzung der Leistungsfähigkeit, den Alltag des Patienten betreffend. Der ECOG-Status reicht von Grad 0 bis 5 (siehe Tab. 5).

Tab. 5: ECOG-Status zur Evaluation der Leistungsfähigkeit krebskranker Patienten [66]

Grad	ECOG-Status
0	Normale uneingeschränkte Aktivität wie vor der Erkrankung.
1	Einschränkung bei körperlicher Anstrengung, aber gehfähig; leichte körperliche Arbeit bzw. Arbeit im Sitzen (z.B. leichte Hausarbeit oder Büroarbeit) möglich.
2	Gehfähig, Selbstversorgung möglich, aber nicht arbeitsfähig; kann mehr als 50% der Wachzeit aufstehen.
3	Nur begrenzte Selbstversorgung möglich; 50% oder mehr der Wachzeit an Bett oder Stuhl gebunden.
4	Völlig pflegebedürftig, keinerlei Selbstversorgung möglich; völlig an Bett oder Stuhl gebunden.
5	Tod.

2.7 Gesamtüberleben

Ein Endpunkt dieser Arbeit war die Evaluation der prognostischen Bedeutung zirkulierender Tumorzellen in den verschiedenen Stadien des metastasierten Prostatakarzinoms für das Gesamtüberleben. Der gewählte Beobachtungszeitraum begann am Tag der Blutentnahme zur CTC-Detektion und endete am 14. Februar 2011. Trat vorher der Tod ein, endete der Beobachtungszeitraum am Todestag. Insgesamt erstreckt sich der Zeitraum somit von Juni 2008 bis Februar 2011. Da die Studie nicht auf die Beurteilung eines Therapieerfolges sondern lediglich auf die prognostische Bedeutung der CTCs in Bezug auf das Gesamtüberleben zielte, war die Berechnung des progressionsfreien Überlebens kein Endpunkt dieser Studie.

2.8 Statistische Auswertung

Die Beurteilung und der Vergleich der CTC-Zahl im Kontinuum der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms war primäres Ziel dieser Arbeit. Hierfür wurde die mediane CTC-Zahl zwischen gesunden Kontrollen, LAPC-, mCRPC- und mTRPC-Patienten verglichen. Die angegebenen CTC-Zahlen beziehen sich immer auf 7,5 ml Blutvolumen. Die in Prozent angegebene Detektionsrate beschreibt, bei wie vielen Patienten mindestens eine CTC nachgewiesen wurde. Die erzielten Ergebnisse wurden in Zusammenhang mit Art und Umfang der Metastasierung, Routinelaborparametern, der Lebensqualität sowie Leistungsfähigkeit der Patienten und dem Gesamtüberleben betrachtet. Zusätzlich wurde mittels Schwellenwertanalyse überprüft, inwiefern CTCs eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen von Metastasen in der Bildgebung erlauben. Für die Optimierung der prognostischen Aussagekraft der CTCs im metastasierten Stadium des PC wurden Schwellenwertanalysen unter Bestimmung der jeweiligen maximalen Sensitivität und Spezifität durchgeführt.

Lineare Trendanalysen bezüglich der Verteilung verschiedener Parameter in den unterschiedlichen Gruppen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Dieser wurde zur Berechnung kontinuierlicher Messwerte verwendet.

Zusammenhänge zwischen CTCs und kontinuierlichen Variablen wurden anhand der Rangkorrelation nach Spearman untersucht. Zur Ermittlung eines bestmöglichen Schwellenwertes wurde eine Receiver Operating Characteristic-Kurve (ROC-Kurve) mit einem 95% Konfidenzintervall (KI) erstellt. Diese ROC-Kurve stellt visuell die Abhängigkeit der Effizienz mit der Fehlerrate für verschiedene Parameterwerte dar [28].

Die Überlebensraten und Überlebenszeiten wurden mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methode dargestellt. Anhand dieser Lebenszeitanalyse lässt sich die Wahrscheinlichkeit berechnen, mit der ein Ereignis bis zu einem bestimmten Zeitpunkt eintritt. Dieses ist mit der Kaplan-Meier-Methode auch dann möglich, wenn nicht alle Patienten identische Beobachtungszeiträume haben [99].

Unterschiede bezüglich des Mortalitätsrisikos zwischen den einzelnen Gruppen wurden anhand des Log-Rang-Tests ermittelt. Dieser ist ein Standardverfahren in der Überlebenszeitanalyse für einfache Gruppenvergleiche [100].

Für alle Tests wurde ein Ergebnis von $p < 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet. Die Analysen wurden mithilfe der SPSS Software Version 19 durchgeführt (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3 ERGEBNISSE

3.1 Demographische Auswertung des Studienkollektivs

Insgesamt wurden 90 Probanden in die Studie zur Detektion zirkulierender Tumorzellen in den verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms aufgenommen. Alle eingeschlossenen Patienten konnten bezüglich der CTC-Detektion ausgewertet werden.

Die Kontrollgruppe bestand aus 15 gesunden Freiwilligen, acht Männern und sieben Frauen mit einem medianen Alter von 28 Jahren (Range 23-83).

Bei den Patienten mit einem histologisch gesicherten Adenokarzinom der Prostata (n=75) wurden 20 Patienten mit einem lokal fortgeschrittenen high-risk PC (LAPC), sowie 55 Patienten mit einem metastasierten PC (mPC) eingeschlossen.

Bei den LAPC-Patienten lag das mediane Alter bei 70 Jahren (Range 52-77 Jahre), der ECOG-Status bei 0 (Range 0) und der GS in den Biopsiepräparaten der Prostata bei 7,5 (Range 6-10), wobei 50% einen GS >7b (4+3) hatten (siehe Tab. 6).

Die Patienten mit einem mPC wurden für weitere Subgruppenanalysen in zwei Fraktionen unterteilt. Zum einen 40 Patienten mit einem metastasierten kastrationsrefraktären Prostatakarzinom (mCRPC), zum anderen 15 Patienten mit einem metastasierten taxanrefraktären Prostatakarzinom (mTRPC).

Die eingeschlossenen mCRPC-Patienten mit einem medianen Alter von 70 Jahren (Range 52-82 Jahre), einem ECOG-Status von 1 (Range 0-2) und einem GS in den Biopsiepräparaten der Prostata von 8 (Range 5-9), wobei 61% einen GS >7b (4+3) hatten, zeigten einen PSA-Progress oder neu aufgetretene Metastasen trotz einer hormonablativen Therapie, sodass eine weitere Therapie mit dem Standarderstlinientherapeutikum Docetaxel geplant wurde. 6 der 40 mCRPC-Patienten (15%) wiesen ausschließlich Weichteilmetastasen auf, während 16 mCRPC-Patienten (40%) ausschließlich Knochenmetastasen hatten. Sowohl

Weichteil- als auch Knochenmetastasen waren bei 18 mCRPC-Patienten (45%) nachweisbar (siehe Tab. 6).

Handelte es sich um Patienten, die im Vorfeld einen Progress während einer Chemotherapie mit dem Taxanderivat Docetaxel aufwiesen, gehörten sie der mTRPC-Gruppe an. Das mediane Alter betrug 70 Jahre (Range 44-82 Jahre), der ECOG-Status war 2 (Range 0-3) und der GS in den Biopsiepräparaten der Prostata war 8 (Range 5-10), wobei 64% einen GS >7b (4+3) aufwiesen. Ausschließlich Weichteilmetastasierung lag bei nur einem mTRPC-Patienten vor. Zusätzlich ossäre Metastasen fanden sich bei 7 von 15 mTRPC-Patienten (47%). Alleinige Knochenmetastasen ließen sich ebenfalls bei 7 mTRPC-Patienten (47%) nachweisen (siehe Tab. 6). Die eingeschlossenen mTRPC-Patienten hatten keine weitere systemische Therapieoption und erhielten somit eine palliative best supportive care Therapie.

Tab. 6: *Patientencharakteristika der einzelnen Analysegruppen*

	LAPC	mCRPC	mTRPC	mPC (mCRPC + mTRPC)
Anzahl an Patienten [n]	20	40	15	55
Alter [Jahre]				
Median	70	70	70	70
Range	52-77	52-82	44-82	44-82
ECOG-Status				
Median	0	1	2	1
Range	0	0-2	0-3	0-3
Gleason Score bei Diagnose				
Median	7,5	8	8	8
Range	6-10	5-9	5-10	5-10
Primäre Therapie [n]				
RRP		12	6	18
perkutane Strahlentherapie	-	3	1	4
palliativ		25	8	33
Systemische Therapie [n]				
Hormonablation	-	40	15	55
Docetaxel		0	15	15
Metastasierungsmuster [n]				
Weichteilmetastasen	-	6	1	7
ossäre Metastasen		16	7	23
ossäre + viszerale Metastasen		18	7	25
Skelettszintigraphie				
BSI [%]				
Median		16,9	20,0	19,5
Range	-	0,3-67,2	0,03-45,6	0,03-67,2
BLC [n]				
Median		55	82	63
Range		4-280	1-220	1-280

3.2 Detektion zirkulierender Tumorzellen im Kontinuum der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms

3.2.1 CTC-Detektion bei gesunden Kontrollen

Bezogen auf 7,5 ml Vollblut wurden bei den gesunden Kontrollen mit einem medianen Alter von 28 Jahren (Range 23-83 Jahre) keine zirkulierenden Tumorzellen nachgewiesen (siehe Abb. 6).

3.2.2 CTC-Detektion bei LAPC-Patienten

Die eingeschlossenen Patienten mit einem lokal fortgeschrittenen, jedoch nicht metastasierten PC (LAPC, n=20) zeigten einen medianen PSA-Wert von 21 ng/ml und ein klinisches Tumorstadium von mindestens cT3a in 19 Fällen (95%). Der mediane GS in der Stanzbiopsie der Prostata war 7,5 (Range 6-10), wobei der Abstand von der Biopsie zu der CTC-Entnahme im Median 50 Tage (Range 20-239 Tage) betrug. Somit ergab sich in unserem Kollektiv ein medianer Kattan Score von 170 (Range 125-200), was trotz kurativ intentionierter radikaler Prostatektomie eine mediane Rezidivwahrscheinlichkeit von 90% (Range 45-95%) prognostiziert. Obgleich ein lokal fortgeschrittenes Tumorstadium mit hoher Rezidivwahrscheinlichkeit vorlag, konnte nur bei einem Patienten (5%) eine charakteristische Tumorzelle gefunden werden (siehe Abb. 6). Folglich ergab sich bezüglich der CTC-Detektion kein Unterschied zu den Kontrollen ($p=0,657$). Korrelationsuntersuchungen der klinischen Tumorcharakteristika mit dem Auftreten von CTCs ließen keinen Zusammenhang erkennen (siehe Tab. 7).

Tab. 7: Korrelation von CTCs und klinischen Parametern beim LAPC

	Median Range	Korrelation mit CTC-Zahl	
		Korrelationskoeffizient r	Signifikanz p
CTCs pro 7,5 ml	0,0 0,0-1,0	-	-
PSA [ng/ml]	21,3 0,5-260,0	-0,090	0,707
Gleason Score	8 6-10	0,067	0,779
Kattan Score	170 125-200	0,002	0,992
Tage Biopsie bis CTC-Entnahme	50 20-239	-0,311	0,182

3.2.3 CTC-Detektion bei Patienten mit metastasiertem PC

Bei den Patienten mit einem mPC (n=55) betrug die mediane CTC-Zahl 9 pro 7,5 ml Vollblut (Range 0-2347 CTCs). Die Detektionsrate lag bei 84%. Dabei zeigten 58% eine in der Literatur als prognostisch ungünstig beschriebene CTC-Zahl ≥ 5 [59]. Im Vergleich der metastasierten Patienten zu den Kontrollen oder zu den Patienten mit einem LAPC findet sich eine signifikant höhere CTC-Zahl ($p < 0,001$).

3.2.4 Subgruppenanalyse der CTC-Detektion bei mPC-Patienten

Die metastasierten Patienten wurden für eine Subgruppenanalyse in Abhängigkeit des Tumorstadiums in eine kastrationsrefraktäre chemotherapienaive (mCRPC) und eine taxanrefraktäre (mTRPC) Subgruppe unterteilt.

Es zeigte sich bei den mCRPC-Patienten (n=40) eine mediane CTC-Zahl von 7,5 CTCs pro 7,5 ml Vollblut (Range 0-225 CTCs) bei einer Detektionsrate von 80%, entsprechend 32 von 40 Patienten (siehe Abb. 6). Eine prognostisch ungünstige CTC-Zahl ≥ 5 lag bei 58% (n=23) der mCRPC-Patienten vor.

Bei den mTRPC-Patienten (n=15) fand sich eine mediane CTC-Zahl von 14 CTCs in 7,5 ml Vollblut (Range 0-2438 CTCs) mit einer Detektionsrate von 93% (siehe Abb. 6). Dies entspricht 14 von 15 Personen. Die prognostisch ungünstige CTC-Zahl ≥ 5 fand sich bei 9 Patienten (60%).

Sowohl für mCRPC- als auch für mTRPC-Patienten ergab sich somit eine signifikant höhere CTC-Zahl im Vergleich zu den LAPC-Patienten ($p < 0,001$) und den Kontrollen ($p < 0,001$). Im Vergleich der CTC-Zahlen der mCRPC- versus der mTRPC-Patienten fand sich bei den TRPC-Patienten eine höhere mediane CTC-Zahl und ein Anstieg der Detektionsrate, jedoch eine nahezu gleiche Rate an Patienten mit einer prognostisch ungünstigen CTC-Zahl ≥ 5 . Die statistische Auswertung erbrachte jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den mCRPC- und mTRPC-Subgruppen ($p = 0,378$).

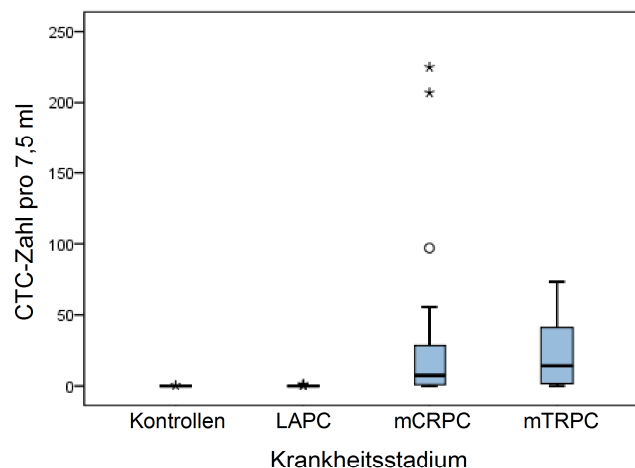


Abb. 6: CTC-Zahlen im Kontinuum des Prostatakarzinoms
(Kreis: milder Ausreißer → Wert liegt 1,5-3 Interquartilsabstände außerhalb, Sternchen: extremer Ausreißer → Wert liegt >3 Interquartilsabstände außerhalb)

3.3 CTC-Schwellenwertanalyse für den Nachweis eines metastasierten PC

Aufgrund des signifikanten Unterschiedes der CTC-Zahlen zwischen den LAPC-Patienten (n=20) und den mPC-Patienten (n=55) wurde eine Schwellenwertanalyse für das Vorliegen von bildmorphologisch nachweisbaren Metastasen durchgeführt. Für diese Analyse wurden sowohl Metastasen in der Skelettszintigraphie als auch Metastasen in der CT des Thorax, Abdomens und Beckens gewertet.

Im Vergleich zu den LAPC-Patienten mit einer medianen CTC-Zahl von 0 (Range 0-1), zeigten Patienten in metastasierten Tumorstadien signifikant höhere CTC-Zahlen ($p < 0,001$) mit einer medianen CTC-Zahl von 9 (Range 0-2347 CTCs). Die ROC-Schwellenwertanalyse ergab einen kalkulierten CTC-Wert von 0,6 pro 7,5 ml mit einer Sensitivität von 84% und einer Spezifität von 95% (AUC 0,900; $p < 0,001$; 95% KI 0,832-0,969) (siehe Abb. 7).

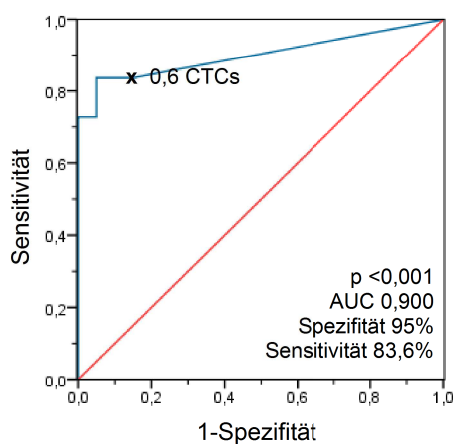


Abb. 7: ROC-Kurve für die Wahrscheinlichkeit bildmorphologisch nachweisbarer Metastasen

Da in der klinischen Anwendung die kalkulierte CTC-Zahl von 0,6 nicht praktikabel ist, wurde in einer weiterführenden Untersuchung die prognostische Bedeutung von 1 CTC pro 7,5 ml Blut untersucht. Es ergab sich hierfür eine Sensitivität von 78% und eine Spezifität von 95% (AUC 0,900; $p < 0,001$; 95% KI 0,832-0,969).

3.4 Assoziation der CTC-Zahl mit dem Vorliegen von Metastasen

3.4.1 Assoziation der CTC-Zahl mit dem Metastasierungsmuster

Um die Assoziation zwischen den CTCs und dem Metastasierungsmuster zu untersuchen, wurden alle mPC-Patienten anhand des Vorliegens von lymphogenen, ossären und viszeralen Metastasen klassifiziert. Somit ergab sich die Gruppe der Patienten mit ossären und viszeralen Läsionen mit oder ohne lymphogene Metastasen (n=25), die Gruppe mit alleinigen ossären Metastasen mit oder ohne lymphogene Metastasen (n=23), sowie eine Gruppe mit alleiniger Weichgewebismetastasierung im Sinne von lymphogenen und/oder viszeralen Metastasen (n=7).

Patienten mit ausschließlich ossären Metastasen (n=23) zeigten im Median 6 CTCs (Range 0-2437 CTCs). Wiesen die Patienten zusätzlich viszerale Metastasen auf (n=25), stieg die mediane CTC-Zahl auf 26 pro 7,5 ml Blut (Range 0-207 CTCs), jedoch ohne eine statistische Signifikanz zu erreichen (p=0,121). Patienten mit ausschließlich Weichgewebismetastasen (n=7) verfügten über eine mediane CTC-Zahl von 0 (Range 0-28 CTCs). Folglich ergab sich bei alleiniger Weichgewebismetastasierung kein signifikanter Unterschied zu den gesunden Kontrollen (p=0,160). Im Gegensatz hierzu waren mit dem Vorhandensein von Knochenmetastasen die CTC-Zahlen im Vergleich zu Patienten in nicht metastasierten Stadien signifikant erhöht (p<0,001). Ebenso war die CTC-Zahl bei Patienten mit ausschließlicher Weichgewebismetastasierung signifikant niedriger im Vergleich zu Patienten mit Skelettmastasen (p=0,029) oder zusätzlichen viszeralen Metastasen (p=0,001). Der Zusammenhang der CTC-Zahl mit dem Metastasierungsmuster ist in Abb. 8 dargestellt.

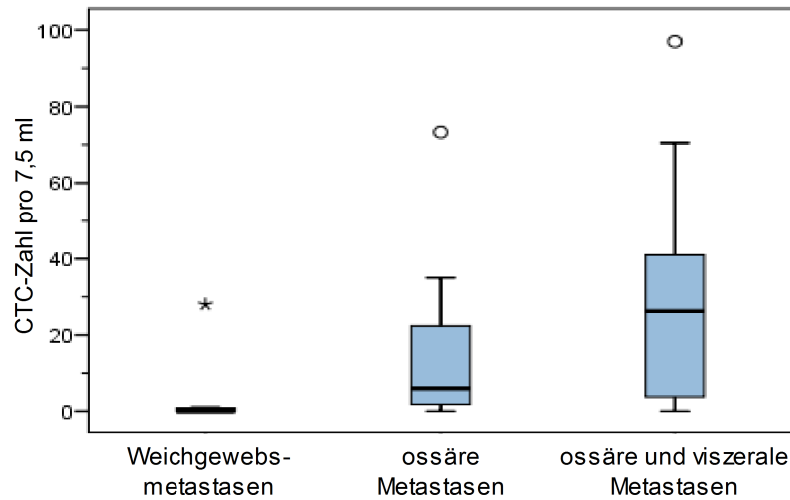


Abb. 8: CTC-Zahlen in Abhängigkeit des Metastasierungsmusters
 (Kreis: milder Ausreißer → Wert liegt 1,5-3 Interquartilsabstände außerhalb, Sternchen: extremer Ausreißer → Wert liegt >3 Interquartilsabstände außerhalb)

Die Untersuchung der Detektionsraten in Abhängigkeit des Metastasierungs-musters zeigte die höchste Detektionsrate von 96% bei Patienten mit zugleich Knochen- und Viszeralmetastasen, gefolgt von Patienten mit lediglich ossären Läsionen mit einer Detektionsrate von 83% und schließlich 43% bei den Patienten mit ausschließlich Weichgewebsmetastasen (siehe Abb. 9).

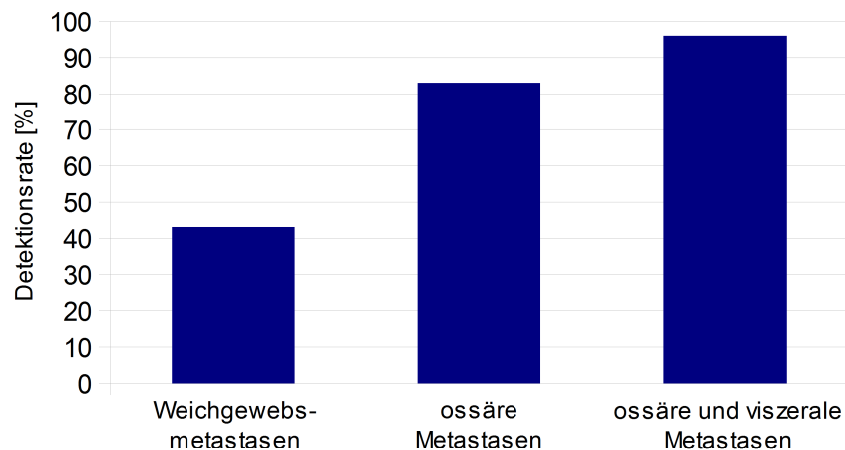


Abb. 9: Detektionsraten in Abhängigkeit des Metastasierungsmusters

Ein ähnliches Bild bot sich beim Vergleich des Anteils der Patienten mit einer prognostisch ungünstigen CTC-Zahl ≥ 5 [59]. Die niedrigste Rate an CTCs ≥ 5 zeigten Patienten mit ausschließlich Weichgewebismetastasen mit 14%, gefolgt von Patienten mit ausschließlich ossären Metastasen mit 57% und schließlich Patienten mit ossären und viszerale Metastasen mit 72% (siehe Abb. 10).

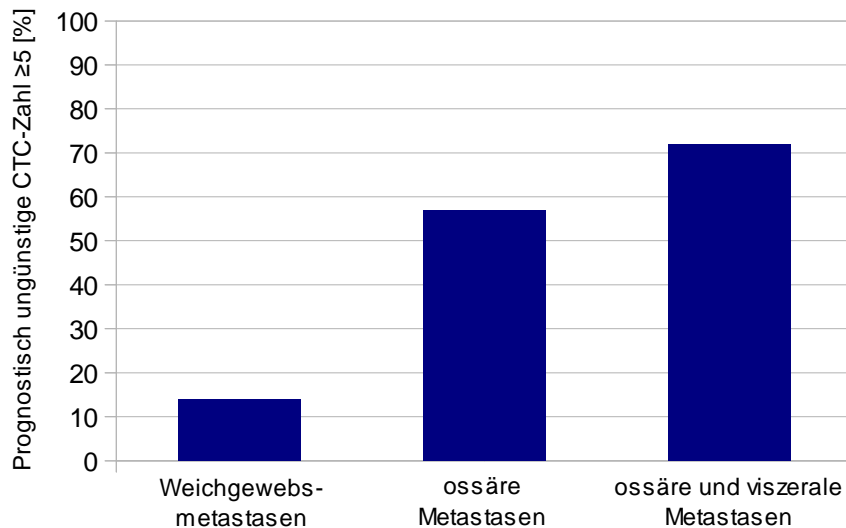


Abb. 10: Anteil der prognostisch ungünstigen CTC-Zahl ≥ 5 in Abhängigkeit des Metastasierungsmusters

Eine weitere Subgruppenanalyse zeigte zudem eine nahezu gleichbleibende Verteilung der CTC-Zahl < 5 versus ≥ 5 bei den mCRPC- und mTRPC-Patienten (siehe Tab. 8).

Tab. 8: Prognostisch günstige (CTCs <5) und ungünstige (CTCs ≥5) CTC-Zahlen in Abhängigkeit des Metastasierungsmusters in den unterschiedlichen Krankheitsstadien

Krankheitsstadium		Metastasierungsmuster			Gesamt	%
		lymphogen ± viszeral	ossär ± lymphogen	ossär und viszeral ± lymphogen		
mCRPC	CTCs <5	5	7	5	17	42,5
	CTCs ≥5	1	9	13	23	57,5
mTRPC	CTCs <5	1	3	2	6	40
	CTCs ≥5	0	4	5	9	60
mPC	CTCs <5	6	10	7	23	41,8
	CTCs ≥5	1	13	18	32	58,2

3.4.2 Assoziation der CTC-Zahl mit der ossären Tumormasse

Um die Beziehung der erhobenen CTC-Zahlen mit der ossären Tumormasse zu untersuchen, wurden die Ganzkörperskelettszintigraphien von einem Facharzt für Nuklearmedizin ausgewertet. Analysiert wurden Patienten, die in einer Skelettszintigraphie ossäre Läsionen aufwiesen. Der Bone Scan Index (BSI) wurde ermittelt, definiert als der prozentual von Knochenmetastasen betroffene Anteil des gesamten Skeletts. In die Berechnungen wurden nur Patienten einbezogen, deren Abstand von der CTC-Entnahme bis zur Skelettszintigraphie maximal 6 Wochen betrug (n=42). Der Abstand von der CTC-Entnahme bis zur Durchführung der Skelettszintigraphie betrug somit im Median 4 Tage. Es zeigte sich weder eine Korrelation der CTC-Zahlen mit dem BSI bei Patienten mit ausschließlich ossärer Metastasierung (n=19; r=0,061; p=0,805), noch bei Einbezug aller Patienten mit Skelettmetastasen, unabhängig davon ob zusätzlich andere Metastasen vorlagen (n=42; r=0,256; p=0,101).

Zusätzlich zum BSI wurde die ossäre Tumormasse anhand des Bone Lesion Count (BLC), also der Anzahl ossärer Läsionen in den angefertigten Skelettszintigraphien bestimmt. Ähnlich den Ergebnissen des BSI, fand sich auch für den BLC kein signifikanter Zusammenhang mit den CTC-Zahlen. Dies gilt wiederum für Patienten mit ausschließlich ossärer Metastasierung (n=19; r=0,150; p=0,540) sowie für alle Patienten mit Knochenmetastasen (n=42; r=0,226; p=0,151).

In einer weiterführenden Auswertung wurde die CTC-Zahl in Abhängigkeit der BSI-Prognosegruppen nach Imbriaco et al. ausgewertet. Diese Gruppeneinteilung differenziert Patienten mit guter, mittlerer und schlechter Prognose entsprechend unten stehender Tab. 9. Interessanterweise ergab sich eine inkonsistente Verteilung der medianen CTC-Zahlen in den unterschiedlichen Prognosegruppen, jedoch eine nahezu gleiche Rate an prognostisch ungünstigen CTCs ≥ 5 . Einschränkend für diese Auswertung ist die sehr kleine Patientenzahl in den ersten beiden Prognosegruppen.

Tab. 9: Korrelation der BSI-Prognosegruppen mit CTCs bei Patienten mit Knochenmetastasen

BSI-Prognosegruppe	n	CTC-Zahl pro 7,5 ml		≥ 5 CTCs [%]
		Median	Range	
< 1,4%	3	13	1-2438	67
1,4%-5,1%	3	5	1-26	67
> 5,1%	36	10	0-225	64

3.5 Assoziation der CTC-Zahl mit Routinelaborparametern

Um die Zusammenhänge zirkulierender Tumorzellen mit Routinelaborparametern zu untersuchen, wurde den Patienten unmittelbar mit der CTC-Entnahme auch Blut für ein Routinelabor entnommen. Da bei den LAPC-Patienten nur ein Patient eine CTC aufwies und somit kein erkennbarer Zusammenhang mit klinischen Parametern zu beobachten war, erfolgte die Korrelationsanalyse der CTC-Zahl mit Laborparametern nur in der Kohorte der metastasierten Patienten.

Die Korrelationsanalysen von CTCs und Laborwerten bei Patienten mit einem mPC (n=55) zeigten eine signifikant positive Korrelation der CTC-Zahl mit der alkalischen Phosphatase ($r=0,540$; $p<0,001$) und der Laktatdehydrogenase ($r=0,536$; $p<0,001$).

Eine negative Korrelation fand sich mit dem Hämoglobinwert ($r=-0,385$; $p=0,004$) und der PSA-Verdopplungszeit, berechnet aus allen verfügbaren PSA-Werten der letzten 3 Monate ($r=-0,372$; $p=0,010$).

Keine Korrelation konnte für das Kalzium ($r=0,016$; $p=0,907$), das Gesamteiweiß ($r=-0,089$; $p=0,541$), das Albumin ($r=-0,218$; $p=0,183$), die Leukozytenzahl ($r=0,140$; $p=0,310$) und die Thrombozytenzahl ($r=0,096$; $p=0,484$) nachgewiesen werden.

Für den PSA-Wert fand sich ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang mit der CTC-Zahl ($r=0,059$; $p=0,667$). Dies galt auch, wenn die Subgruppen mCRPC und mTRPC getrennt voneinander betrachtet wurden. Weder für mCRPC-Patienten ($r=0,124$; $p=0,446$), noch für mTRPC-Patienten ($r=-0,168$; $p=0,550$) konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe an CTCs und dem PSA-Wert beobachtet werden.

Eine detaillierte Aufstellung der erhobenen Laborparameter in den verschiedenen Stadien des mPC sowie der Korrelation zu den CTC-Zahlen ist in der Tab. 10 dargestellt.

Tab. 10: Korrelation von CTCs mit Routinelaborparametern bei Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom

Laborparameter		mCRPC	mTRPC	mPC (mCRPC + mTRPC)
PSA [ng/ml]	Median (Range)	127,5 (0,1-3378,0)	168,7 (4,5-2262,0)	155,2 (0,1-3378,0)
	Korrelation r mit der CTC-Zahl	r = 0,124	r = -0,168	r = 0,059
	Signifikanz p	p = 0,446	p = 0,550	p = 0,667
PSA-VZ [Monate]	Median (Range)	1,9 (-5,3-16,0)	3,4 (-13,5-20,7)	2,0 (-13,5-20,7)
	Korrelation r mit der CTC-Zahl			r = -0,372
	Signifikanz p			p = 0,010
Alkalische Phosphatase [U/l]	Median (Range)	180,5 (50,0-1466,0)	289 (125-803)	211 (50-1466)
	Korrelation r mit der CTC-Zahl			r = 0,540
	Signifikanz p			p < 0,001
Kalzium [mmol/l]	Median (Range)	2,2 (1,6-2,4)	2,1 (1,8-2,5)	2,2 (1,6-2,5)
	Korrelation r mit der CTC-Zahl			r = 0,016
	Signifikanz p			p = 0,907
LDH [U/l]	Median (Range)	337 (218-1900)	508 (179-1879)	365 (179-1900)
	Korrelation r mit der CTC-Zahl			r = 0,536
	Signifikanz p			p < 0,001
Gesamt Eiweiß [g/dl]	Median (Range)	7,0 (5,1-8,2)	6,4 (5,5-7,9)	6,9 (5,1-8,2)
	Korrelation r mit der CTC-Zahl			r = -0,089
	Signifikanz p			p = 0,541
Albumin [g/dl]	Median (Range)	4,2 (3,2-4,7)	3,7 (3,3-4,1)	4,1 (3,2-4,7)
	Korrelation r mit der CTC-Zahl			r = -0,218
	Signifikanz p			p = 0,183
Hämoglobin [g/dl]	Median (Range)	11,6 (7,0-16,1)	9,7 (7,4-13,6)	11,0 (7,0-16,1)
	Korrelation r mit der CTC-Zahl			r = -0,385
	Signifikanz p			p = 0,004
Leukozyten [x1000/μl]	Median (Range)	6,4 (1,8-14,6)	6,9 (2,6-16,9)	6,4 (1,8-16,9)
	Korrelation r mit der CTC-Zahl			r = 0,140
	Signifikanz p			p = 0,310
Thrombo- zyten [x1000/μl]	Median (Range)	229 (53-408)	266 (120-447)	235 (53-447)
	Korrelation r mit der CTC-Zahl			r = 0,096
	Signifikanz p			p = 0,484

3.6 Assoziation der CTC-Zahl mit Lebensqualität und Leistungsfähigkeit

3.6.1 Assoziation der CTC-Zahl mit der subjektiven Lebensqualität

Zum Zeitpunkt der CTC-Entnahme wurde allen mCRPC-Patienten ein Fragebogen, bestehend aus selektierten Fragen des QLQ-C30 Fragebogens, ausgehändigt. Der Fragebogen wurde von den Patienten ohne Hilfe ausgefüllt und noch am selben Tag wieder eingesammelt. Insgesamt erklärten sich 32 Patienten bereit, den Fragebogen vollständig auszufüllen.

Ein statistischer Trend zugunsten höherer CTC-Werte wurde beobachtet für die Frage nach Schmerz ($p=0,028$; siehe Abb. 11 A) und die Frage nach der Selbsteinschätzung des Gesundheitszustandes ($p=0,010$; siehe Abb. 11 B). Hingegen konnte dieser Zusammenhang für die Frage nach der selbst eingeschätzten Lebensqualität statistisch nicht belegt werden ($p=0,242$; siehe Abb. 11 C).

Eine typische und zugleich schwer belastende Begleiterscheinung bei Tumorpatienten ist die Tumor-assoziierte Fatigue. Um deren Ausmaß zu erfassen, wurden die drei Fragen mit den typischen Symptomen der Tumor-assoziierten Fatigue zusammengefasst. Diese bezogen sich auf die fehlende Energie, Müdigkeit und verminderte Leistungsfähigkeit während der letzten sieben Tage. Für das Ausmaß der Tumor-assoziierten Fatigue konnte ein signifikanter Zusammenhang mit der medianen CTC-Zahl in einer linearen Trendanalyse nachgewiesen werden ($p=0,048$; siehe Abb. 11 D).

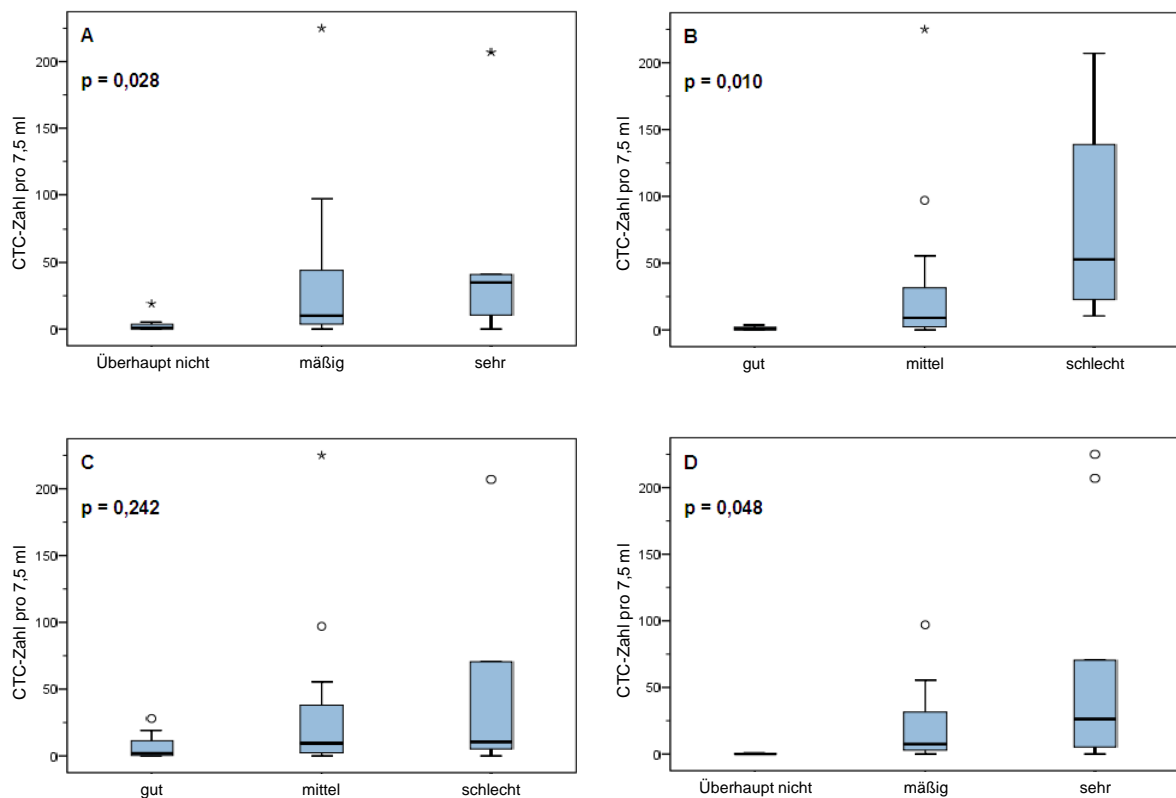


Abb. 11: Verteilung der CTCs bei den Fragen nach Schmerz (A), Gesundheitszustand (B), Lebensqualität (C) und Tumor-assoziiertes Fatigue (D) (Kreis: milder Ausreißer → Wert liegt 1,5-3 Interquartilsabstände außerhalb, Sternchen: extremer Ausreißer → Wert liegt >3 Interquartilsabstände außerhalb)

In einer Zusatzanalyse wurde die Verteilung der prognostisch ungünstigen CTC-Zahl ≥ 5 in Abhängigkeit der Lebensqualitätskriterien untersucht.

Patienten, die in den letzten sieben Tagen keine Schmerzen hatten, zeigten in 25% der Fälle eine prognostisch ungünstige CTC-Zahl ≥ 5 . Bei Patienten mit häufigen Schmerzen stieg dieser Anteil auf 80%.

Patienten, die ihren Gesundheitszustand als insgesamt gut einstufen, hatten in keinem Fall eine prognostisch ungünstige CTC-Zahl ≥ 5 . Patienten hingegen, die ihren Gesundheitszustand als mittel oder schlecht einstufen, hatten einen Anteil einer prognostisch ungünstigen CTC-Zahl ≥ 5 von 65% beziehungsweise 100%.

Gaben die Befragten eine gute Lebensqualität an, lag der Anteil prognostisch ungünstiger CTC-Zahlen ≥ 5 bei 29%. Bei schlechter Lebensqualität stieg dieser auf 80%.

Wurde weder über Müdigkeit, Energielosigkeit oder verminderte Leistungsfähigkeit geklagt, hatte keiner der Patienten eine prognostisch ungünstige CTC-Zahl ≥ 5 . Patienten, die diese Fragen mit "sehr" beantworteten, hatten einen Anteil prognostisch ungünstiger CTC-Zahlen ≥ 5 von 70-81% (siehe Tab. 11).

Tab. 11: Anteil an CTCs ≥ 5 der verschiedenen Antwortmöglichkeiten

Frage	Anzahl	CTCs ≥ 5
<i>Verspürten Sie in den letzten sieben Tagen Schmerzen?</i>		
Überhaupt nicht	8	25%
Mäßig	19	68%
Sehr	5	80%
<i>Wie würden Sie selbst Ihren Gesundheitszustand einschätzen?</i>		
Gut	5	0%
Mittel	23	65%
Schlecht	4	100%
<i>Wie würden Sie selbst Ihre Lebensqualität einschätzen?</i>		
Gut	7	29%
Mittel	20	65%
Schlecht	5	80%
<i>Verspürten Sie in den letzten sieben Tagen Müdigkeit?</i>		
Überhaupt nicht	3	0%
Mäßig	22	64%
Sehr	7	71%
<i>Verspürten Sie in den letzten sieben Tagen ein Fehlen an Energie?</i>		
Überhaupt nicht	4	0%
Mäßig	12	50%
Sehr	16	81%
<i>Verspürten Sie in den letzten sieben Tagen eine verminderte Leistungsfähigkeit?</i>		
Überhaupt nicht	3	0%
Mäßig	19	63%
Sehr	10	70%

3.6.2 Assoziation der CTC-Zahl mit der objektiven Leistungsfähigkeit

Bei Abnahme der CTCs wurde jeder metastasierte Patient (n=55) durch den betreuenden Studienarzt entsprechend des ECOG-Status klassifiziert, um diesen nach Erhalt der Detektionsergebnisse mit der CTC-Zahl in Relation zu setzen. In unserer eingeschlossenen Studienkohorte wiesen 18 Patienten einen ECOG-Status von 0 auf, 22 Patienten einen ECOG-Status von 1 und 11 Patienten einen ECOG-Status von 2. Ein ECOG-Status von 3 wurde bei lediglich 4 Patienten festgelegt. Deshalb wurden die Patienten mit ECOG-Status 2 und 3 zusammengefasst (n=15).

Es zeigte sich bei den Patienten mit einem ECOG-Status von 0 eine mediane CTC-Zahl von 1 (Range 0-35 CTCs). Patienten mit einem ECOG-Status von 1 wiesen eine mediane CTC-Zahl von 10 auf (Range 0-225 CTCs) und bei einem ECOG-Status von 2 oder 3 eine mediane CTC-Zahl von 30 (Range 2-2438 CTCs) (siehe Abb. 12).

Im Vergleich der CTC-Zahlen mit den verschiedenen ECOG-Gruppen fand sich ein signifikanter Trend zugunsten höherer CTC-Zahlen in höheren Stadien des ECOG-Status ($p < 0,001$).

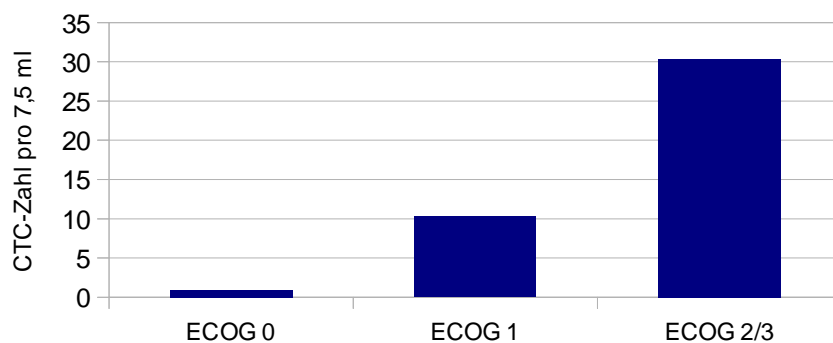


Abb. 12: Mediane CTC-Zahl in Abhängigkeit des ECOG-Status

3.7 Assoziation der CTC-Zahl mit dem Gesamtüberleben

Die Evaluation des Zusammenhangs zwischen dem Gesamtüberleben und der CTC-Detektion war ein Hauptziel dieser Studie.

Da bei den Patienten mit einem lokal fortgeschrittenen PC aufgrund einer Detektionsrate von 5% keine Assoziation der CTC-Zahl mit klinischen Parametern überprüft wurde und da alle Patienten dieser Kohorte noch leben, konnte in dieser Gruppe keine Analyse des Überlebens in Abhängigkeit der CTCs durchgeführt werden. Daher beziehen sich die folgenden Untersuchungen lediglich auf die Patienten mit einem mPC.

Die mediane Überlebenszeit betrug in der Kohorte der mPC-Patienten (n=55) 284 Tage (95% KI 187-381 Tage). Zum Zeitpunkt der Auswertung im Februar 2011 waren 31 der mPC-Patienten verstorben, dies entspricht 56%. Die mediane Überlebenszeit betrug bei den innerhalb des Beobachtungszeitraumes verstorbenen Patienten 143 Tage (Range 6-469 Tage) und es wurden im Median 22 CTCs (Range 0-2437 CTCs) detektiert. Im Vergleich dazu fanden sich bei den mPC-Patienten, die nach einer medianen Beobachtungszeit von 298 Tagen (Range 97-980 Tage) noch am Leben waren (n=24), im Median 1 CTC (Range 0-225 CTCs) (siehe Abb. 13).

Im Vergleich der Detektionsraten wurden bei den verstorbenen Patienten in 97% der Fälle CTCs beobachtet und eine prognostisch ungünstige CTC-Zahl ≥ 5 fand sich bei 77% der verstorbenen mPC-Patienten. Hingegen zeigten die lebenden Patienten eine geringere CTC-Detektionsrate von 67%, sowie eine CTC-Zahl ≥ 5 bei lediglich 33% der lebenden mPC-Patienten (siehe Abb. 13). Die daraufhin durchgeführte Cox Regressionsanalyse für die Kohorte der mPC-Patienten zeigte einen signifikanten Zusammenhang der CTC-Zahl mit dem Überleben ($p=0,021$).

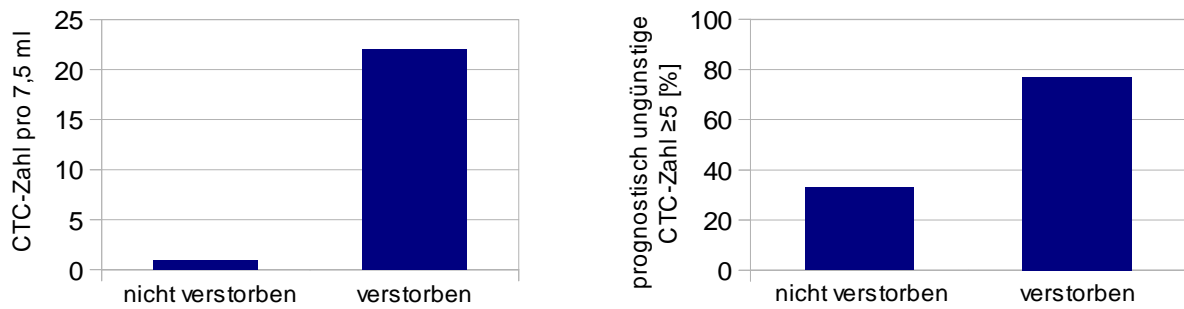


Abb. 13: Mediane CTC-Zahl und Anteil der prognostisch ungünstigen CTC-Zahl ≥ 5 in Abhängigkeit des Überlebens innerhalb des Beobachtungszeitraumes

In einer explorativen Analyse zeigten metastasierte Patienten, die innerhalb von 100 Tagen nach der CTC-Entnahme verstarben ($n=12$), im Median 30 CTCs (Range 1-2437 CTCs). Betrug dieser Zeitraum 101-299 Tage oder war der Endpunkt der Studie in diesem Zeitfenster erreicht ($n=26$), fanden sich im Median nur mehr 6 CTCs (Range 0-225 CTCs). Waren die Patienten nach mindestens 300 Tagen noch am Leben, beziehungsweise der Beobachtungszeitraum betrug mindestens 300 Tage ($n=16$), konnten im Median 5 CTCs nachgewiesen werden (Range 0-97 CTCs) (siehe Abb. 14).

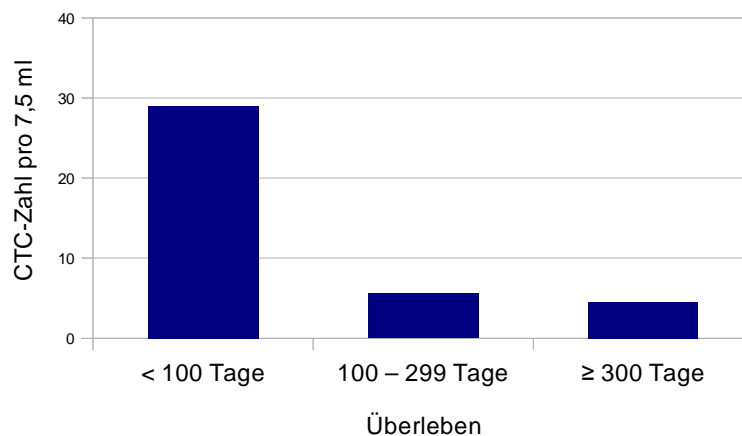


Abb. 14: Mediane CTC-Zahl in Bezug auf das Überleben

Somit konnte in unterschiedlichen Untersuchungsmodalitäten ein Zusammenhang der CTC-Zahl mit dem Gesamtüberleben beobachtet werden.

In der Literatur ist ein Schwellenwert von ≥ 5 CTCs als prognostisch ungünstiger Faktor in Bezug auf das Gesamtüberleben beschrieben [59]. Daher haben wir in unserer Kohorte diesen Schwellenwert in Bezug auf dessen klinische Anwendbarkeit überprüft. Es zeigte sich eine Sensitivität von 74% und eine Spezifität von 67% für den Schwellenwert ≥ 5 CTCs. Die Kaplan-Meier-Analyse zeigte bei mPC-Patienten, die weniger als 5 CTCs aufwiesen ($n=23$) eine signifikant längere Überlebenszeit als bei mPC-Patienten, die ≥ 5 CTCs hatten ($n=32$; $p=0,003$) (siehe Abb.15).

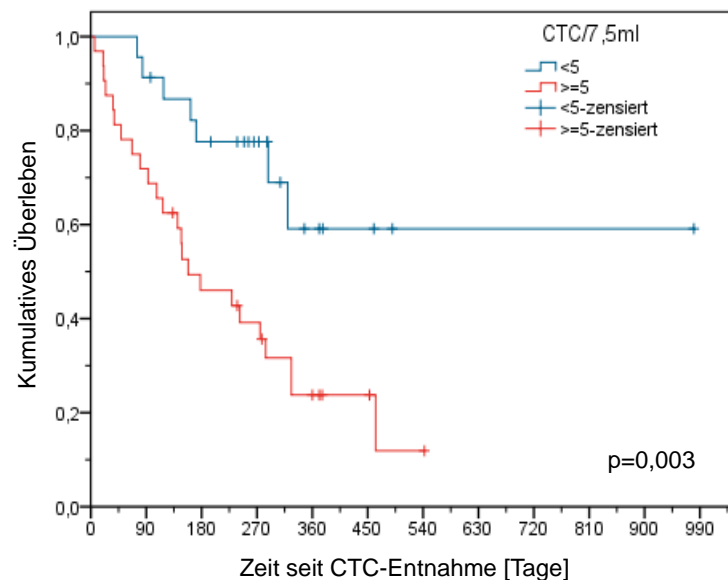


Abb. 15: Kaplan-Meier-Kurve für den Zusammenhang des Überlebens mit der CTC-Zahl bei mPC-Patienten: Patienten mit ≥ 5 CTCs ($n=32$) versus Patienten mit <5 CTCs ($n=23$)

In Bezug auf die Subgruppen des mPC (mCRPC und mTRPC) konnte eine signifikant längere Überlebenszeit bei Patienten mit weniger als 5 CTCs im Vergleich zu Patienten mit einer CTC-Zahl ≥ 5 zwar bei den mCRPC-Patienten aufgezeigt werden ($p=0,026$), nicht jedoch bei den mTRPC-Patienten ($p=0,054$; siehe Abb. 16).

Ergebnisse

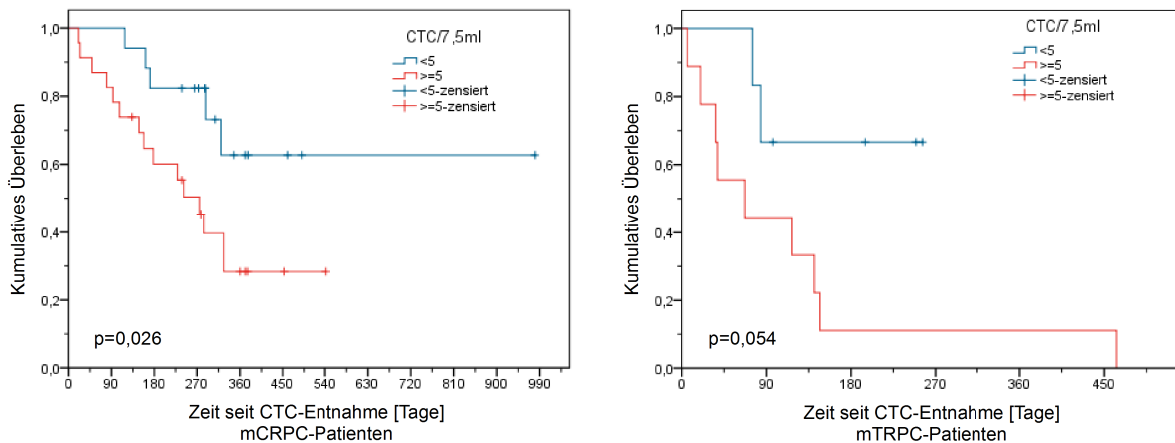


Abb. 16: Kaplan-Meier-Kurve für den Zusammenhang des Überlebens mit der CTC-Zahl bei mCRPC- und mTRPC-Patienten: Patienten mit ≥ 5 CTCs versus Patienten mit < 5 CTCs in den jeweiligen Subgruppen

Aus diesem Grund wurden eigene Berechnungen zur Erfassung eines für unsere Kohorte optimalen Schwellenwertes zur Prognoseabschätzung erstellt. Dabei ergab sich ein Schwellenwert von ≥ 3 CTCs mit einer Sensitivität von 87% und einer Spezifität von 67% (AUC 0,775; $p < 0,001$; 95% KI 0,6-0,9; siehe Abb. 17).

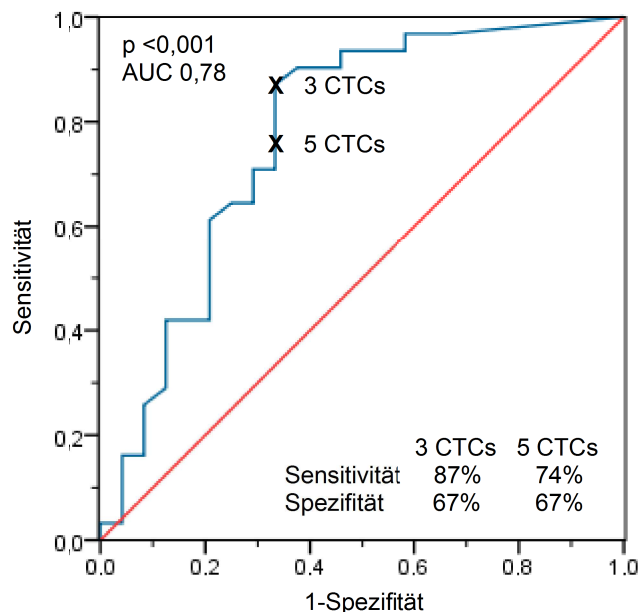


Abb. 17: ROC-Kurve zur Darstellung der Sensitivität und Spezifität der Schwellenwerte ≥ 3 CTCs und ≥ 5 CTCs als Prognosefaktor in Bezug auf das Überleben bei mPC-Patienten

Die Kaplan-Meier-Abschätzung für das Überleben zeigte eine signifikant kürzere Überlebenszeit für Patienten, die ≥ 3 CTCs pro 7,5 ml Vollblut aufwiesen ($n=35$), im Vergleich zu Patienten mit < 3 CTCs ($n=20$; $p=0,001$; siehe Abb. 18).

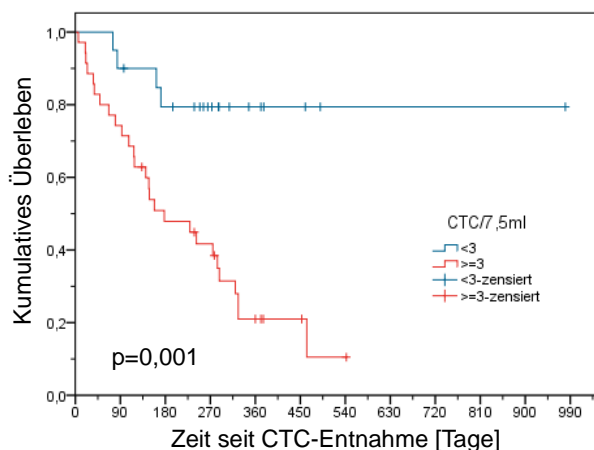


Abb. 18: Kaplan-Meier-Kurve für den Zusammenhang des Überlebens mit der CTC-Zahl bei mPC-Patienten: Patienten mit ≥ 3 CTCs ($n=35$) versus Patienten mit < 3 CTCs ($n=20$)

Wurden die Subgruppen mCRPC und mTRPC einzeln betrachtet, konnte zwar ein signifikanter Zusammenhang für den Schwellenwert von ≥ 3 CTCs und dem Überleben für die mCRPC-Patienten ($p=0,003$), nicht jedoch die mTRPC-Patienten ($p=0,054$) beobachtet werden (siehe Abb. 19).

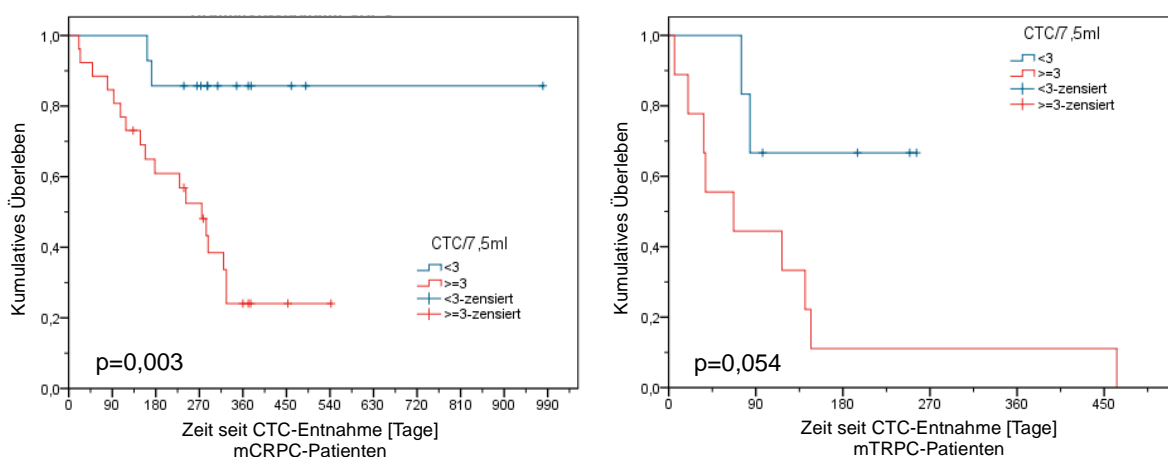


Abb. 19: Kaplan-Meier-Kurve für den Zusammenhang des Überlebens mit der CTC-Zahl bei mCRPC- und mTRPC-Patienten: Patienten mit ≥ 3 CTCs versus Patienten mit < 3 CTCs in den jeweiligen Subgruppen

4 DISKUSSION

4.1 Detektion zirkulierender Tumorzellen beim lokalisierten PC

Patienten mit einem lokal begrenzten PC wurde vor der retropubischen radikalen Prostatektomie eine Blutprobe zur Detektion zirkulierender Tumorzellen entnommen. Trotz eines deutlich erhöhten PSA-Wertes und eines lokal fortgeschrittenen Stadiums war die mediane CTC-Zahl auf dem Niveau von den gesunden Kontrollen. Folglich ergaben Korrelationsanalysen zwischen klinischen Parametern und den CTC-Zahlen keine signifikanten Zusammenhänge. Dies war insofern überraschend, da sich die Patienten am Übergang von einem lokalisierten zu einem metastasierenden Stadium des Prostatakarzinoms befanden und somit die Wahrscheinlichkeit klinisch inapparenter Mikrometastasen hoch war. Das mediane Progressionsrisiko in unserer Patientengruppe mit einem lokal fortgeschrittenen PC wurde anhand des Kattan Scores auf 90% beziffert. Zudem wurde in der Literatur über signifikant erhöhte CTC-Zahlen beim lokal begrenzten PC berichtet [60]. Ein Systemfehler, der die negativen Ergebnisse in unserer Kohorte erklären könnte, kann aufgrund regelmäßig durchgeführter Kontrollen ausgeschlossen werden. Zudem kamen auch andere Studien zu dem Ergebnis, dass mithilfe der immunomagnetischen CTC-Detektion durch das CSS bei LAPC-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen keine erhöhten CTC-Zahlen detektiert werden können [21].

Unseren Ergebnissen zufolge scheint das CSS für die Anwendung bei Patienten mit einem lokalisierten oder lokal fortgeschrittenen nicht metastasierten PC ungeeignet. Ob das Vorkommen von CTCs in diesem Kollektiv lediglich stochastisch ist oder in Langzeitbeobachtungen zu fortschreitenden Erkrankungen führt, ist derzeit noch ungeklärt.

4.2 Detektion zirkulierender Tumorzellen beim metastasierten PC

Im Folgenden wurde die CTC-Zahl bei Patienten mit einem mPC untersucht. Für unser Studienkollektiv konnte ein signifikanter CTC-Anstieg bei mPC-Patienten im Vergleich zu den Patienten mit einem lokal fortgeschrittenen PC (LAPC) nachgewiesen werden. Auch die Detektionsrate sowie der Anteil der Patienten mit einer prognostisch ungünstigen CTC-Zahl ≥ 5 zeigte einen deutlichen Anstieg, sodass sich unsere Ergebnisse in die bisherige Datenlage einfügen [20, 67].

In Subgruppenanalysen wurde anschließend untersucht, ob sich die CTC-Zahl von mCRPC- im Vergleich zu mTRPC-Patienten unterscheidet, was einen Anstieg im Fortschreiten der Tumorerkrankung bedeuten würde. Wiederum fanden sich in den einzelnen metastasierten Subgruppen eine signifikant erhöhte CTC-Zahl im Vergleich zu den LAPC-Patienten. Zugleich zeigte sich in unserem Patientenkollektiv eine Tendenz für steigende CTC-Zahlen von den mCRPC- zu den mTRPC-Patienten, jedoch ohne statistische Signifikanz. Bereits in vorherigen Studien wurde ein Zusammenhang steigender CTC-Zahlen mit der Anzahl an bereits durchgeführten Chemotherapien beschrieben [20, 33].

Zusammenfassend zeigt sich mit fortschreitenden Stadien des metastasierten Prostatakarzinoms ein Anstieg der CTC-Zahl, auch wenn in unserem Kollektiv die statistische Signifikanz verfehlt wurde.

4.2.1 Zusammenhang der CTC-Zahl mit dem Metastasierungsmuster

Die Erkenntnis, dass ein metastasiertes Tumorstadium meist die Voraussetzung für das Vorhandensein von CTCs im peripheren Blut ist, ließ die Frage aufkommen, ob auch die Art der Metastasierung in Bezug auf die CTC-Höhe eine Rolle spielt.

Die Assoziationsanalysen zeigten, dass Patienten mit alleiniger Weichgewebismetastasierung (lymphogen und/oder viszeral) bezüglich der CTC-Zahl keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den LAPC-Patienten oder der gesunden

Kontrollgruppe aufwiesen. Lagen bei den Patienten Skelettmetastasen oder zusätzlich Viszeralmetastasen vor, war die CTC-Zahl im Vergleich zu den Patienten ohne Metastasen beziehungsweise Patienten mit ausschließlich Weichgewebismetastasen signifikant erhöht.

Die niedrige Detektionsrate bei Patienten mit alleiniger Weichgewebismetastasierung stimmt mit den Ergebnissen der bestehenden Literatur überein [20, 33]. Zum Beispiel fand sich die höchste mediane CTC-Zahl bei alleiniger Knochenmetastasierung, eine kleinere mediane CTC-Zahl bei zusätzlich viszerale Metastasen und die niedrigste mediane CTC-Zahl bei alleiniger viszeraler Metastasierung [85]. Interessanterweise war in unserer Kohorte das Vorhandensein von viszerale Metastasen zusätzlich zu Knochenmetastasen ein Grund für weiter erhöhte CTC-Zahlen mit einem steigenden Anteil an prognostisch ungünstigen CTCs ≥ 5 im Vergleich zu Patienten mit ausschließlich ossären Läsionen. Obwohl Chen et al. zu dem Ergebnis kamen, dass weder Knochen- noch Weichgewebismetastasen das Vorhandensein von CTCs vorhersagen können [17], sind mehrere Arbeitsgruppen zu dem Erkenntnis gelangt, dass Skelettmetastasen eine Voraussetzung für das Vorhandensein von CTCs sind [20, 33, 67, 85]. Dies wurde auch durch CTC-Detektionsmethoden mit auf PCR basierenden Versuchsreihen belegt [46].

Die Gründe, warum CTCs vor allem bei ossären Läsionen zu finden sind, werden vielfach diskutiert. Möglicherweise werden CTCs im Knochen gebildet. Eine andere Theorie ist, dass die CTCs bei Lymphknoten- oder Viszeralmetastasen kein EpCAM exprimieren und somit mit dem CSS nicht detektierbar sind. Die Tatsache, dass der Metastasierungsweg bei Patienten mit ausschließlich Lymphknotenmetastasen über die Lymphabflusswege verläuft, bei Patienten mit Knochenmetastasen hingegen über das Blut [67] würde zwar die niedrigen Detektionsraten bei alleiniger Lymphknotenmetastasierung, nicht jedoch bei viszerale Metastasen erklären, da hier der Metastasierungsweg ebenfalls hämatogen erfolgt. Möglicherweise filtern Weichgewebismetastasen die CTCs heraus und werden in ein anderes Kompartiment als das Blut abgegeben [33].

Aufgrund unserer Ergebnisse in Zusammenschau mit bestehender Literatur scheint die Detektion zirkulierender Tumorzellen mit dem CSS besonders für Patienten mit ossären Metastasen mit oder ohne viszerale Filiae geeignet.

4.2.2 Zusammenhang der CTC-Zahl mit der ossären Tumormasse

Aufgrund der Beobachtung, dass CTCs vor allem dann auftreten, wenn Skelettmetastasen vorhanden sind, wäre eine Korrelation von CTCs mit dem prozentualen Anteil von metastatischen Läsionen am Gesamtskelett zu erwarten. Diesen Anteil beschreibt der Bone Scan Index (BSI), der für unsere Kohorte von einem Facharzt für Nuklearmedizin anhand der Skelettszintigraphie ermittelt wurde. Auf diese Weise konnte die ossäre Tumormasse quantifiziert werden, um einen Zusammenhang mit den CTC-Zahlen zu untersuchen. Die Korrelationsanalysen wurden bei Patienten mit ausschließlich Knochenmetastasen durchgeführt, zudem wurden dann auch Patienten mit zusätzlich viszeralen Metastasen in die Auswertung miteinbezogen. In beiden Fällen konnte kein signifikanter Zusammenhang von CTC-Zahl und ossärer Tumormasse nachgewiesen werden. Anhand des BSI ist es möglich, die Patienten in drei Prognosegruppen einzuteilen [48]. Auch in Bezug auf die BSI-Prognosegruppen konnte kein Zusammenhang mit der CTC-Zahl beobachtet werden. Ähnlich zu unserem Ergebnis fand auch Danila et al. eine nur schwache Korrelation zwischen den CTCs und dem BSI [20].

Zusätzlich zum BSI wurde in unserer Kohorte die Anzahl ossärer Läsionen (BLC) bestimmt. Diese wurden vom gleichen Facharzt für Nuklearmedizin für jeden Patienten mit Knochenmetastasen anhand der Bilder der Skelettszintigraphie berechnet, unabhängig von der Größe der einzelnen Läsionen. Wiederum wurden die Berechnungen zunächst für Patienten mit ausschließlich Skelettmetastasen durchgeführt, dann wurden auch Patienten mit zusätzlich viszeralen Läsionen miteinbezogen. In beiden Ansätzen konnte keine signifikante Korrelation zwischen BLC und der Höhe an CTCs nachgewiesen werden.

Fasst man die bisherigen Ergebnisse zusammen, ist der CTC-Nachweis zwar abhängig von Knochenmetastasen, nicht jedoch von dem Ausmaß der Metastasierung, unabhängig davon ob dieses anhand der betroffenen Fläche (BSI) oder der Anzahl an Läsionen (BLC) bestimmt wird. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass CTCs möglicherweise ein Marker der Tumoraktivität sein könnten.

4.2.3 Zusammenhang der CTC-Zahl mit Routinelaborparametern

Zeitgleich zur Probenentnahme für die CTC-Detektion wurde bei allen metastasierten Patienten standardmäßig eine Blutentnahme für die Bestimmung gängiger Laborparameter durchgeführt.

Bei mPC-Patienten konnte eine signifikant positive Korrelation der CTCs mit der AP und der LDH, sowie eine negative Korrelation mit dem Hb-Wert festgestellt werden. Kein signifikanter Zusammenhang fand sich zwischen den CTCs und dem Kalzium, dem Gesamteiweiß, dem Albumin, den Leukozyten sowie den Thrombozyten. Zudem konnte keine Korrelation von den PSA-Werten mit der CTC-Zahl nachgewiesen werden. Dies galt auch, wenn die Subgruppen mCRPC und mTRPC einzeln betrachtet wurden. Trotz fehlender Korrelation mit dem PSA-Wert, beobachteten wir in unserer Kohorte einen signifikanten Zusammenhang der CTC-Zahl mit der PSA-Verdopplungszeit, die aus allen PSA-Werten der letzten drei Monate mithilfe eines Kalkulators des *Memorial Sloan-Kettering Cancer Centers* berechnet wurde.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit bestehender Literatur, finden sich teilweise Übereinstimmungen, aber auch gegensätzliche Aussagen. Die Korrelation von CTCs mit der AP, der LDH und dem Hb-Wert wird bestätigt [17, 33]. Den PSA-Wert betreffend fand sich bisher jedoch eine mäßige [20] oder sogar eindeutige Korrelation mit der CTC-Zahl [17, 33].

Da niedrige Hb-Werte häufig Ausdruck einer fortgeschrittenen Tumorerkrankung sind [88], bestätigt die Korrelation von Hb-Wert und CTC-Zahl unsere bisherigen Ergebnisse bezüglich dem Zusammenhang zwischen höheren CTC-Zahlen und metastasierten Stadien. Ebenso unterstreicht die positive Korrelation der CTCs mit der AP den vermuteten Zusammenhang von CTC-Zahl und dem Vorliegen von Knochenmetastasen. Die AP liegt in hohen Konzentrationen in den für osteoplastische Metastasen typischen Osteoblasten vor. Die AP ist demnach als Marker der Osteoblastenaktivität und somit indirekt der ossären Metastasierung zu verstehen [74].

Ebenso wie die AP ist das Kalzium ein Parameter des Knochenstoffwechsels. Die fehlende Korrelation könnte durch eine Gegensteuerung des Körpers zur Vermeidung einer Hyperkalzämie bedingt sein, zum Beispiel durch vermehrte Ausscheidung oder verminderte Resorption, da die Serumkalziumkonzentration strengen Regulationsmechanismen unterliegt.

Eine steigende Serumkonzentration der normalerweise intrazellulär vorkommenden LDH spricht ebenfalls für einen Zellverfall, zum Beispiel im Rahmen einer malignen Erkrankung [10]. Eine positive Korrelation mit den CTCs passt daher gut zu dem Vorliegen einer Metastasierung.

Da die PSA-VZ einen Hinweis auf die Aktivität und Aggressivität des Tumors liefern kann [8], unterstreicht dieser Zusammenhang die Vermutung, dass die CTCs weniger mit der Tumorgroße als mit der intrinsischen Tumoraktivität in Zusammenhang stehen. Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass nach radikaler Prostatektomie eine PSA-VZ ≤ 4 Monate auf Fernmetastasen hindeutet [94].

4.2.4 Zusammenhang der CTC-Zahl mit Lebensqualität und Leistungsfähigkeit

Zu dem Zeitpunkt der Blutentnahme für die CTC-Detektion erfolgte durch den Studienarzt die Erhebung des ECOG-Status bei allen metastasierten Patienten. Dieser objektiviert die Leistungsfähigkeit der Patienten im Alltag und ist somit indirekt ein Indikator für die Lebensqualität. Im Gegensatz zu Olmos et al. zeigten sich in unserer Kohorte signifikant höhere CTCs bei steigendem ECOG-Status [67].

Um auch die subjektive Lebensqualität aus Sicht der Patienten in unsere Auswertung miteinbeziehen zu können, baten wir die Patienten, einen Fragebogen auszufüllen, der selektierte Fragen des QLQ-C30 Fragebogens enthielt. Ihre Antworten bezogen sich auf die letzten sieben Tage, die Bögen wurden am Tag der CTC-Entnahme ohne fremde Hilfe ausgefüllt. Hierbei zeigte sich, dass höhere CTC-Werte signifikant assoziiert sind mit Schmerz und einem selbst eingeschätzten schlechten Gesundheitszustand. Ebenso wurde eine strenge Assoziation der CTC-Zahl mit den Symptomen der Tumor-assoziierten Fatigue, nämlich fehlende Energie, Müdigkeit und verminderte Leistungsfähigkeit, beobachtet. Dieser Zusammenhang ist umso interessanter, da die Tumor-assoziierte Fatigue mit einer erhöhten Sterblichkeit verbunden ist [47]. Lediglich bei der Frage nach der selbst eingeschätzten Lebensqualität konnte kein signifikanter Zusammenhang mit den CTC-Zahlen nachgewiesen werden. Grund hierfür könnte der Einfluss sehr vieler Faktoren auf die persönliche Lebensqualität sein, wie zum Beispiel sozialer Rückhalt oder die eigene Erwartungshaltung.

Der statistische Zusammenhang zirkulierender Tumorzellen mit der Lebensqualität, die einerseits objektiv anhand des ECOG-Status und andererseits subjektiv anhand standardisierter Fragen erörtert wurde, ist, soweit bekannt, bisher nicht beschrieben.

4.3 CTC-Schwellenwert für den Nachweis eines metastasierten PC

Aufgrund der Tatsache, dass erst in bildmorphologisch nachweisbar metastasierten Stadien CTCs nachweisbar sind, stellte sich die Frage nach einem Schwellenwert, der die Wahrscheinlichkeit für Metastasen prognostiziert. Dieser Frage gingen in ähnlicher Weise bereits Goodman et al. nach und legten einen Schwellenwert von 4 CTCs pro 7,5 ml fest, der für radiologisch nachweisbare Metastasen von 100 mCRPC-Patienten mit einer Sensitivität von 61% und einer Spezifität von 100% prognostisch sei [33]. In unserer Kohorte mit lokal begrenzten und metastasierten PC-Patienten umfasste die Bildgebung neben der Computertomographie zusätzlich die Skelettszintigraphie. Diese für Knochenmetastasen sensitivere Methode könnte ein Grund für die Differenz zu unseren Ergebnissen sein. Die ROC-Analysen ergaben einen Schwellenwert von lediglich 0,6 CTC pro 7,5 ml für das Vorhandensein von Metastasen in der Bildgebung mit einer Sensitivität von 84% und einer Spezifität von 95%. Unser Ergebnis stellt das früher festgelegte Niveau von 1 CTC pro 7,5 ml bei gesunden Kontrollen in Frage [17, 60]. 1 CTC pro 7,5 ml wurde bei etwa 20% der Gesunden oder Patienten mit einem lokalisierten PC ohne weitere klinische Auswirkung beschrieben [21].

Zusammenfassend ergibt sich kein eindeutiger Ansatz für die Festsetzung eines Schwellenwertes. Dieses Ergebnis könnte eine Folge unserer Patientenselektion sein. Auch war die Studienkohorte nicht groß genug, um einen exakten Schwellenwert bestimmen zu können. Es sind daher weitere Untersuchungen erforderlich, um zukünftig bei neu diagnostiziertem PC gegebenenfalls eine prognostische Aussage oder sogar eine individualisierte Therapieentscheidung treffen zu können.

4.4 Prognostische Bedeutung der CTC-Zahl

Ob zirkulierende Tumorzellen für die Überlebensdauer prognostische Bedeutung in den verschiedenen Stadien des PC haben, war die leitende Fragestellung in dieser Studie. Da lediglich in den metastasierten Stadien CTCs regelhaft nachgewiesen wurden, beschränkten sich die Assoziationsanalysen zwischen den CTCs und dem Überleben auf die metastasierte Patientengruppe. Der Beobachtungszeitraum begann an dem Tag der Blutentnahme für die CTC-Detektion und endete am 14. Februar 2011, beziehungsweise am Tag des Todes, falls dieser vorher eintrat. Für unser Studienkollektiv konnte ein signifikanter Zusammenhang der CTC-Zahl mit dem Überleben nachgewiesen werden. Sowohl die Detektionsraten als auch die Anzahl an prognostisch ungünstigen CTCs ≥ 5 waren bei den Patienten, die nach dem Beobachtungszeitraum noch am Leben waren, niedriger als bei den Patienten, die vorher verstarben. Anschließend wurde der Beobachtungszeitraum in drei Intervalle aufgeteilt. Es zeigte sich ein deutlicher Trend hin zu größeren CTC-Zahlen bei kürzeren Überlebenszeiten. Unsere Ergebnisse werden bestätigt durch andere Studien, die ebenfalls einen signifikanten Zusammenhang zwischen CTCs und Überleben beim mPC ermittelt haben [33, 65, 67].

Obwohl die CTCs als stetige Variable vorgeschlagen wurden, die mit erhöhtem Risiko zu sterben oder reduziertem Gesamtüberleben korrelieren [20, 85], etablierte sich letztendlich ein Schwellenwert von ≥ 5 CTCs pro 7,5 ml als ungünstiger Prognoseparameter in Anlehnung an die FDA-Zulassung des CSS [22]. Dieser Schwellenwert wurde in einigen Studien, die hormonsensitive PC-Patienten [65] und mCRPC-Patienten [20, 65, 67] einschlossen, bestätigt. Für unsere Patienten mit einem mPC ergab sich bei größtmöglicher Sensitivität und zugleich Spezifität ein Schwellenwert von ≥ 3 CTCs pro 7,5 ml als prognostisch ungünstig. Metastasierte Patienten unserer Studienkohorte mit ≥ 3 CTCs hatten eine signifikant kürzere Überlebenszeit im Vergleich zu Patienten mit < 3 CTCs. Auch Goodman et al. schlug einen Schwellenwert von 3 CTCs pro 7,5 ml vor, jedoch für Patienten im hormonsensitiven Stadium [34]. Dennoch sprechen unsere Ergebnisse für CTCs als stetige Variable in Bezug auf das Gesamtüberleben bei

mPC-Patienten. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Goodman et al. überein, wo ein Intervall von 2 bis 5 CTCs mit einem optimalen Wert von 4 CTCs für mCRPC-Patienten als Schwellenwert angegeben wurde [33].

Durch diese Arbeit konnte belegt werden, dass zwischen den CTCs und dem Überleben ein signifikanter Zusammenhang besteht. Die CTC-Detektion eignet sich somit als Prognoseparameter bei der Behandlung des mPC. Ob und in welcher Höhe die Etablierung eines Schwellenwertes sinnvoll ist oder CTCs doch eher als stetige Größe zu verstehen sind, muss in weiteren Studien evaluiert werden.

4.5 Kritische Betrachtung des *CellSearch®* Systems

Das *CellSearch®* System der Firma Veridex ist das einzige von der FDA zugelassene Verfahren zur Detektion zirkulierender Tumorzellen. Trotz der nachgewiesenen prognostischen Bedeutung der CTC-Zahl müsste die tatsächliche Anzahl der CTCs um ein vielfaches höher sein als die gefundene Anzahl mit dem CSS. Dies wird dadurch verdeutlicht, dass etwa 0,01% der CTCs in der Lage sind, Knochenmetastasen zu verursachen und dass mindestens 10000 CTCs nötig sind, um eine Metastase zu bilden [29, 53].

Ein Grund für die relativ geringe Anzahl an detektierten CTCs könnte ein Verlust von CTCs während der Anreicherung sein [70]. Eine weitere Schwierigkeit besteht in der Wahl des richtigen Markers. Dabei handelt es sich bei der immunomagnetischen Selektion unter anderem um einen Antikörper, der an ein Oberflächenmolekül bindet. Die Zielstruktur sollte auf möglichst allen Tumorzellen, nicht jedoch auf physiologischen Blutbestandteilen vorkommen, um einerseits eine hohe Detektionsrate und andererseits wenige falsch positive Ergebnisse zu erzielen. EpCAM erfüllt diese Anforderung weitestgehend. Es handelt sich dabei um ein Glykoprotein, das auf Zellen epithelialen Ursprungs, nicht jedoch auf Zellen mesenchymalen Ursprungs vorkommt [4]. Auf Tumorzellen unter anderem der

Prostata wird EpCAM sogar häufig überexprimiert [62]. Histochemische Untersuchungen des Oberflächenmoleküls zeigten eine Expression von 100% in Geweben eines hormonsensitiven PC und von 98% in Geweben eines mCRPC [95]. In LNCaP-Zelllinien, welche mäßiges Metastasierungspotential aufweisen, fand sich mit einem EpCAM-Antikörper eine Detektionsrate bis 95%. Für die PC3-Zelllinie mit hohem Metastasierungspotential sank die Detektionsrate auf 69% [65, 79]. Diese Versuche legen die Vermutung nahe, dass es mit Zunahme des Metastasierungspotentials zu einer Abnahme der EpCAM-Expression kommen könnte. Da es sich bei EpCAM um ein Adhäsionsmolekül handelt, würde dies die These des epithelial-mesenchymalen Übergangs als Voraussetzung für eine Streuung des Tumors stützen. Diese besagt, dass durch Ablösung einzelner Zellen vom Primärtumor als Folge eines Verlustes von Zelladhäsionsmolekülen ein Übertritt dieser Zellen in die Blut- und Lymphbahnen ermöglicht wird. Eine Hormontherapie kann ebenfalls zu einer Herabregulation der jeweiligen Zielstruktur führen [70]. Demnach ist damit zu rechnen, dass jedes Krankheitsstadium einen anderen idealen Marker erfordert. Ansonsten besteht die Gefahr, die aggressivsten Tumorzellen aufgrund fehlender oder herabregulierter Expression der Zielstruktur nicht detektieren zu können [51, 93].

Eine weitere Fehlerquelle des Systems ist, dass lediglich ein geringer Anteil des gesamten Blutvolumens untersucht wird, nämlich 7,5 ml Vollblut. Dies entspricht ca. 0,15% des gesamten Blutvolumens einer durchschnittlichen Person [2]. Zudem ist ungewiss, ob sich die Tumorzellen gleichmäßig im Blut des Patienten verteilen und somit das Ergebnis einer einzelnen Blutprobe repräsentativ ist. Es wird diskutiert, ob nicht zum Beispiel das Knochenmark ein wichtiges Reservoir für CTCs darstellt, von wo aus CTCs dann aufgrund besserer Wachstumsbedingungen in andere Organe streuen [69].

Trotzdem weist das CSS gegenüber einer anderen gängigen Methode zur CTC-Detektion, der PCR, entscheidende Vorteile auf. Bei der PCR wird gezielt nach bestimmten Genabschnitten auf der Erbinformation der Zellen gesucht. Zwar hat die PCR im Vergleich zu anderen Verfahren eine enorm hohe Sensitivität, nämlich

eine Tumorzelle in bis zu 10^8 zellkernhaltigen hämatopoetischen Zellen [32]. Gleichzeitig liegt hierin jedoch der größte Nachteil, da die falsch positiv Rate sehr hoch ist [35]. Dies kann zum Beispiel an der ektopen Transkription liegen, was in diesem Fall bedeutet, dass manche Nichttumorzellen ein bestimmtes tumorzellenspezifisches Gen zwar tragen und transkribieren, das jeweilige Antigen jedoch nie gebildet wird und es somit keine Relevanz für zelluläre Funktionen hat. Dies trifft auf jede 500. bis 1000. Nichttumorzelle zu [76]. Des Weiteren gibt es kein einheitliches Verfahren und jedes Labor verwendet andere Reagenzien, weshalb die Ergebnisse letztendlich nicht vergleichbar sind.

Moreno et al. präsentierten eine exzellente Korrelation zwischen hinzugefügten und gefundenen Tumorzellen mit dem CSS [60]. In Versuchen mit kultivierten Tumorzellen konnte mit dem CSS eine hohe Sensitivität, Linearität und Reproduzierbarkeit nachgewiesen werden. Mit dem CSS konnten über 85% der zuvor in Blutproben gegebenen kultivierten Tumorzellen detektiert werden [2]. De Bono et al. konnten mithilfe des CSS vergleichsweise höhere Detektionsraten verbuchen als mit der Realtime-PCR mit PSA-messenger-RNA [22]. Der vermutlich größte Vorteil der IMS gegenüber der PCR ist aber, dass nicht Gene, und somit sowohl lebende als auch tote Zellen, sowie freie DNA nachgewiesen werden [70]. Lediglich Zellen, die bestimmte Kriterien erfüllen, werden als CTC gewertet. Dies verringert zum einen die falsch positiv Rate, zum anderen sind Aussagen über Morphologie und besondere Merkmale der Tumorzellen möglich. Dennoch unterliegt gerade dieser Arbeitsschritt des CSS in gewisser Weise der Subjektivität des auswertenden Mitarbeiters trotz standardisierter Kriterien. Es konnte aber gezeigt werden, dass Detektionsraten mehrerer Proben einer Person sowohl im gleichen Labor als auch in verschiedenen Laboratorien sehr ähnlich waren [82], was auf die Schulung der Mitarbeiter und die strengen Kriterien, wann es sich um eine CTC handelt, zurückzuführen ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die CTC-Detektion mittels *CellSearch® System* zwar ein zeitaufwändiger und somit teurer Prozess ist, es aber aufgrund der guten Reliabilität, Objektivität und Validität als derzeitiges

Standardverfahren durchaus seine Berechtigung hat. Von Vorteil erscheint jedoch die Hinzufügung weiterer Detektionsmarker, zum Beispiel Antikörper gegen das PSA oder prostataspezifisches Membran Antigen, um einen etwaigen EpCAM-Verlust auszugleichen.

4.6 Kritische Betrachtung der Studie

Der wohl größte Kritikpunkt an dieser Arbeit ist das relativ kleine Patientenkollektiv. Besonders deutlich wurde dies in den Subgruppenanalysen, zum Beispiel bei der Einteilung der Patienten nach der Metastasierungsart.

Ein weiterer Kritikpunkt an dieser Studie sind die in Ausnahmefällen langen Zeiten von der CTC-Entnahme bis zur Bildgebung von bis zu sechs Wochen bei der Skelettszintigraphie und sieben Wochen bei der Computertomographie, was die Aussage der Korrelationsergebnisse einschränkt. Ein Grund hierfür war der oft schlechte Gesundheitszustand der mTRPC-Patienten, weshalb in manchen Fällen auf ein unmittelbares Staging verzichtet und auf bereits vorliegende Bildbefunde zurückgegriffen wurde.

Auch die Tatsache, dass zur Berechnung der PSA-Verdopplungszeit PSA-Werte verwendet wurden, die in anderen Laboren und möglicherweise anhand anderer Methoden ermittelt wurden, ist als Kritikpunkt zu werten.

Zudem muss erwähnt werden, dass für die Assoziationsanalysen der subjektiven Lebensqualität sowie der objektiven Leistungsfähigkeit anhand des ECOG-Status keine multifaktoriellen Analysen durchgeführt wurden. Das bedeutet, dass mögliche Einflussfaktoren auf hohe CTC-Zahlen wie Metastasierungsart und Metastasierungsausmaß nicht berücksichtigt wurden. In unserer Auswertung haben wir uns lediglich auf das Blickfenster der CTCs und der Lebensqualität konzentriert.

Der Verzicht auf eine multivariate Auswertung galt auch für die Evaluation des Gesamtüberlebens aufgrund der kleinen Fallzahl. Außerdem wurden eventuelle Folgetherapien nicht berücksichtigt, weshalb eine Beurteilung des progressionsfreien Überlebens nicht möglich war.

Trotz der Schwierigkeiten, welche vor allem in der relativ kleinen Studienkohorte begründet liegen, fügen sich die Ergebnisse dennoch fortführend in die bereits bestehende Literatur ein.

4.7 Ausblick

Unsere Ergebnisse bestätigen, dass das CSS aufgrund des zumeist fehlenden CTC-Nachweises keine Anwendung für das lokal begrenzte PC finden kann. Dies kann darin begründet sein, dass in diesem Stadium keine CTCs im peripheren Blut existieren. Die Tatsache, dass mithilfe von Mikrochiptechnologie auch beim lokal begrenzten PC hohe Detektionsraten erreicht werden [62] spricht jedoch für eine unzureichende Sensitivität des CSS in lokal begrenzten Tumorstadien. Soll das CSS in Zukunft Anwendung beim lokal begrenzten PC finden, muss das Verfahren überarbeitet werden. Die Sensitivität könnte zum Beispiel durch den Einsatz zusätzlicher spezifischer Antikörper gesteigert werden.

Anders verhält es sich bei Patienten mit einem metastasierten PC, wo regelhaft mit dem CSS CTCs detektiert wurden. So konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von Skelettmetastasen und CTCs gezeigt werden. Die mit einer schlechten Prognose assoziierten Knochenmetastasen entwickeln 85% der mPC-Patienten im Laufe ihrer Erkrankung [70]. Zugleich sind radiologische Methoden oft nicht sensitiv genug, um diese frühzeitig darzustellen [22, 68]. Diese Patienten gilt es jedoch so früh wie möglich zu erkennen, um therapeutische Schritte einleiten zu können. Unser Ergebnis zeigt, dass die Detektion von CTCs hierfür grundsätzlich ein richtiger Weg sein kann.

Der große Vorteil der IMS mit dem CSS gegenüber anderer Methoden zur CTC-Detektion ist das Vorliegen von intakten, manchmal sogar lebenden Tumorzellen am Ende der Prozedur. Der nächste Schritt liegt nun darin, mithilfe molekularer Analysen die Biologie des Tumors anhand dieser Zellen zu erforschen. So könnten wertvolle Informationen zur Beurteilung der Erkrankung gewonnen werden, wie zum Beispiel die Progressionstendenz oder die Langzeitprognose [69]. Mithilfe von CTCs könnten weitere Zielstrukturen als Angriffspunkt neuer Medikamente erforscht werden. So haben Target-Therapien mit EpCAM in klinischen Studien bereits Anwendung gefunden. Das Ziel ist eine hochindividuelle Therapie, die exakt den Eigenschaften des Tumors angepasst werden kann.

Neben den CTCs als Screening- und Prognoseparameter muss der Nutzen als Verlaufparameter evaluiert werden. Hierfür läuft in unserem Institut bereits eine Studie, die klären soll, wie sich die zirkulierenden Tumorzellen im Verlauf einer Chemotherapie bei Patienten mit einem hormonrefraktären PC verhalten. Wichtiger Endpunkt der Studie ist die Evaluation der CTCs als Marker für das Frühansprechen der Chemotherapie.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In Europa erkrankt jeder dritte Bürger an Krebs. Die dabei häufigste Tumorentität der männlichen Bevölkerung Deutschlands ist mittlerweile das Prostatakarzinom. Die Nachfrage bezüglich neuer Marker für Früherkennung, Stadieneinteilung, Verlaufskontrolle und Prognose ist demnach hoch. Zirkulierende Tumorzellen sind schon lange bekannt und gelten als Voraussetzung für invasives und metastasierendes Tumorverhalten. Nachdem die zirkulierenden Tumorzellen bei der Therapie des Mammakarzinoms bereits klinische Anwendung finden, haben sie bezüglich des Prostatakarzinoms den Einzug in den klinischen Alltag noch nicht erreicht. Ziel dieser Studie war die Evaluation der zirkulierenden Tumorzellen in den verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms unter Miteinbeziehen klinischer Parameter, der Metastasierungsart und Metastasenlast in metastasierten Stadien, der Lebensqualität sowie die Nutzbarkeit der zirkulierenden Tumorzellen als Prognoseparameter. Hierfür wurde ein Studienkollektiv bestehend aus 15 gesunden Kontrollen, 20 Patienten mit einem lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinom, 40 Patienten mit einem metastasierten kastrationsrefraktären Prostatakarzinom und 15 Patienten mit einem metastasierten taxanrefraktären Prostatakarzinom auf zirkulierende Tumorzellen untersucht. Diese wurden mithilfe des *CellSearch® Systems* durch immunomagnetische Selektion detektiert.

Zu den Ergebnissen zählt, dass das *CellSearch® System* in lokal begrenzten Stadien des Prostatakarzinoms nicht anwendbar ist, da nur bei einem Patienten mit einem lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinom eine zirkulierende Tumorzelle detektiert wurde. Ansonsten entsprach die Detektionsrate der der gesunden Kontrollgruppe. Anders verhielt es sich bei den Patienten mit einem metastasierten Prostatakarzinom, wo eine Detektionsrate von 84% erreicht wurde. Assoziationsanalysen zeigten einen Zusammenhang von zirkulierenden Tumorzellen mit dem Vorhandensein von ossären und viszerale Metastasen, ohne dabei eine Aussage über die Metastasenlast zu erlauben. Die einerseits fehlende Korrelation mit der Tumorlast und die andererseits positive Korrelation mit der PSA-Verdopplungszeit

ließen uns darauf schließen, dass durch die Höhe an detektierten Zellen eine Einsicht in die intrinsische Tumorbilogie denkbar ist. Möglicherweise spiegeln die zirkulierenden Tumorzellen die Tumoraktivität wider. Darauf weist auch der in dieser Arbeit nachgewiesene Zusammenhang der zirkulierenden Tumorzellen mit der Laktatdehydrogenase und der alkalischen Phosphatase hin, die im Blut von Patienten mit viszeralen und ossären Metastasen erhöht vorliegen können. Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit ist der Zusammenhang der zirkulierenden Tumorzellen mit der Lebensqualität bei metastasierten Prostatakarzinompatienten. Die Assoziation konnte zum einen für die objektive Lebensqualität anhand des ECOG-Status, zum anderen bezüglich der subjektiven Lebensqualität mit Schmerzen, dem selbst eingeschätzten Gesundheitszustand und der Tumorassoziierten Fatigue aufgezeigt werden. Ein Hauptziel dieser Studie war die Evaluation der zirkulierenden Tumorzellen als prognostischer Marker für das Gesamtüberleben. Es konnte gezeigt werden, dass bei einem Schwellenwert von 3 zirkulierenden Tumorzellen das Überleben signifikant verkürzt war im Vergleich zu Patienten mit weniger als 3 zirkulierenden Tumorzellen. Somit stellen die zirkulierenden Tumorzellen für Patienten mit einem metastasierten Prostatakarzinom einen geeigneten Prognoseparameter dar.

Zusammenfassend konnte unsere Studie trotz einer relativ kleinen Patientenkohorte Belege dafür liefern, dass zirkulierende Tumorzellen als bedeutsamer molekularer Marker für Tumoraktivität und Prognose, der zudem im klinischen Alltag gut einsetzbar ist, geeignet sind. Unsere Daten stehen in Einklang mit früher veröffentlichten Ergebnissen, die letztendlich in den USA zur Zulassung des *CellSearch® Systems* für das metastasierte Prostatakarzinom geführt haben. Für die Zukunft gilt es, die Informationen, die man aus den zirkulierenden Tumorzellen gewinnen kann, für die Entwicklung neuer hochindividueller Therapieansätze zu nutzen, um die Heilungschancen des häufigsten Tumors der männlichen westlichen Bevölkerung weiter zu verbessern.

6 ABSTRACT ZUR PUBLIKATION DIESER ARBEIT

Purpose To explore circulating tumor cell (CTCs) counts in different stages of prostate cancer (PC) in association with tumor burden, metastatic pattern and conventional serum biomarkers. Overall survival (OS) analyses were conducted with respect to optimized CTC cutoff levels.

Methods CTC-counts were assessed in healthy controls (n=15) as well as in locally advanced high risk (LAPC, n=20), metastatic castration resistant (mCRPC, n=40) and taxan refractory (mTRPC, n=15) PC patients. CTCs were detected using the CellSearch™ System.

Results In mPC CTC-counts were significantly increased compared to LAPC (p<0.001). In LAPC CTCs were at control level (p=0.66). Patients with both bone and visceral lesions revealed the highest median CTCcount (p=0.004) whereas patients with sole soft tissue metastases displayed CTC-counts comparable to controls (p=0.16). No correlation was observed between CTC-counts and osseous tumor burden assessed by bone lesion count (p=0.54) or bone scan index (p=0.81). CTC-counts revealed a positive correlation with alkaline phosphatase (p<0.001) and lactate dehydrogenase (p<0.001) as well as a negative association with hemoglobin (p=0.004) and PSA-doubling time (p=0.01). Kaplan-Meier analyses demonstrated a cohort adjusted cutoff level of 3 CTCs with a shorter OS in case of ≥3 CTCs compared to <3 CTCs (p=0.001), a cutoff level applicable in mCRPC- (p=0.003) but not in mTRPC-patients (p=0.054).

Conclusions CTC-counts are applicable as a prognostic molecular marker especially in mCRPC-patients harbouring bone metastases with or without visceral metastases. For clinical practice mPC patients with elevated CTC-counts in combination with short PSA-DT, high AP- and LDH-levels as well as low hemoglobin levels are at high risk of disease progression and limited OS.

Keywords Biomarkers; CellSearch™ System; Circulating tumor cells; CTCs; Prostate cancer; Immunomagnetic capture.

7 PUBLIKATIONEN IM ZUSAMMENHANG DIESER ARBEIT

Wissenschaftlicher Preis

Posterpreis der Bayerischen Urologenvereinigung und der Österreichischen Gesellschaft für Urologie und Andrologie: *Immunomagnetische Isolation zirkulierender Tumorzellen beim Prostatakarzinom - Prognostische Bedeutung und Assoziation zu klinischen Tumorcharakteristika*. Nürnberg 2012.

Wissenschaftliche Publikationen in Fachjournalen

Thalgott MK, Rack B, Maurer T, Souvatzoglou M, Eiber M, **Kreß V**, Heck M, Andergassen U, Nawroth R, Gschwend JE, Retz M. *Detection of circulating tumor cells in different stages of prostate cancer*. J Cancer Res Clin Oncol 2013 May;139(5):755-63.

Vorträge und Posterpräsentationen

Thalgott MK, Maurer T, Rack B, Souvatzoglou M, Eiber M, Heck M, **Kreß V**, Andergassen U, Nawroth R, Gschwend JE, Retz M. *Detektion zirkulierender Tumorzellen (CTC) beim Prostatakarzinom - Prognostische Bedeutung und Assoziation zu klinischen Stagingparametern*. DGU Leipzig 2012.

Thalgott MK, Maurer T, Heck M, Souvatzoglou M, Eiber M, **Kreß V**, Rack B, Nawroth R, Gschwend JE, Retz M. *Immunomagnetische Isolation zirkulierender Tumorzellen beim Prostatakarzinom - Prognostische Bedeutung und Assoziation zu klinischen Tumorcharakteristika*. BayÖ Nürnberg 2012.

Thalgott MK, Andergassen U, **Kreß V**, Kronester C, Nawroth R, Rack B, Maurer T, Heck M, Horn T, Hauner K, Gschwend JE, Retz M. *Quantitative Detektion zirkulierender Tumorzellen (CTC) zum Monitoring der Chemotherapie beim Prostatakarzinom*. DGU Düsseldorf 2010.

Thalgott MK, Andergassen U, Kronester C, **Kreß V**, Nawroth R, Rack B, Maurer T, Heck M, Horn T, Gschwend JE, Retz M. *Pilotstudie zum Therapiemonitoring des Prostatakarzinoms mit der quantitativen Detektion zirkulierender Tumorzellen (CTC)*. BayÖ München 2010.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] **Adolfsson** J. Deferred treatment of low grade stage T3 prostate cancer without distant metastases. *J Urol* 1995;149:326-328.
- [2] **Allard** WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, Tibbe AGJ, Uhr JW, Terstappen LWMM. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clinical Cancer Research* 2004 Oct;10:6897-6904.
- [3] **Ashworth** TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aust Med J* 1869;14:146-149.
- [4] **Balzar** M, Winter MJ, de Boer CJ, Litvinov SV. The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med* 1999;77:699-712.
- [5] **Biedermann** B, Pless M, Herrmann R. Chemotherapy in hormone refractory prostatic carcinoma. *Dtsch Med Wochenschr.* 1999 Jul 16;124(28-29):874-9.
- [6] **Boccon-Gibod** L, Djavan WB, Hammerer P, Hoeltl W, Kattan MW, Prayer-Galetti T, Teillac P, Tunn UW. Management of prostate-specific antigen relapse in prostate cancer: a European Consensus. *Int J Clin Pract* 2004 Apr;58(4):382-90.
- [7] **Börgermann** C, Loertzer H, Hammerer P, Fornara P, Graefen M, Rübben H. Problems, objective, and substance of early detection of prostate cancer. *Urologe A* 2010 Feb;49(2):181-9.
- [8] **Börgermann** C, Rübben Herbert. Deutsches Ärzteblatt: Früherkennung des Prostatakarzinoms. Cme.aerzteblatt.de/kompakt 2009(2):40a.
- [9] **Breslow** N, Chan CW, Dhom G, Drury RAB, Franks LM, Gellei B, Lee YS, Lundberg S, Sparke B, Sternby NH, Tulinius H. Latent carcinoma of prostate at autopsy in seven areas. The international Agency for Research on Cancer, Lyons, France. *Int J Cancer* 1977 Nov;20(5):680-8.
- [10] **Bruhn** HD, Junker R, Schäfer H, Schreiber S. *Labormedizin, Indikationen, Methodik und Laborwerte, Pathophysiologie und Klinik.* Schattauer Verlag, 3., überarb. Auflage 2011, Seite 91-92.
- [11] **Brunner** A, Prelog M, Verdorfer I, Tzankov A, Mikuz G, Ensinger C. EpCAM is predominantly expressed in high grade and advanced stage urothelial carcinoma of the bladder. *J Clin Pathol* 2008;61:307-310.
- [12] **Budd** GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, Stopeck A, Borden E, Miller MC, Matera J, Repollet M, Doyle GV, Terstappen LW, Hayes DF. Circulating tumor cells versus imaging-predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2006 Nov 1;12(21):6403-9.
- [13] **Carter** BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 Apr;89(8):3367-71.
- [14] **Carter** HB, Kettermann AE, Ferrucci L, Landis P, Trock BJ, Metter EJ. Prostate specific antigen testing among the elderly; when to stop? *J Urol* 2008 Apr;174(2)(Suppl 1):600 abstract #1751.
- [15] **Carvalho** GF, Smith DS, Mager DE, Ramos C, Catalona WJ. Digital rectal examination for detecting prostate cancer at prostate specific antigen levels of 4 ng/ml or less. *J Urol* 1999 Mar;161:835-9.

- [16] **Catalona** WJ, Richie JP, Ahmann FR, Hudson MA, Scardino PT, Flanigan RC, deKernion JB, Ratliff TL, Kavoussi LR, Dalkin BL, et al. Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *J Urol* 1994 May;151(5):1283-90.
- [17] **Chen** BT, Loberg RD, Neeley CK, O'Hara SM, Gross S, Doyle G, Dunn RL, Kalikin LM, Pienta KJ. Preliminary study of immunomagnetic quantification of circulating tumor cells in patients with advanced disease. *Urology* 2005;65(3):616-21.
- [18] **Colombo** C, Rolfo F, Maggi G. Further research on the isolation of tumor cells from circulating blood. *Minerva med.* 1959 Jul 7;50:2217-23.
- [19] **D'Amico** AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, Broderick GA, Tomaszewski JE, Renshaw AA, Kaplan I, Beard CJ, Wein A. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA* 1998 Sep;280(11):969-74.
- [20] **Danila** DC, Heller G, Gignac GA, Gonzalez-Espinoza R, Anand A, Tanaka E, Lilja H, Schwarzt L, Larson S, Fleisher M, Scher HI. Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13(23):7053-8.
- [21] **Davis** JW, Nakanishi H, Kumar VS, Bhadkamkar VA, McCormack R, Fritsche HA, Handy B, Gornet T, Babaian RJ. Circulating tumor cells in peripheral blood samples from patients with increased serum prostate specific antigen: initial results in early prostate cancer. *J Urol.* 2008 Jun;179(6):2187-91.
- [22] **De Bono** JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, Doyle GV, Terstappen LW, Pienta KJ, Raghavan D. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2008 Oct 1;14(19):6302-9.
- [23] **De Bono** JS, Oudard S, Ozguroglu M, Hansen S, Machiels JP, Kocak I, Gravis G, Bodrogi I, Mackenzie MJ, Shen L, Roessner M, Gupta S, Sartor AO, TROPIC Investigators. Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *Lancet.* 2010 Oct 2;376(9747):1147-54.
- [24] **Deutsche Gesellschaft für Urologie e. V.** Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms. Version 1.03, März 2011, Seite 14-17.
- [25] **Eastham** JA, Riedel E, Scardino PT, Shike M, Fleisher M, Schatzkin A, Lanza E, Latkany L, Begg CB; Polyp Prevention Trial Study Group. Variation of serum prostatespecific antigen levels: an evaluation of year-to-year fluctuations. *JAMA* 2003 May 28;289(20):2695-700.
- [26] **Eaton** NE, Reeves GK, Appleby PN, Key TJ. Endogenous sex hormones and prostate cancer: a quantitative review of prospective studies. *Br J Cancer* 1999;80(7):930-4.
- [27] **Eichler** K, Hempel S, Wilby J, Myers L, Bachmann LM, Kleijnen J. Diagnostic value of systematic biopsy methods in the investigation of prostate cancer: a systematic review. *J Urol* 2006 May;175(5):1605-12.
- [28] **Fawcett** T. ROC Graphs: Notes and Practical Considerations for Data Mining Researchers. HP Laboratories January 2003.
- [29] **Fidler** IJ. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor embolilabeled with 125 I-5-iodo-2-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst* 1970;45:773-82.

- [30] **Fleming** MT, Morris MJ, Heller G, Scher HI. Post-therapy changes in PSA as an outcome measure in prostate cancer clinical trials. *Nat Clin Pract Oncol* 2006 Dec;3(12):658-67.
- [31] **Gao** CL, Rawal SK, Sun L, Ali A, Connelly RR, Banez L. Diagnostic potential of prostate-specific antigen expressing epithelial cells in blood of prostate cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003;9:2545.
- [32] **Gomella** LG, Raj GV, Moreno JG. Reverse transcriptase polymerase chain reaction for prostate specific antigen in the management of prostate cancer. *J Urol* 1997 Aug;158 (2):326-37.
- [33] **Goodman** OB, Fink LM, Symanowski JT, Wong B, Grobaski B, Pomerantz D, Ma Y, Ward DC, Vogelzang NJ. Circulating tumor cells in patients with castration-resistant prostate cancer baseline values and correlation with prognostic factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009;18(6):1904-13.
- [34] **Goodman** OB, Symanowski JT, Loudyi A, Fink LM, Ward DC, Vogelzang NJ. Circulating tumor cells as a predictive biomarker in patients with hormone-sensitive prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer*, 2011 Sep;9(1):31-8.
- [35] **Gradilone** A, et al. Detection of CK19, CK20 and EGFR mRNAs in peripheral blood of carcinoma patients: correlation with clinical stage of disease. *Oncol Rep* 2003;10:217-22.
- [36] **Graeber** F, Gastpar H, Herrmann A. The detection of tumor cells in circulating blood. *Arch Ohren Nasen Kehlkopfheilkd.* 1960;176:802-4.
- [37] **Gronberg** H, Damber L, Damber JE. Familial prostate cancer in Sweden. A nationwide register cohort study. *Cancer* 1996 Jan;77(1):138-43.
- [38] **Heidenreich** A (chairman), Bolla M, Joniau S, Mason MD, Matveev V, Mottet N, Schmid H-P, van der Kwast TH, Wiegel T, Zattoni F. Guidelines on Prostate Cancer. European Association of Urology 2010, Seite 6.
- [39] **Heidenreich** A (chairman), Bolla M, Joniau S, Mason MD, Matveev V, Mottet N, Schmid H-P, van der Kwast TH, Wiegel T, Zattoni F. Guidelines on Prostate Cancer. European Association of Urology 2010, Seite 14.
- [40] **Heidenreich** A (chairman), Bolla M, Joniau S, Mason MD, Matveev V, Mottet N, Schmid H-P, van der Kwast TH, Wiegel T, Zattoni F. Guidelines on Prostate Cancer. European Association of Urology 2010, Seite 16.
- [41] **Heidenreich** A (chairman), Bolla M, Joniau S, Mason MD, Matveev V, Mottet N, Schmid H-P, van der Kwast TH, Wiegel T, Zattoni F. Guidelines on Prostate Cancer. European Association of Urology 2010, Seite 27.
- [42] **Heidenreich** A (chairman), Bolla M, Joniau S, Mason MD, Matveev V, Mottet N, Schmid H-P, van der Kwast TH, Wiegel T, Zattoni F. Guidelines on Prostate Cancer. European Association of Urology 2010, Seite 37.
- [43] **Heidenreich** A (chairman), Bolla M, Joniau S, Mason MD, Matveev V, Mottet N, Schmid H-P, van der Kwast TH, Wiegel T, Zattoni F. Guidelines on Prostate Cancer. European Association of Urology 2010, Seite 41.
- [44] **Heidenreich** A (chairman), Bolla M, Joniau S, Mason MD, Matveev V, Mottet N, Schmid H-P, van der Kwast TH, Wiegel T, Zattoni F. Guidelines on Prostate Cancer. European Association of Urology 2010, Seite 42.
- [45] **Heidenreich** A (chairman), Bolla M, Joniau S, Mason MD, Matveev V, Mottet N, Schmid H-P, van der Kwast TH, Wiegel T, Zattoni F. Guidelines on Prostate Cancer. European Association of Urology 2010, Seite 142.

- [46] **Helo P**, Cronin AM, Danila DC, Wenske S, Gonzalez-Espinoza R, Anand A et al. Circulating Prostate Tumor Cells Detected by Reverse Transcription-PCR in Men with Localized or Castration-Refractory Prostate Cancer: Concordance with CellSearch Assay and Association with Bone Metastases and Survival. *Clinical Chemistry* 2009;55:4:765-773.
- [47] **Horneber M**, Fischer I, Dimeo F, Ruffer JU, Weis J. Cancer-related fatigue: epidemiology, pathogenesis, diagnosis and treatment. *Deutsches Ärzteblatt* 2012; 109(9):161-72.
- [48] **Imbriaco M**, Larson SM, Yeung HW. A new parameter for measuring metastatic bone involvement by prostate cancer: the Bone Scan Index. *Clin Cancer Res* 1998;4:1765-1772.
- [49] **Kagan M**, Howard D, Bendele T, Mayes J, Silvia J, Repollet M, Doyle J, Allard J, Tu N, Bui T, Russell T, Rao C, Hermann M, Rutner H, Terstappen LWMM. A sample preparation and analysis system for identification of circulating tumor cells. *Journal of Clinical Ligand Assay* 2002;25:104-110.
- [50] **Kattan MW**, Eastham J, Stapleton A, Wheeler T, Scardino P. A preoperative nomogram for disease recurrence following radical prostatectomy for prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:768.
- [51] **Kong D**, et al. Platelet-derived growth factor-D overexpression contributes to epithelial-mesenchymal transition of PC3 prostate cancer cells. *Stem Cells* 2008;26:1425-25.
- [52] **Krebs in Deutschland 2007/2008**. 8. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Berlin, 2012.
- [53] **Liotta LA**, Saidel MG, Kleinerman J. The significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process. *Cancer Res*. 1976;36:889-94.
- [54] **Makarov DV**, Trock BJ, Humphreys EB, Mangold LA, Walsh PC, Epstein JI, Partin AW. Updated nomogram to predict pathologic stage of prostate cancer given prostate-specific antigen level, clinical stage, and biopsy Gleason score (Partin tables) based on cases from 2000 to 2005. *Urol* 2007 Jun;69:1095-101.
- [55] **Melchior SW**, Corey E, Ellis WJ, Ross AA, Layton TJ, Oswin MM, Lange PH, Vassella RL. Early tumor cell dissemination in patients with clinically localized carcinoma of the prostate. *Clin Cancer Res* 1997 Feb;3(2):249-256.
- [56] **Merrick MV DC**, Chisholm GD, Elton RA. Prognostic significance of alkaline and acid phosphatase and skeletal scintigraphy in carcinoma of the prostate. *Br J Urol* 1985;57:715-720.
- [57] **Middleton RG**. Counseling patients about therapy for localized prostate cancer. *Semin Urol Oncol* 1995;13:187-190.
- [58] **Moll KJ**, Moll M. *Kurzlehrbuch Anatomie. Bauch- und Beckeneingeweide*. Urban und Fischer, München-Jena, 2003, 17. Auflage, Seite 566-568.
- [59] **Moreno JG**, Miller MC, Gross S, Allard WJ, Gomella LG, Terstappen LW. Circulating tumor cells predict survival in patients with metastatic prostate cancer. *Urology* 2005; 65(4):713-18.
- [60] **Moreno JG**, O'Hara SM, Gross S, Doyle G, Fritsche H, Gomella LG, Terstappen LW. Changes in circulating carcinoma cells in patients with metastatic prostate cancer correlate with disease status. *Urology* 2001 Sep;58(3):386-92.

- [61] **Moul** JW. Prostate specific antigen only progression of prostate cancer. *J Urol* 2000 Jun;163(6):1632-42.
- [62] **Nagrath** S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, Smith MR, Kwak EL, Digumarthy S, Muzikansky A, Ryan P, Balis UJ, Tompkins RG, Haber DA, Toner M. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* 2007 Dec 20;450(7173):1235-9.
- [63] **Nelius** T, Filleur S. PSA surge/flare-up in patients with castration-refractory prostate cancer during the initial phase of chemotherapy. *Prostate* 2009 Dec 1;69(16):1802-7.
- [64] **Netter** FH, Atlas der Anatomie des Menschen, Thieme Verlag, 2. Auflage
- [65] **Okegawa** T, Nutahara K, Higashihara E. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with hormone refractory prostate cancer. *J Urol.* 2009 Mar;181(3):1091-7. Epub 2009 Jan 16.
- [66] **Oken** MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, Carbone PP. Toxicity And Response Criteria Of The Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol* 5:649-655, 1982.
- [67] **Olmos** D, Arkenau H-T, Ang JE, Ledaki I, Attard G, Carden CP, Reid AHM, A'Hern R, Fong PC, Oomen NB, Molife R, Dearnaley D, Parker C, Terstappen LWMM, de Bono JS. Circulating tumour cell (CTC) counts as intermediate end points in castration-resistant prostate cancer (CRPC): a single-center experience. *Annals of Oncology* 2009;20:27-33.
- [68] **Oudard** S, Banu E, Medioni J, Scotte F, Banu A, Levy E, Wasserman J, Kacso G, Andrieu JM. What is the real impact of bone pain on survival in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer treated with docetaxel? *BJU Int.* 2009 Jun;103(12):1641-6.
- [69] **Pantel** K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nature Reviews Cancer* 2008 May;8:329-340.
- [70] **Panteleakou** Z, Lembessis P, Sourla A, Pissimissis N, Polyzos A, Deliveliotis C, Koutsilieris M. Detection of circulating tumor cells in prostate cancer patients: methodological pitfalls and clinical relevance. *Mol Med.* 2009 Mar-Apr;15(3-4):101-14. Epub 2008 Dec 3. Review.
- [71] **Partin** AW, Mangold LA, Lamm DM, Walsh PC, Epstein JI, Pearson JD. Contemporary update of the prostate cancer staging nomograms (Partin tables) for the new millennium. *Urology* 2001 Dec;58(6):843-8.
- [72] **Paul** R, Zimmermann F, Dettmar P, Adam M, van Randenborgh H, Alschibaja M, Herkommer K, Seitz M. Urogenitale Tumoren. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. W. Zuckschwerdt Verlag, 4. Auflage 2008, Seite 6.
- [73] **Paul** R, Zimmermann F, Dettmar P, Adam M, van Randenborgh H, Alschibaja M, Herkommer K, Seitz M. Urogenitale Tumoren. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. W. Zuckschwerdt Verlag, 4. Auflage 2008, Seite 8.
- [74] **Paul** R, Zimmermann F, Dettmar P, Adam M, van Randenborgh H, Alschibaja M, Herkommer K, Seitz M. Urogenitale Tumoren. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. W. Zuckschwerdt Verlag, 4. Auflage 2008, Seite 28.
- [75] **Paul** R, Zimmermann F, Dettmar P, Adam M, van Randenborgh H, Alschibaja M, Herkommer K, Seitz M. Urogenitale Tumoren. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. W. Zuckschwerdt Verlag, 4. Auflage 2008, Seite 53-54.
- [76] **Peck** K, et al. Detection and quantitation of circulating cancer cells in the peripheral blood of lung cancer patients. *Cancer Res* 1998;58:2761-5.

- [77] **Petrylak** DP, Tangen CM, Hussain MH, Lara PN Jr, Jones JA, Taplin ME, Burch PA, Berry D, Moinpour C, Kohli M, Benson MC, Small EJ, Raghavan D, Crawford ED. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med*. 2004 Oct 7;351(15):1513-20.
- [78] **Pound** CR, Partin A, Eisenberger M, Chan D, Pearson J, Walsh P. Natural History of Progression After PSA Elevation Following Radical Prostatectomy. *JAMA* 1999;281(17):1591-1597.
- [79] **Pulukuri** SM, Gondi CS, Lakka SS, Jutla A, Estes N, Gujrati M, Rao JS. RNA interference-directed knockdown of urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor inhibits prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity in vivo. *J Biol Chem*. 2005 Oct 28;280(43):36529-40.
- [80] **Quinn** M, Babb P. Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: international comparisons. *BJU Int* 2002 Jul;90(2):162-73.
- [81] **Richie** JP, Catalona WJ, Ahmann FR, Hudson MA, Scardino PT, Flanigan RC, deKernion JB, Ratliff TL, Kavoussi LR, Dalkin BL. Effect of patient age on early detection of prostate cancer with serum prostate-specific antigen and digital rectal examination. *Urology* 1993 Oct;42(4):365-74.
- [82] **Riethdorf** S, Fritsche H, Müller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer : a validation study of the CellSearch System. *Clin Cancer Res* 2007;13(3).
- [83] **Roobol** MJ, Roobol DW, Schröder FH. Is additional testing necessary in men with prostate-specific antigen levels of 1.0 ng/ml or less in a population-based screening setting? (ERSPC, section Rotterdam). *Urology* 2005 Feb;65(2):343-6
- [84] **Scardino** PT. Is radiotherapy effective for locally advanced prostate cancer? *Prog Clin Biol Res* 1989;303:223-239.
- [85] **Scher** HI, Jia X, de Bono JS, Fleisher M, Pienta KJ, Raghavan D, Heller G. Circulating tumour cells as prognostic markers in progressive, castration-resistant prostate cancer: a reanalysis of IMMC38 trial data. *Lancet Oncol*. 2009 Mar;10(3):233-9.
- [86] **Scher** HI, Morris MJ, Kelly WK, Schwartz LH, Heller G. Prostate cancer clinical trial end points: „RECIST“ing a step backwards. *Clin Cancer Res* 2005;11(14):5223-32.
- [87] **Steinberg** GD, Carter BS, Beaty BH, Childs B, Walsh PC. Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate* 1990;17(4):337-47.
- [88] **Steinmetz** T, Bokemeyer C. Tumoranämie – Diagnostik, Therapie und Leitlinien. *Best practice onkologie* February 2007;1:46-59.
- [89] **Stephan** C, Klaas M, Muller C, Schnorr D, Loening SA, Jung K. Interchangeability of measurements of total and free prostate-specific antigen in serum with 5 frequently used assay combinations: an update. *Clin Chem* 2006 Jan;52(1):59-64.
- [90] **Tangen** CM, Faulkner JR, Crawford ED, Thompson IM, Hirano D, Eisenberger M, Hussain M. Ten-year survival in patients with metastatic prostate cancer. *Clin Prostate Cancer* 2003 Jun;2(1):41-5.
- [91] **Tannock** IF, de Wit R, Berry WR et al. TAX 327 Investigators. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med* 2004;351:1502-1512.

- [92] **Thalgott** MK, Heck M, Maurer T, Nawroth R, Gschwend JE, Retz M. Klinisches Studienprotokoll: Einarmige nicht vergleichende Studie zur Detektion zirkulierender Zumorzellen (CTC) mit dem CellSearch® System im venösen Blut von Patienten mit einem fortgeschrittenen hormonrefraktären Prostatakarzinom (HRPC) während der Erstlinientherapie mit Docetaxel. Klinikum rechts der Isar der TU München; Version I, November 2008.
- [93] **Thompson** EW, Newgreen DF, Tarin D. Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Res* 2005;65:5991-5.
- [94] **Trapasso** JG, deKernion JB, Smith RB, Dorey F. The incidence and significance of detectable levels of serum prostate specific antigen after radical prostatectomy. *J Urol* 1994 Nov;152:1821-5.
- [95] **Went** PT, Lugli A, Meier S, Bundi M, Mirlacher M, Sauter G, Dirnhofer S. Frequent EpCAM protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol* 2004;35:122-128.
- [96] **Wilson** JK. The detection of tumor cells in circulating blood. *Bull Tulane Univ med Fac* 1959 Aug;18:171-82.
- [97] **Wirth** M. Therapie des lokal begrenzten Prostatakarzinoms. *Uroonkologie* 2000, Springer 233-277.
- [98] **Zaridze** DG, Boyle P, Smans M. International trends in prostate cancer. *Int J Cancer* 1984 Feb;33(2):223-30.
- [99] **Ziegler** A, Lange S, Bender R. Überlebenszeitanalyse: Eigenschaften und Kaplan-Meier Methode. *Dtsch Med Wochenschr* 2007;132:e36-e38.
- [100] **Ziegler** A, Lange S, Bender R. Überlebenszeitanalyse: Der Log-Rang-Test. *Dtsch Med Wochenschr* 2007;132:e39-e41.
- [101] <http://nomograms.mskcc.org/Prostate/PsaDoublingTime.aspx>, Stand 10.09.2012
- [102] <https://www.cellsearchruo.com/ruo-products/instruments-and-accessories>, Stand 19.09.2012
- [103] <http://www.tumorzentrumfreiburg.de/fachleute/klinischeskrebsregister/dokumentation/kodierung/cccf-kkr-kodierhilfe-prostatakrebs.pdf>, Stand 10.09.2012
- [104] <http://www.veridex.com/pdf/MKG1982PanCancerGTWshortPresentationFINAL.pdf>, Stand 10.09.2012
- [105] www.benfranklin.org/news/immunicon-sharpening-the-focus-on-cancer-diagnostics, Stand 19.09.2012
- [106] www.hs-design.com/portfolio/medical/immunicon_cellTracks.php, Stand 19.09.2012
- [107] www.pathology.medsch.ucla.edu/clinical-services/pages/ctc, Stand 10.09.2012

9 ABBILDUNGS- / TABELLENVERZEICHNIS

	Seite
Abb. 1: Zoneneinteilung der Prostata [64]	7
Abb. 2: Kattan-Nomogramm zur Berechnung des Rezidivrisikos nach Prostat- ektomie [50]	21
Abb. 3: CellSave Preservative Tubes® (A), CellTracks AutoPrep® System (B), MagNest® Kammer (C) und CellTracks Analyzer II® (D) [102,105,106]	24
Abb. 4: Schematische Darstellung einer Tumorzelle und eines Leukozyten mit den jeweiligen Antikörpern [104]	26
Abb. 5: Zwei zirkulierende Tumorzellen dargestellt mit einem Fluoreszenz- mikroskop. Der Zellkern repräsentiert sich rot (DAPI positiv), das Zyto- keratin imponiert grün (CK-PE positiv) [107].	27
Abb. 6: CTC-Zahlen im Kontinuum des Prostatakarzinoms (Kreis: milder Ausreißer → Wert liegt 1,5-3 Interquartilsabstände außer- halb, Sternchen: extremer Ausreißer → Wert liegt >3 Interquartilsabstände außerhalb)	40
Abb. 7: ROC-Kurve für die Wahrscheinlichkeit bildmorphologisch nachweisbarer Metastasen	41
Abb. 8: CTC-Zahlen in Abhängigkeit des Metastasierungsmusters (Kreis: milder Ausreißer → Wert liegt 1,5-3 Interquartilsabstände außer- halb, Sternchen: extremer Ausreißer → Wert liegt >3 Interquartilsabstände außerhalb)	43
Abb. 9: Detektionsraten in Abhängigkeit des Metastasierungsmusters	43
Abb. 10: Anteil der prognostisch ungünstigen CTC-Zahl ≥ 5 in Abhängigkeit des Metastasierungsmusters	44
Abb. 11: Verteilung der CTCs bei den Fragen nach Schmerz (A), Gesundheits- zustand (B), Lebensqualität (C) und Tumor-assoziiertes Fatigue (D) (Kreis: milder Ausreißer → Wert liegt 1,5-3 Interquartilsabstände außer- halb, Sternchen: extremer Ausreißer → Wert liegt >3 Interquartilsabstände außerhalb)	50
Abb. 12: Mediane CTC-Zahl in Abhängigkeit des ECOG-Status	52
Abb. 13: Mediane CTC-Zahl und Anteil der prognostisch ungünstigen CTC-Zahl ≥ 5 in Abhängigkeit des Überlebens innerhalb des Beobachtungszeitraumes	54
Abb. 14: Mediane CTC-Zahl in Bezug auf das Überleben	54
Abb. 15: Kaplan-Meier-Kurve für den Zusammenhang des Überlebens mit der CTC- Zahl bei mPC-Patienten: Patienten mit ≥ 5 CTCs (n=32) versus Patienten mit <5 CTCs (n=23)	55
Abb. 16: Kaplan-Meier-Kurve für den Zusammenhang des Überlebens mit der CTC- Zahl bei mCRPC- und mTRPC-Patienten: Patienten mit ≥ 5 CTCs versus Patienten mit <5 CTCs in den jeweiligen Subgruppen	56

Abb. 17:	ROC-Kurve zur Darstellung der Sensitivität und Spezifität der Schwellenwerte ≥ 3 CTCs und ≥ 5 CTCs als Prognosefaktor in Bezug auf das Überleben bei mPC-Patienten	56
Abb. 18:	Kaplan-Meier-Kurve für den Zusammenhang des Überlebens mit der CTC-Zahl bei mPC-Patienten: Patienten mit ≥ 3 CTCs (n=35) versus Patienten mit < 3 CTCs (n=20)	57
Abb. 19:	Kaplan-Meier-Kurve für den Zusammenhang des Überlebens mit der CTC-Zahl bei mCRPC- und mTRPC-Patienten: Patienten mit ≥ 3 CTCs versus Patienten mit < 3 CTCs in den jeweiligen Subgruppen	57
Tab. 1:	TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms [103]	11
Tab. 2:	Histopathologisches Grading nach WHO und Gleason Score [72]	12
Tab. 3:	Ein- und Ausschlusskriterien der Studie für mCRPC-Patienten [92]	22
Tab. 4:	Fragen zur Evaluation der Lebensqualität	32
Tab. 5:	ECOG-Status zur Evaluation der Leistungsfähigkeit krebskranker Patienten [66]	32
Tab. 6:	Patientencharakteristika der einzelnen Analysegruppen	37
Tab. 7:	Korrelation von CTCs und klinischen Parametern beim LAPC	39
Tab. 8:	Prognostisch günstige (CTCs < 5) und ungünstige (CTCs ≥ 5) CTC-Zahlen in Abhängigkeit des Metastasierungsmusters in den unterschiedlichen Krankheitsstadien	45
Tab. 9:	Korrelation der BSI-Prognosegruppen mit CTCs bei Patienten mit Knochenmetastasen	46
Tab. 10:	Korrelation von CTCs mit Routinelaborparametern bei Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom	48
Tab. 11:	Anteil an CTCs ≥ 5 der verschiedenen Antwortmöglichkeiten	51

10 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Univ.-Prof. Dr. med. J. E. Gschwend, Direktor der Urologischen Klinik rechts der Isar, für die Möglichkeit der Promotion in seiner Abteilung bedanken.

Ebenso gilt mein Dank meiner Doktormutter Prof. Dr. med. M. Retz, die mir dieses Thema anvertraut und stets mit beeindruckender Kompetenz zur Seite gestanden hat.

Meinem Betreuer Dr. med. M. Thalgott bin ich besonders zu Dank verpflichtet. Er opferte wie selbstverständlich seine Freizeit, um mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Herrn Dr. rer. nat. R. Nawroth, dem Leiter des urologischen Forschungslabors rechts der Isar, möchte ich für die Möglichkeit danken, in seinem Labor arbeiten zu dürfen. Dies wäre ohne die nette Hilfe der Mitarbeiterinnen Frau Monika Moissl, Frau Claude Krämer, Frau Doris Langer und Frau Stefanie Rämisch nicht möglich gewesen, weshalb ich auch Ihnen zu Dank verpflichtet bin.

Frau PD Dr. med. K. Herkommer möchte ich vor allem für die vielen nützlichen Tipps bezüglich des Verfassens einer Doktorarbeit danken und für die Leitung des Doktorandenseminars.

Zuletzt gilt mein Dank den Patienten und deren Angehörigen für deren Geduld, Verständnis und vor allem freundliche Mitarbeit. Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Kommilitonin und Freundin Caroline Kronester für die tatkräftige und moralische Unterstützung bedanken.