



Ein 2-Genmarkermodell gewonnen aus Vollblut als Prognoseindikator für das
Therapieansprechen und Gesamtüberleben von Patienten mit metastasiertem
kastrationsresistenten Prostatakarzinom

Désirée Victoria Müller-Held

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

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfende/-r der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Margitta Retz
2. Prof. Dr. Jürgen E. Gschwend

Die Dissertation wurde am 24.05.2019 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.10.2019 angenommen.

1	Abkürzungsverzeichnis	4
2	Einleitung	6
2.1	Das Prostatakarzinom	6
2.1.1	Epidemiologie.....	6
2.1.2	Pathogenese und Risikofaktoren	6
2.1.3	Klinik, Primärdiagnostik und Stadieneinteilung	7
2.2	Primärtherapie des Prostatakarzinoms	8
2.3	Das fortgeschrittene Prostatakarzinom	9
2.3.1	Tumorrezidiv und Metastasierungswege.....	9
2.3.2	Therapie des Tumorrezidivs.....	10
2.4	Das kastrationsresistente Prostatakarzinom	11
2.4.1	Therapie des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms.....	12
2.4.2	Therapiemonitoring des metastasierten CRPC (mCRPC)	14
2.5	Ziel dieser Studie.....	20
3	Patienten, Material und Methoden	21
3.1	Rahmenbedingungen	21
3.2	Sammeln der Blutproben.....	21
3.3	RNA-Extraktion aus Vollblutproben	22
3.3.1	Material und Reagenzien für die RNA-Extraktion.....	22
3.3.2	Ablauf der RNA-Extraktion	22
3.3.3	Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration	24
3.4	Reverse Transkriptase-Reaktion.....	25
3.4.1	Material und Reagenzien für die Reverse Transkriptase-Reaktion.....	25
3.4.2	Prinzip der reversen Transkriptase-Reaktion	26
3.4.3	Durchführung der reversen Transkriptase-Reaktion	26
3.5	quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR).....	27
3.5.1	Material und Reagenzien für die qRT-PCR.....	27
3.5.2	Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion.....	29
3.5.3	Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion.....	31
3.5.4	Auswertung der qRT-PCR.....	31
3.6	Statistische Auswertung	32
4	Ergebnisse	34
4.1	Selektion der Zielgene.....	36
4.2	Prognostischer Einfluss des 2-Gen-Modells in der Validierungsgruppe	42

5	Diskussion.....	50
5.1	Notwendigkeit neuer Biomarker für Therapieansprechen und Prognose bei CRPC-Patienten	50
5.2	Etablieren eines validen qPCR-Assays.....	51
5.3	Präklinische Selektion von Genen mit erhöhter Transkription im Prostatakarzinom	51
5.3.1	Die Problematik der Literatur über Biomarker	52
5.3.2	Vorteile und Fehlerquellen der Methodik.....	53
5.3.3	Die reverse Transkriptase-Reaktion.....	54
5.3.4	Gennachweis mittels Polymerase-Kettenreaktion.....	54
5.4	Bestimmung der Sensitivität des qPCR-Assays.....	56
5.5	Das 2-Genmarkermodell als eigenständiger Prognoseindikator	57
5.5.1	Verifizierung der präklinischen Laborergebnisse im Blut von CRPC-Patienten	57
5.5.2	Zusammenhang einer Genmarkererhöhung mit dem Überleben und Erstellen eines 2-Genmarkermodells	57
5.5.3	Validierung des 2-Genmarkermodells	58
5.6	Die Anzahl von CTCs im Blut von CRPC-Patienten – ein komplementäres Prognosemodell	58
5.7	Prognosemarker als neue Studienendpunkte	60
6	Zusammenfassung	62
7	Abbildungsverzeichnis	64
8	Tabellenverzeichnis	65
9	Literaturverzeichnis.....	66

1 Abkürzungsverzeichnis

2-GP	2-Gene-Panel = 2-Genmarkermodell
AP	alkalische Phosphatase
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
cDNA	Copy-Desoxyribonukleinsäure
CRPC	kastrationsresistentes Prostatakarzinom
Ct	Cycle threshold, Schwellenwert der qRT-PCR
CT	Computertomographie
CTC	zirkulierende Tumorzellen
CV	Variationskoeffizient
Cq	cycle of quantification
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleoisid-5'-Triphosphat
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EAU	Europäische Assoziation für Urologie
FAM	Reporter-Farbstoff
FDA	Food and Drug Administration
Gy	Grey
Hb	Hämoglobin
HR	Hazard ratio
KI	Konfidenzintervall
KPS	Karnofsky performance status
LDH	Laktatdehydrogenase
LH	Luteinisierendes Hormon
LH-RH	Luteinisierendes Hormon-Releasing-Hormon
M	molar
mCRPC	metastasiertes kastrationsresistentes Prostatakarzinom
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztherapie
NTC	Non template Control
OD	Optische Dichte

PBMC	periphere mononukleare Blutzellen
PCWG	Prostate Cancer Working Group
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasenketten-Reaktion
PSA	prostataspezifisches Antigen
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
RGE	relative Genexpression
qRT-PCR	quantitative oder realtime Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
Tris	Tri-(hydroxymethyl-)aminomethan
T-Stadium	Ausdehnung des Primärtumors
U	Unit
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UV	Ultraviolett
VIC	Quencher-Farbstoff
Z.n.	Zustand nach

2 Einleitung

2.1 Das Prostatakarzinom

2.1.1 Epidemiologie

Mit 25,4 % ist das Prostatakarzinom bei Männern die am häufigsten diagnostizierte Krebserkrankung in Deutschland mit ca. 58.000 Neuerkrankungen pro Jahr. In Europa beträgt die altersstandardisierte Inzidenz zwischen 90,9/100.000 Männern in Schweden und 35,9/100.000 Männern in Spanien. An den Tumorfolgen versterben in Deutschland jährlich 12.000 Männer. Somit steht das Prostatakarzinom mit 10,1% an dritter Stelle der tödlich verlaufenden Krebserkrankungen des Mannes und an siebter Stelle der gesamten Todesursachen. Das Durchschnittsalter bei Erstdiagnose beträgt 69 Jahre. In Deutschland wird sich bis zum Jahre 2050 der Anteil der über 60-jährigen Männer verdoppeln auf über 28 Millionen und somit die Prävalenz dieser Erkrankung proportional hierzu ansteigen. Aus diesem Grund ist die Weiterentwicklung von Diagnostik und Therapie von großer Bedeutung (Deutsche Krebsgesellschaft 2014).

2.1.2 Pathogenese und Risikofaktoren

Die Pathogenese der malignen Entartung der Prostatadrüsenzellen ist noch weitgehend unbekannt. Diskutiert wird eine Entstehung in zwei Phasen: zuerst eine nichtandrogen-sensitive Phase, in der Mutationen, Sauerstoffradikale und Karzinogene zu einer proliferativen, inflammatorischen Atrophie führen. Daraus entwickelt sich eine prostatistische, intraepitheliale Neoplasie, die androgen-sensitiv zu einem Karzinom entartet (Deutsche Krebsgesellschaft 2014).

Der Hauptrisikofaktor, ein Prostatakarzinom zu entwickeln, ist das Alter. An zweiter Stelle steht die Erkrankung eines bzw. mehrerer Angehörigen ersten Grades, z.B. des Vaters oder Bruder, insbesondere wenn dies in einem jungen Alter der Fall ist. Risikofaktoren von geringerer Bedeutung sind Ernährung und chronische Entzündungsprozesse an der Prostata, zum Beispiel im Rahmen von sexuell übertragbaren Krankheiten (Deutsche Krebsgesellschaft 2014).

2.1.3 Klinik, Primärdiagnostik und Stadieneinteilung

Das Prostatakarzinom bildet sich häufig im äußeren Rand der Drüse, sodass es im Gegensatz zur benignen Prostatahyperplasie kaum Beschwerden beim Wasserlassen verursacht. Dadurch bleibt es klinisch meist sehr lange unbemerkt.

Die ersten diagnostischen Schritte sind in den meisten Fällen die digital-rektale Untersuchung und die Messung des PSA-Wertes (prostataspezifisches Antigen), welche ab dem 45. Lebensjahr angeboten wird. Liegt ein tumorsuspekter Befund in der digital-rektalen Untersuchung vor bzw. liegt der PSA-Wert über 4 ng/ml oder weist er ein suspektes Ansteigen auf, sollte eine transrektale sonografie-gesteuerte Prostatastanzbiopsie durchgeführt werden. Diese ist der Goldstandard zur sicheren Diagnosestellung eines Prostatakarzinoms. Bei negativem Ergebnis der Biopsie kann zusätzlich als einzige bildgebende Primärdiagnostik eine Untersuchung mittels MRT erwogen werden (Deutsche Krebsgesellschaft 2014).

Die Stadieneinteilung – bzw. das Staging - des Prostatakarzinoms erfolgt nach der TNM-Klassifikation und bezieht sich auf die Tumorgröße und -ausdehnung, den Lymphknotenbefall und auf die Metastasierung. Hierzu sind ergänzende bildgebende Verfahren notwendig.

Die TNM-Klassifikation des Prostatakrebses

Tumorausdehnung (T)

T 1: Tumor ist weder tastbar noch per bildgebendem Verfahren sichtbar

- T 1a: Tumor in weniger als 5 % des Biopsie-Gewebes
- T 1b: Tumor in mehr als 5 % des Biopsie –Gewebes
- T 1c: Tumor wurde nach erhöhtem PSA-Wert durch eine Nadelbiopsie diagnostiziert

T 2: Tumor begrenzt auf Prostatakapsel (lokal begrenztes Karzinom)

- T 2a: Tumor in weniger als 50% eines Seitenlappens
- T 2b: Tumor in mehr als 50% eines Seitenlappens
- T 2c: Tumor in beiden Seitenlappen

T 3: Tumor wächst über Prostatakapsel hinaus (lokal fortgeschrittenes Karzinom)

- T 3a: Tumorausbreitung ein-/beidseitig über Prostatakapsel hinaus, Samenblasen tumorfrei

- T 3b: Tumorausbreitung ein-/beidseitig über Prostatakapsel hinaus und in Samenblasen
- T 3c: Tumorausbreitung in Nachbarstrukturen oder nicht verschiebbar (fixiert)

Lymphknotenmetastasen (N)

N0: keine Metastasen in benachbarten (regionären) Lymphknoten

N1: Metastasen in benachbarten Lymphknoten

Fernmetastasen (M)

M 0: keine Fernmetastasen nachweisbar

M 1: Fernmetastasen vorhanden

- M 1a: Metastasen in nicht benachbarten Lymphknoten

- M 1b: Knochenmetastasen

- M 1c: Metastasen in anderen Organen und/oder Strukturen

(Brierley, Gospodarowicz, and Wittekind 2016)

Die pathomorphologische Klassifikation erfolgt durch den Gleason-Score, 1966 durch den amerikanischen Pathologen Donald F. Gleason entwickelt und 2005 durch die International Society of Urological Pathology (ISUP) überarbeitet, bei dem die Aggressivität bzw. der Entdifferenzierungsgrad des Tumors anhand des Biopsiematerials bzw. des Operationspräparates der entfernten Prostata bestimmt wird. Untersucht werden zwei Gewebeareale, in denen karzinomatöse Zellen zu finden sind. Sie werden in fünf Differenzierungsgrade eingeteilt, wobei Grad 1 dem gesunden Prostatagewebe am meisten gleicht und Grad 5 anaplastischen Zellen entspricht. Es werden der am häufigsten vorkommende und der am schlechtesten differenzierte Wert addiert. Sollte nur ein Differenzierungsgrad in der Gewebeprobe auftreten, wird dieser verdoppelt (Epstein et al. 2005).

Staging und Gleason-Score entscheiden darüber, welche Therapieoptionen in Betracht zu ziehen sind.

2.2 Primärtherapie des Prostatakarzinoms

Für Patienten mit einem lokal begrenzten Karzinom, das die Gewebekapsel nicht überschreitet und nicht metastasiert ist, stehen folgende Therapieoptionen zur Verfügung:

Die aktive Überwachung (active surveillance) ist möglich, wenn der PSA-Wert unter 10 ng/ml und der Gleason-Score unter 6 liegen sowie nicht mehr als 2 von 10-12 Biopsiestanzen tumorpositiv sind bei weniger als 50% Tumor pro Stanze und ein cT1- oder cT2a-Stadium vorliegt. Das „c“ steht hier für das klinische TNM-Stadium, welches anhand von bildgebenden Verfahren und Untersuchungen – z. B. dem Tastbefund - festgelegt wird, im Gegensatz zum pathologischen Stadium „p“, welches erst nach der operativen Entfernung der Prostata bestimmt werden kann. Eine radikale Prostatektomie kann bei allen Klassifikationsgruppen des nichtmetastasierten Prostatakarzinoms durchgeführt werden, besonders wenn eine R0-Resektion angestrebt werden kann. Ab cT2, einem PSA-Wert größer 10 ng/ml und einem Gleason-Score über 6, wird zusätzlich eine ausgedehnte, pelvine Lymphadenektomie empfohlen. Weitere Optionen sind die primäre perkutane Strahlentherapie – evtl. in Kombination mit einer neoadjuvanten oder adjuvanten Hormonablationstherapie - oder die Brachytherapie (Deutsche Krebsgesellschaft 2014).

Bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Karzinom, d. h. der Tumor wächst über die Gewebekapsel hinaus ist jedoch noch nicht metastasiert, wird die radikale Prostatektomie als primäre Therapie angestrebt. Ein positiver Schnitttrand (R1) oder das Vorliegen von Risikofaktoren wie z.B. eine Infiltration der Samenblase stellen Indikationen für eine adjuvante perkutane Strahlentherapie (60-64 Gy) dar. Eine alternative Therapieoption beim lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinom ist die perkutane Strahlentherapie in Kombination mit einer hormonablativen Therapie.

In Fällen, in denen der Allgemeinzustand bzw. der Wunsch des Patienten eine kurative Therapie nicht zulassen, ist Watchful Waiting im Sinne eines palliativen Therapiekonzepts mit sofortiger oder symptomabhängiger Hormonablation möglich (Deutsche Krebsgesellschaft 2014).

2.3 Das fortgeschrittene Prostatakarzinom

2.3.1 Tumorrezidiv und Metastasierungswege

Diagnostisches Mittel der Wahl um ein Tumorrezidiv festzustellen ist bei symptomlosen Patienten mit Zustand nach kurativer Therapie der PSA-Wert. Ein PSA-Rezidiv ist definiert als ein PSA-Wert, der größer ist als 0,2 ng/ml bei Z. n.

radikaler Prostatektomie bzw. 2 ng/ml über dem PSA-Nadir bei Z. n. primär kurativer Strahlentherapie (Heidenreich et al. 2018). Eine PSA-Verdopplungszeit von unter drei Monaten, ein Gleason-Score von über 7 und eine kurze Zeitspanne zwischen kurativer Therapie und PSA-Rezidiv sind wegweisende Indikatoren dafür, dass es sich um ein systemisches Rezidiv und nicht um ein Lokalrezidiv handelt (Deutsche Krebsgesellschaft 2014). Primärer Metastasierungsweg des Prostatakarzinoms sind die Lymphknoten des Beckens. Hämatogen streut es vorwiegend in die Knochen der Wirbelsäule, der Rippen und des Beckens, erst spät in Lunge und Leber.

2.3.2 Therapie des Tumorrezidivs

Bei Lokalrezidiven zeigt eine möglichst zeitnahe Salvage-Strahlentherapie der Prostataloge mit mindestens 66 Gy bei Patienten mit Z.n. radikaler Prostatektomie und PSA-Anstieg jeglicher Art (<0,2; 0,2-1,0 und >1,0 ng/ml) eine deutliche Verbesserung des metastasen-freien Überlebens (Heidenreich et al. 2018) (Deutsche Krebsgesellschaft 2014). Bei Patienten mit primärer Strahlentherapie und ohne Fernmetastasen kann eine Salvage-Prostatektomie indiziert sein.

Handelt es sich um eine bereits metastasierte, systemische Erkrankung, ist die Androgendeprivation das therapeutische Mittel der Wahl (Deutsche Krebsgesellschaft 2014). Bösartige Prostatakarzinomzellen wachsen, ebenso wie ihre gesunden Vorläuferzellen, unter dem Einfluss von Androgenen. Diese werden vor allem in den Hoden synthetisiert und unterliegen einer Steuerung durch das Hormon Luteinisierendes Hormon (LH). Der Ansatz der Androgendeprivationstherapie basiert auf der Minimierung der Testosteronproduktion und –wirkung, sodass für die Krebszellen der entscheidende Wachstumsreiz fehlt. Von einer Kastration spricht man bei einem Testosteron-Blutspiegel von unter 50 ng/dl. Erreicht werden kann dies durch die chirurgische bilaterale Orchiectomie, die jedoch häufig von den Patienten abgelehnt wird. Häufiger zum Einsatz kommen hingegen medikamentöse Therapien. Die Testosteronproduktion kann durch LH-RH-Analoga bzw. –Antagonisten eingeschränkt werden. LH-RH-Analoga führen zu einer Dauerstimulation der Hypophyse, die anfangs kurzzeitig dadurch mehr Androgene produziert (Flare-up-Phänomen), danach aber deren Produktion hemmt. Aufgrund der Reversibilität ist dies der Standard zur Androgendeprivation. Einen ähnlichen Effekt haben auch die LH-RH-Antagonisten. Ein Vorteil von ihnen ist ein schneller

Wirkeinsatz ohne Flare-up-Phänomen. Nachteilig ist eine fehlende Studienlage zu Langzeitergebnissen. Eine Senkung der Testosteronwirkung erzielen Antiandrogene, die die Testosteronrezeptoren in den Zielorganen blockieren und in steroidale und nicht-steroidale Antiandrogene unterteilt werden können. Sie kommen vor allem in Kombination mit LH-RH-Agonisten zum Einsatz, um das Flare-up-Phänomen zu verhindern. Therapieschemata der Androgendeprivation sind die maximale, die kontinuierliche und die intermittierende Androgenblockade. Häufig wird mit einer kontinuierlichen Monotherapie mit LH-RH-Analoga begonnen. Ein minimaler Überlebensvorteil, allerdings einhergehend mit höheren Nebenwirkungen, wird durch eine maximale Androgenblockade mittels LH-RH-Analoga in Kombination mit einem nicht-steroidalen Antiandrogen erreicht, bei der sowohl die Androgenproduktion in den Hoden als auch die in den Nebennieren produzierten Androgene ausgeschaltet werden. Die intermittierende Therapie hat die Vorteile geringerer Nebenwirkungen, einer besseren Lebensqualität und möglicherweise eines Hinauszögerns der Therapieresistenz gegenüber der Androgendeprivation. Bezüglich des Überlebens fehlen jedoch Langzeitstudien (Heidenreich et al. 2018).

Generell gilt für die Androgendeprivationstherapie, dass sie von palliativem Charakter und mit Nebenwirkungen verbunden ist. Außerdem hat sie lediglich Einfluss auf das progressionsfreie Überleben bzw. die Linderung metastasenbedingter Schmerzen. Ein möglicher Einfluss auf das Gesamtüberleben der Erkrankung ist noch nicht vollständig geklärt (Deutsche Krebsgesellschaft 2014).

2.4 Das kastrationsresistente Prostatakarzinom

Obwohl zunächst unter Hormontherapie der PSA-Wert abfällt und der Testosteronspiegel auf Kastrationsniveau sinkt, kommt es im Verlauf von Jahren nach Beginn der Androgendeprivation zu einer Therapieresistenz und zu einem erneuten Tumorprogress (Heidenreich et al. 2018). Dies wird als kastrationsresistentes Prostatakarzinom (CRPC) bezeichnet und wird laut der Leitlinie der europäischen Gesellschaft für Urologie (EAU) folgendermaßen definiert:

- ein Testosteronwert unter 50 ng/dl bzw. unter 1,7 nmol/l, entsprechend einem Kastrationslevel und
- drei konsekutive PSA-Anstiege im Abstand von einer Woche, wovon zwei mit einem 50%igen Anstieg über dem Nadir und alle PSA-Werte über 2 ng/ml liegen

- Progression oder Neuentstehung von mindesten zwei ossären bzw. Weichteilläsionen laut RECIST-Kriterien (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) oder bei einer Größe von über 2 cm (Heidenreich et al. 2018)

Das Stadium des metastasierten CRPC führt zu den meisten Todesfällen im Rahmen einer Prostatakarzinomerkrankung (Halabi et al. 2014).

2.4.1 Therapie des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms

Liegen keine Metastasen vor, so wird ein abwartendes Verhalten empfohlen und ggf. ein Fortfahren bzw. eine Umstellung der Androgendeprivationstherapie diskutiert (Deutsche Krebsgesellschaft 2014). Für das metastasierte CRPC galt lange Zeit die Chemotherapie mit Docetaxel als Standard. In den letzten Jahren haben jedoch weitere hormonelle und nicht-hormonelle Therapieoptionen in prospektiven, randomisierten, klinischen Phase-III-Studien einen Überlebensvorteil gezeigt (Heidenreich et al. 2018).

Zur Erstlinientherapie des metastasierten CRPC stehen folgende Substanzen zur Verfügung:

- Abirateron ist ein oral verabreichbarer Inhibitor des CYP-17-Enzyms, der eine gonadale und extragonadale Androgen-Biosynthesemmung zur Folge hat. Es ist geeignet für Patienten mit keinen oder nur milden Tumorsymptomen und zeigt ein verlängertes radiographisch progressionsfreies Überleben, bessere Lebensqualität und einen Überlebensvorteil im Vergleich zu einem Placebo (Deutsche Krebsgesellschaft 2014). Abirateron führt in geringem Maße zu den Nebenwirkungen Hypertonie, Hypokalämie, periphere Ödeme und Transaminasenanstieg. Dies ist auf eine Mineralkortikoid-Synthesehemmung zurückzuführen. Um dies zu verhindern, wird es in Kombination mit niedrig dosiertem Kortison (Prednison) verabreicht (Ryan, Smith, and de Bono 2013).
- Enzalutamid ist ein oral verabreichbarer Inhibitor der Androgen-Rezeptor-Signalkaskade. Er verhindert die Interaktionen von Androgenrezeptor und DNA (Desoxyribonukleinsäure) und führt so zu einem verminderten Wachstum und zur Apoptose der Prostatakarzinomzellen. In Studien zeigte sich ein Überlebensvorteil mit einer Senkung des Mortalitätsrisikos um 29% und ein

verlängertes radiographisch progressfreies Überleben im Vergleich zur Placebogruppe – auch für Patienten mit viszeralen Metastasen. Nebenwirkungen sind Fatigue und Bluthochdruck (Beer et al. 2014).

- Docetaxel ist seit 2004 ein Standardtherapeutikum in der Erstlinientherapie des mCRPC (metastasierten CRPC). Dies ist ein Taxan, welches das antiapoptotische Bcl-2-Protein phosphoryliert und somit inaktiviert und als Mikrotubulusinhibitor die Mitose hemmt (Petrylak et al. 2004). Die häufigste Nebenwirkung ist die Neutropenie (Tannock et al. 2004). In einer randomisierten Phase-III-Studie zeigte ein 2-Wochen-Schema mit einer Dosis von 50mg/m² Körperoberfläche gegenüber einem 3-Wochenschema mit einer Dosis von 75mg/m² Körperoberfläche eine Verbesserung der Prognose und geringere Nebenwirkungen (Kellokumpu-Lehtinen et al. 2013).

Kommt es bei Patienten während oder nach einer Chemotherapie mit Docetaxel erneut zu einem Fortschreiten der Erkrankung, stehen folgende Zweitlinientherapieoptionen zur Verfügung:

- Radium-223-Dichlorid ist eine Therapieoption für mCRPC-Patienten, welche bereits eine Docetaxeltherapie hinter sich haben oder für diese nicht geeignet sind bzw. diese ablehnen, mindestens zwei radiologische Knochenmetastasen aufweisen und gleichzeitig keine viszeralen Metastasen. Über 90% der mCRPC-Patienten haben Knochenmetastasen, deren Folgen die Lebensqualität deutlich beeinträchtigen und eine Haupttodesursache dieser Patienten darstellt. Der alpha-Emitter Radium-223-Dichlorid imitiert Calcium und wird selektiv in Knochen mit hohen Umbauprozessen, also z. B. in osteoblastische Metastasen, eingebaut. Seine emittierten alpha-Partikel haben eine sehr kurze Reichweite von unter 100 µm und führen somit lokal zu zytotoxischen Effekten durch Brüche der DNA-Doppelstränge. Eine intravenöse Gabe von 50kBq/kg alle vier Wochen führte bei mCRPC-Patienten zu einer Lebensverlängerung um 3,6 Monate, zu einer signifikanten Hinauszögerung von symptomatischen pathologischen Frakturen und zu einer Schmerzlinderung. Unerwünschte Nebenwirkungen kamen selten vor und waren hauptsächlich Neutropenien und Thrombozytopenien (2,2% bzw. 6,3% der Patienten) (Parker et al. 2013).

- Eine Docetaxel-Reinduktionstherapie ist geeignet für Patienten, welche unter Erstlinien-Docetaxeltherapie einen PSA-Abfall von >50% erreichten und die Therapie gut tolerierten. Unter diesen Voraussetzungen konnte eine signifikante Verlängerung des PSA-progressfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens nachgewiesen werden (Heck et al. 2012).
- Abirateron (s. o.) als Zweitlinientherapie zeigt bei docetaxelvorbehandelten Patienten einen Überlebensvorteil von 4,6 Monaten bei geringen Nebenwirkungen (J. S. de Bono et al. 2011) (s.o.)
- Enzalutamid (s. o.) als Zweitlinientherapie zeigte einen Überlebensvorteil von 4,8 Monaten und ein niedrigeres Mortalitätsrisiko um 37% im Vergleich zu einem Placebo (Scher et al. 2012).
- Cabazitaxel, ein Chemotherapeutikum, ist wie Docetaxel ein Taxan-Derivat, welches verhindert, dass sich die Mikrotubuli während der Zellteilung depolymerisieren und so eine Hemmung der Mitose zur Folge hat. Es wird zusammen mit Prednison in einer Dosierung von 20-25 mg/m² alle drei Wochen intravenös verabreicht. Eine Verlängerung der Überlebenszeit ist bewiesen, jedoch kommt es häufig zu Nebenwirkungen (Neutropenien bei 82% der Patienten, Diarrhöen bei 6%). Dies schränkt die Nutzung bei Patienten mit einer Knochenmarkinsuffizienz ein (J. S. de Bono et al. 2010).

2.4.2 Therapiemonitoring des metastasierten CRPC

Das mCRPC ist ein sehr uneinheitliches Krankheitsbild. Patienten zeigen große Unterschiede bezüglich ihres Therapieansprechens. Dies macht es den behandelnden Ärzten schwer, eine prognostische Aussage in den einzelnen Fällen zu treffen und zu entscheiden, welches therapeutische Vorgehen am sinnvollsten ist. Deshalb ist es von großem Interesse Biomarker zu identifizieren, die möglichst akkurat mit der Wirksamkeit eines Medikamentes und der Gesamtüberlebenszeit zusammenhängen.

2.4.2.1 Der PSA-Wert als Parameter der Tumoraktivität

Das prostataspezifische Antigen (PSA) - eine Serinprotease, die von Prostatazellen exprimiert wird – ist einer der meist erforschten Tumormarker beim Prostatakarzinom. Das aus dem Serum gewonnene Protein dient von der Früherkennung über Rezidivdiagnostik bis hin zu Beurteilung der Tumoraktivität als Therapiemonitoring in

fortgeschrittenen Stadien des Karzinoms (Collette 2005). So beschäftigten sich auch viele Studien mit der Aussagekraft des PSA-Wertes beim metastasierten CRPC. Petrylak et al (Petrylak et al. 2006) und Armstrong et al (Armstrong, Garrett-Mayer, Ou Yang, et al. 2007) konnten übereinstimmend feststellen, dass eine PSA-Reduktion von über 30% innerhalb der ersten drei Monate nach Therapiebeginn mit einer längeren Gesamtüberlebenszeit einhergehen. Jedoch kommen alle Studien letztendlich zu dem Schluss, dass der PSA-Wert nicht präzise genug mit der Prognose korreliert, um allein anhand dessen therapeutische Entscheidungen treffen zu können (Collette 2005; Armstrong, Garrett-Mayer, Ou Yang, et al. 2007). Bei bis zu 20% der mCRPC-Patienten, welche auf eine Chemotherapie ansprechen und dadurch einen Überlebensvorteil haben, steigt der PSA-Wert initial an, bevor er wieder abfällt. Ein Ansatz dies zu erklären ist die Freisetzung von PSA aus zerfallenden Tumorzellen (Flare-up-Phänomen) (Danila, Fleisher, and Scher 2011). Weitere Nachteile des PSA-Wertes zur Beurteilung von Tumorlast und -Aktivität ergeben folgende biologische Mechanismen: Erstens hängt es vom Entdifferenzierungsgrad der Karzinomzellen ab, wie viel PSA sie produzieren können. Dementsprechend kann es bei einem bösartigen, großen Tumor zu niedrigeren PSA-Spiegeln kommen als bei einem gut differenzierten. Zweitens ist der gemessene PSA-Wert ein Serumwert, welcher Schwankungen im Vergleich zum PSA-Gehalt des Gewebes unterlegen sein kann. Drittens ist PSA ein androgen-abhängiges Enzym und wird somit selbst durch eine Hormontherapie beeinflusst (Collette 2005).

2.4.2.2 RECIST-Kriterien

Bei soliden Tumoren gelten seit dem Jahr 2000 die RECIST-Kriterien (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) zur objektiven Kontrolle mittels Bildgebung von Progression und Therapieansprechen. Vor und während eines neuen Therapieregimes werden Tumorerkrankungen mittels bildgebender Verfahren gezählt und repräsentative Target-Läsionen ausgemessen. Nicht-ausmessbare Parameter werden als Non-Target-Läsionen dokumentiert. Der Verlauf der Krankheit lässt sich dann in die Stadien komplette Remission, partielle Remission, stabile Erkrankung (stable disease) und Progression während der Therapie einteilen (Eisenhauer et al. 2009). Im Falle des Prostatakarzinoms und vor allem des metastasierten CRPC sind die RECIST-Kriterien leider nicht ausreichend anwendbar, um den Therapieerfolg zu

messen (Scher et al. 2005). Hauptgrund hierfür ist, dass es beim Prostatakarzinom kaum Metastasen gibt, die als Target-Läsionen in Frage kommen und auch die Non-Target-Läsionen lassen sich nur ungenügend quantifizieren. Lymphknotenmetastasen sind meist zu klein, um als Target-Läsion - mindestens 1 cm Durchmesser in der Computertomographie (Eisenhauer et al. 2009) - ein Therapieansprechen beurteilen zu können. Knochenmetastasen lassen als Non-Target-Läsionen keine Quantifizierung der Größenzunahme oder -abnahme unter Therapie zu. Zudem stimmt ein Rückgang dieser Läsionen nicht immer mit einem Therapieansprechen und einer Verbesserung der Prognose überein und umgekehrt (Scher et al. 2005).

2.4.2.3 Bisherige Nomogramme zum Therapiemonitoring

Innerhalb der letzten Jahre haben viele Arbeitsgruppen Nomogramme erstellt, mit dem Anspruch, geeignete Faktoren zu identifizieren, die signifikant mit Prognose und Therapieerfolg von mCRPC-Patienten zusammenhängen.

So haben z.B. Halabi et al 2003 (Halabi et al. 2003) eines der ersten Nomogramme veröffentlicht, mit welchem man vor Therapiebeginn eine Aussage über die Überlebensdauer geben kann. Folgende Faktoren wurden hierbei als prognostisch ungünstig angesehen:

- ein schlechter ECOG-Performance Status (Eastern Cooperative Oncology Group)
- ein Gleason score über 8
- das Vorhandensein viszeraler Metastasen
- hohe Werte von PSA, Laktat-Dehydrogenase (LDH) und alkalischer Phosphatase (AP)
- ein niedriger Hämoglobin-Wert (Hb)

Smaletz et al haben 2002 (Smaletz et al. 2002) ebenfalls herausgearbeitet, dass v.a. ein niedriger Performance Status und schlechte Hb- und Laktatdehydrogenase-Werte mit einem schlechten klinischen Ergebnis korrelieren. In ihrem Nomogramm waren des Weiteren AP-, Albumin- und PSA-Werte sowie das Alter enthalten.

Diese beiden Studien waren in der darauffolgenden Zeit nur noch bedingt anwendbar, da 2004 das Chemotherapeutikum Docetaxel zugelassen wurde, welches für die folgenden Jahre die hauptsächliche Rolle in der Behandlung des CRPC übernehmen sollte.

2007 (Armstrong, Garrett-Mayer, Yang, et al. 2007) und 2010 (Armstrong et al. 2010) veröffentlichten Armstrong et al zwei Nomogramme, bei dem Ersteres vor der Therapie eines mCRPC und Letzteres nach der ersten Chemotherapie bei mCRPC die wahrscheinliche Überlebensdauer beurteilt. Neben schon bekannter Faktoren (PSA, Anzahl der Metastasen, Gleason score, KPS, Hämoglobin, Alkalische Phosphatase) spielt hier die Art des Tumorfortschreitens eine wichtige prognostische Rolle: PSA-Anstieg und/oder radiologischer Progress und/oder Schmerzprogress. Jedoch auch sie suggerierten, dass im Zuge der fortschreitenden Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten neue Biomarker nötig sind.

Eine Aktualisierung dieser Nomogramme nahmen sich Halabi et al 2013 (Halabi et al. 2013) und 2014 (Halabi et al. 2014) vor. Bei Erstlinien-Chemotherapie kann man nun anhand von acht Faktoren die Überlebenswahrscheinlichkeit nach 18, 24, 30, 36 und 48 Monaten errechnen. Ein neu hinzugewonnener Faktor ist der Gebrauch von Opioidanalgetika (Halabi et al. 2014). Bei Zweitlinientherapie mit Cabazitaxel haben Halabi et al neun Faktoren in ein Nomogramm aufgenommen, welches die Überlebenswahrscheinlichkeit bei 15, 18 und 24 Monaten angibt. Neu mitberücksichtigt werden hier u.a. die Zeit seit der letzten Docetaxeltherapie und die Zeitspanne der vorangegangenen Hormontherapie. Die restlichen Faktoren (Schmerz, Alkalische Phosphatase, viszerale Metastasen, Progressionsart, Hämoglobinwert, Performance Status), die Armstrong et al zuvor postulierte (Armstrong et al. 2010), wurden in dieser Studie ebenfalls als prognostische Marker bestätigt.

Obwohl dies eine der wenigen Studien ist, welche die Prognose bei Behandlung mit einem neueren Chemotherapeutikum analysiert, beschränkt sie sich jedoch nur auf eine Situation: die Therapie mit Cabazitaxel nach der Chemotherapie mit Docetaxel. In Anbetracht der Vielfalt neuer Therapieoptionen bei CRPC, darunter Abirateron, Sipuleucel-T, Enzalutamid und Radium²²³ (Omlin et al. 2013) – auch in der Zweitlinientherapie – ist die prognostische Aussagekraft eingeschränkt. Die

durchschnittliche Überlebenszeit nach aktuellen Therapieschemata ist um einige Monate länger als durch die Nomogramme von Halabi und Smaletz ausgerechnet (Omlin et al. 2013).

2.4.2.4 Zirkulierende Tumorzellen als prognostischer Marker beim CRPC

Der Nachweis und die Anzahl zirkulierender Tumorzellen (CTC = circulating tumor cells) im Blut mittels dem FDA-genehmigten (Food and Drug Administration) CellSearch assay haben sich in den letzten Jahren als unabhängige Tumormarker sowohl vor als auch nach einem Therapieansatz, v.a. bei metastasierten soliden Tumoren wie z.B. dem Mammakarzinom, dem kolorektalen Karzinom und dem Prostatakarzinom als prognostisch wegweisend ergeben (Danila et al. 2007). Die meisten CRPC-Patienten weisen positive CTC-Werte im Blut auf (J. S. de Bono, Scher, Montgomery, Parker, Miller, Tissing, Doyle, Terstappen, Pienta, and Raghavan 2008a), vor allem Patienten mit Knochenmetastasen, bedingt durch die hämatogene Streuung (Olmos et al. 2008). Mehrere Studien belegten, dass eine höhere Zahl von CTCs und v.a. ein Anstieg während eines Therapieregimes mit einem schlechteren klinischen Ergebnis zusammenhängen (Danila et al. 2007; J. S. de Bono, Scher, Montgomery, Parker, Miller, Tissing, Doyle, Terstappen, Pienta, and Raghavan 2008a; Scher et al. 2009; Goldkorn et al. 2014). Während Danila et al und Scher et al eine Prognoseverschlechterung feststellten, die kontinuierlich mit einer höheren Anzahl CTCs einhergeht, teilten Bono et al und Goldkorn et al die Patienten in prognostische Gruppen ein, wobei der Schwellenwert von größer-gleich 5 CTCs als ungünstig gilt. Die Last zirkulierender Tumorzellen verhält sich auch kongruent zu bisherigen Markern des mCRPC (PSA, Hämoglobin, alkalische Phosphatase, Lebermetastasen und Knochenschmerzen) (Goldkorn et al. 2014), ist jedoch ein stärkerer Indikator für die Gesamtüberlebenszeit. Dies lässt Rückschlüsse zu, dass dieser Marker die intrinsischen, biologischen Vorgänge des Tumors widerspiegelt (Danila et al. 2007). Es wird sogar derzeit diskutiert, die CTC-Zahl als vorzeitigen Studienendpunkt-Marker zu verwenden und somit früher eine prognostische Aussage eines neuen Therapeutikums treffen zu können als zum tatsächlichen, bisherigen Endpunkt, der Gesamtüberlebenszeit (Goldkorn et al. 2014).

Die prognostische Aussagekraft allein der Anzahl zirkulierender Tumorzellen im Blut hat ihre Stärken vor allem bei Patienten mit hohen CTC-Werten und bei Patienten,

die schon eine Chemotherapie hinter sich haben. Nachteile des CellSearch assays sind eine eingeschränkte Spezifität, da es alle Epithelzellen isoliert, die das Epithelzelladhensionsmolekül EPCAM exprimieren. Andererseits führt die Entartung von Karzinomzellen dazu, ihre charakteristischen epithelialen Eigenschaften zu verlieren. Dies führt zu einer geringeren Sensitivität des CellSearch assays und gerade diese prognoseverschlechternden Zellen werden nicht erfasst (Riethdorf and Pantel 2010). Neue, zuverlässigere prognostische Biomarker sind besonders notwendig für mCRPC-Patienten, welche eine geringe CTC-Zahl aufweisen, und für Patienten, die noch keine Chemotherapie erhalten haben, denn hier variieren die Ergebnisse zu Gesamtüberleben in Korrelation zu CTCs im Blut (Danila et al. 2014).

2.4.2.5 Molekulare Biomarker

Von besonderem Interesse sind prostata- bzw. prostatakarzinomspezifische Gene, welche in zirkulierenden Tumorzellen, aber auch als freie Genabschnitte im peripheren Blut zirkulieren. Sie enthalten Informationen über die molekularen Eigenschaften der malignen Prostataepithelzellen (Helo, Cronin, Danila, Wenske, Gonzalez-Espinoza, Anand, Koscuizka, Väänänen, et al. 2009), welche mittels einfacher Blutentnahme und anschließender Polymerase-Kettenreaktion (PCR) gewonnen werden können. So besteht das Potential dieser molekularen Biomarker darin, eine Momentaufnahme des Tumoraufbaus widerzuspiegeln - der sich innerhalb eines Patienten verändern kann – welche eine Vorhersage zu Tumorwachstum, -dynamik und -charakter zulässt und somit letztendlich Informationen zu Therapieansprechen und Gesamtüberleben enthält (Danila, Fleisher, and Scher 2011). Ziel ist es, mittels PCR Gentranskripte zu detektieren, welche sowohl in malignen Prostatakarzinomzellen vorkommen als auch bei mCRPC-Patienten im Blut zirkulieren (Danila et al. 2014).

Helo et al (Helo, Cronin, Danila, Wenske, Gonzalez-Espinoza, Anand, Koscuizka, Väänänen, et al. 2009) fanden heraus, dass die mittels PCR detektierten Gentranskripte Kalikrein 2 und Kalikrein 3 – welches für das PSA-Protein kodiert – eine hohe Korrelation mit dem Auftreten von CTCs im Blut und mit dem Gesamtüberleben aufweisen. Danila et al postulierte (Danila et al. 2014), dass u. a. diese Gene in Zusammenschau mit CTCs komplementäre Informationen zu

Prognose und Therapieanschlagen geben. Des Weiteren ermöglichen sie eine bessere prognostische Aussage bei chemo-naiven Patienten.

Die Aufgabe bevorstehender Studien wird sein, Multimarker-Modelle zu etablieren, die gezielt prostataspezifische mRNA detektieren. Hierbei müssen Standards für die qPCR-Assays geschaffen und eingehalten werden, um valide, reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

2.5 Ziel dieser Studie

In dieser Studie wurden zuerst Gentranskripte ermittelt, welche sowohl in Prostatagewebe als auch im peripheren Blut von mCRPC-Patienten vermehrt exprimiert werden. Diese Zielgene wurden mittels Blutproben und anschließender standardisierter quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) in einem mCRPC-Patientenkollektiv vom Mount Sinai Hospital in New York, USA, bestimmt. Als Negativkontrolle diente eine Gruppe gesunder Freiwilliger. Nach Korrelation des Vorkommens bestimmter Gentranskripte mit dem Gesamtüberleben wurde ein Multimarker-qPCR-Assay erstellt. Dieses Modell wurde an einer mCRPC-Patientengruppe im Klinikum Rechts der Isar, München, angewandt. Diese Patienten erhielten verschiedene Therapieregime, wobei zuvor, währenddessen und nach Therapieende Blutentnahmen zur Genmarkerbestimmung erfolgten. Anhand des Markermodells gelang eine Einteilung der Patienten in eine günstige oder ungünstige Prognosegruppe jeweils vor und unter einer neuen Systemtherapie beim mCRPC. Anhand des Verlaufs vor und unter Therapie wurde des Weiteren untersucht, inwiefern sich dieses Genmarkermodell zur Beurteilung des Therapieansprechens eignet.

3 Patienten, Material und Methoden

3.1 Rahmenbedingungen

Das Patientenkollektiv unserer Studie bestand aus einer Trainingskohorte New Yorker CRPC-Patienten, welche 2010 - 2013 im Mount Sinai Krankenhaus behandelt wurden (n=22), einer Validierungskohorte Münchener CRPC-Patienten, welche 2009 - 2013 im Klinikum Rechts der Isar behandelt wurden (n=86), und einer Kontrollgruppe gesunder Männer (n=40), (siehe Patientencharakteristika). Alle unterschrieben vor Studieneinschluss eine von der lokalen Ethikkommission bewilligte Einwilligungserklärung.

Der primäre prognostische Endpunkt der Studie war das Gesamtüberleben. In Zusammenhang mit dem Therapieansprechen wurde das Gesamtüberleben, das PSA-progressionsfreie Überleben nach den Kriterien der Prostate Cancer Working Group (Scher et al. 2008) und das klinische progressionsfreie Überleben untersucht. Letzteres ist definiert bis zum Eintreten eines der folgenden Kriterien: die Verschlechterung oder das Neuauftreten krankheitsbezogener Symptome und Komplikationen, radiologische Progression laut RECIST-Kriterien (Scher et al. 2005), zwei oder mehr neue Knochenmetastasen oder das Eintreten des Todes (Scher et al. 2009).

3.2 Sammeln der Blutproben

Die Blutproben der Patienten wurden in 2,7 ml PAXgene™ Blood RNA Tubes (QIAGEN) gesammelt und bei -80° C aufbewahrt. Die Blutentnahmen erfolgten innerhalb einer Woche vor Beginn der Chemotherapie und 9-16 Wochen nach Therapiebeginn. Die Blutproben der Trainingskohorte wurden zu diversen Zeitpunkten entnommen. Die PAXgene™ Blood RNA Tubes enthalten ein Reagenz, welches die RNA-Moleküle vor Abbau durch RNasen schützt und Ex-vivo-Veränderungen der Genexpression minimiert - somit also für eine maximale Stabilität der RNA sorgt.

3.3 RNA-Extraktion aus Vollblutproben

3.3.1 Material und Reagenzien für die RNA-Extraktion

3.3.1.1 Reagenzien

Aqua bidest.	GIPCO Invitrogen
PAXgene® Blood RNA Kit	QIAGEN GmbH, Hombrechtikon, CH
Ethanol absolut	Merck KGaA

3.3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Filtertips 1250 µl, 200 µl, 10 µl	Biozym
Reaktionsgefäß 2 ml	Süd-Labor-Bedarf GmbH
Filter für 2 ml Reaktionsgefäße aus PAXgene® Blood RNA Kit	QIAGEN GmbH

Anmerkung: alle Materialien, die zur RNA-Synthese verwendet wurden, waren RNase-frei

3.3.1.3 Laborgeräte

Zentrifuge 4515R Eppendorf	Eppendorf
Blockthermostat BT 100	Kleinfeld
Absauger Atmolit 16 N	ATMOS Medizin Technik GmbH & Co.
Tischzentrifuge QikSpin	Süd-LaborBedarf GmbH
Vortexer MS1 Minishaker	IKA®

3.3.2 Ablauf der RNA-Extraktion

Die RNA-Konzentrierung und -Aufreinigung wurde mittels PAXgene™ Blood RNA Kit (QUIAGEN) durchgeführt. Hierbei wurden die Schritte des Protokolls zur manuellen Reinigung von Gesamt-RNA aus humanem Vollblut befolgt.

1. Zum Erzielen einer kompletten Lyse der Blutzellen, Inkubation der PAXgene™ Blood RNA Tubes für mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur (20 °C).
2. Abzentrifugieren des PAXgene™ Blood RNA Tube für 10 min bei 5.000 g.
3. Pipettieren des Überstandes und Hinzufügen von 4 ml RNase-freiem Wasser; Vierschließen mit neuem Sicherheitsverschluss.
4. Kurze Resuspension des Pellets mittels Vortex und Wiederholung des Zentrifugationsschrittes.
5. Auflösen des Pellets mit 350 µl Resuspensionspuffer.
6. Zugabe von 300 µl Bindungspuffer und 40 µl Proteinkinase K. Inkubation des Lysates für 10 min bei 55 °C in einem Schüttelinkubator bei 1400 rpm zum Verdauen der Proteine.
7. Zur Homogenisation und Entfernung restlicher Zelltrümmer Zentrifugation des Lysates mittels einer Homogenisier-Spinsäule für 3 min bei 20.000 g.
8. Mischen des Überstandes mit 350 µl Ethanol mittels Vortex.
9. Überführen 700 µl der Alkohol-fällung in eine PAXgene™ RNA-Spinsäule, die zuvor in ein 2-ml-Processing-Tube gesteckt wurde, und Zentrifugation für 1 min bei 20.000 g. Bei dieser Zentrifugation bindet RNA selektiv an die PAXgene™ Silica-Membran und Kontaminationen passieren diese. Verwerfen des Durchflusses und Überführen der RNA-Spinsäule in ein neues 2-ml-Processing-Tube.
10. Pipettieren des Restes der Probe auf die Säule, erneute Zentrifugation und Verwerfen des Durchflusses. Auf dem Filter der RNA-Spinsäule sollte sich nun die gesamte large RNA befinden. Large RNA enthält neben der lncRNA (long non-coding RNA) die mRNA (messenger RNA), welche hier von Interesse ist, da sie der Informationsträger der zu transkribierenden Proteine ist.
11. Aufreinigung der large-RNA in mehreren Waschschritten, um restliche Kontaminationen zu entfernen: Zufügen von 350 µl Waschpuffer 1 auf die RNA-Spinsäule, Zentrifugation für 1 min bei 20.000 g. Anbringen der Säule auf ein neues 2-ml-Processing-Tube und Verwerfen des Eluats.

12. Pipettieren eines 10- μ l-DNase-I-Stammlösung-70- μ l-DNA-Verdaupuffer-Gemisches direkt auf die Membran der RNA-Spinsäule und Inkubation für 15 min bei 30 °C, um gebundene Reste von DNA zu entfernen.
13. Wiederholen des ersten Waschschrilles, wie oben beschrieben.
14. Erfolgen des dritten Waschschrilles mit 500 μ l Waschpuffer 2, zuvor Beifügen des 4-fachen an Volumen Ethanol. Nachfolgend Zentrifugation für 1 min bei 20.000 g. Erneutes Überführen der Spinsäule in ein neues Reaktionsgefäß und Verwerfen des Eluats.
15. Wiederholen des dritten Waschschrilles, diesmal Zentrifugieren für 3 min bei 20.000 g und danach noch einmal für 1 min mit jeweiligem Verwerfen des Durchflusses.
16. Anbringen der Spinsäule in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß und Pipettieren von 40 μ l Elutionspuffer direkt auf die Membran. Durch Zentrifugation für 1 min bei 20.000 g Elution der RNA.
17. Wiederholen des vorherigen Schrittes mit erneut 40 μ l Elutionspuffer im selben Reaktionsgefäß, um restliche RNA-Mengen aus dem Filter zu gewinnen.
18. Inkubation des Eluats bei 65 °C zur Denaturierung der RNA. Danach Kühlen des Materials direkt auf Eis.

3.3.3 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Quantifizierung erfolgte im Rahmen von spektralphotometrischen Messungen. Hierfür wurde ein Biophotometer (Nanodrop 2000c Spectrophotometer, Peqlab, Erlangen) verwendet und die optische Dichte der Proben bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}) in ultraviolettem Licht bestimmt. Zuvor wurden die Proben mit 10 mM TrisCl (pH 7,5) verdünnt. Die verdünnten RNA-Proben wurden auf den Biophotometer gegeben und die OD_{260} im Vergleich zu einem Leerwert gemessen. Die Leerwert-Substanz setzte sich aus Elutionspuffer (gleiche Menge wie RNA-Probe) und 10 mM TrisCl zusammen. Eine Absorptionseinheit bei 260 nm entsprach einer RNA-Konzentration von 44 μ g/ml. Unter Berücksichtigung der Verdünnung konnte so die RNA-Ausbeute errechnet werden. Zusätzlich wurde der Reinheitsgrad der Proben bestimmt, indem noch die Absorption bei 280nm

gemessen wurde. Hohe Werte in diesem Bereich sprechen für eine Verunreinigung der Proben. Reine RNA sollte ein OD₂₆₀/OD₂₈₀-Verhältnis von 1,8-2,2 aufweisen. Proben, die Werte unter 1,8 aufwiesen, wurden verworfen.

Nach den biophotometrischen Messungen wurden die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

3.4 Reverse Transkriptase-Reaktion

3.4.1 Material und Reagenzien für die Reverse Transkriptase-Reaktion

3.4.1.1 Reagenzien

RNase-freies Aqua bidest.	GIBCO Invitrogen
Eis	Laboreigene Eismaschine
Superscript® VILO™ cDNA Synthesis Kit	invitrogen™ by life technologies

3.4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen 200 µl, 20 µl, 10 µl	Corning
Reaktionsgefäß 0,2 ml	Biozym®
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Süd-LaborBedarf GmbH

3.4.1.3 Laborgeräte

Tischzentrifuge QikSpin	Süd-LaborBedarf GmbH
Vortexer MS1 Minishaker	IKA®
Thermocycler MJ-Research PTC-200	Bio-Rad

3.4.2 Prinzip der reversen Transkriptase-Reaktion

Um die einzelsträngige RNA in eine doppelsträngige cDNA umzuschreiben, ist das Enzym Reverse Transkriptase notwendig. Im Vergleich zur relativ instabilen RNA ist die cDNA deutlich stabiler und dadurch besser geeignet für eine längerfristige Aufbewahrung. Zudem ist sie das Ausgangsmaterial der nachfolgenden Polymerase-Kettenreaktion.

3.4.3 Durchführung der reversen Transkriptase-Reaktion

Ziel war es, eine cDNA-Konzentration von 100 ng/µl in einem Gesamtvolumen von 20 µl zu erhalten. Zunächst wurden die im cDNA-Synthese-Kit enthaltenen Reagenzien in ein 0,2 ml Gefäß auf Eis pipettiert.

Reagenz	Volumen in µl
10 X Puffer	2
10 X RT Random Primers	2
25 X dNTP Mix	0,8
Multiscribe Reverse Transkriptase	1
RNase Inhibitor	1
Gesamtvolumen	6,8

Nun wurde ein bestimmtes Volumen des RNA-Eluats hinzupipettiert, welches 2000 ng RNA entsprach, um die erwünschte Endkonzentration von 100 ng/µl zu erhalten. Das Reaktionsgefäß wurde mit nukleasefreiem Aqua bidest. aufgefüllt, bis zu einem Endvolumen von 20 µl.

Der nächste Schritt war die Transkription der RNA in cDNA im Thermocycler in drei Einstellungsphasen: zuerst für 10 min bei 25 °C, danach für 120 min bei 37 °C und zuletzt 5 sec lang bei 85 °C.

Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die synthetisierte cDNA bei - 20 °C aufbewahrt.

3.5 quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

3.5.1 Material und Reagenzien für die qRT-PCR

3.5.1.1 Reagenzien

RNase-freies Aqua bidest.

GIBCO Invitrogen

TaqMan® Gene expression master mix

Applied Biosystems

TaqMan® Primer für qRT-PCR

Applied Biosystems

Referenzgen	Gensymbol	Bestellnummer
Androgenrezeptor	AR	Hs00171172_m1
Baculovirus IAP repeats 5	IRC5/ Survivin	Hs00153353_m1
Carboanhydrase 9	CA9	Hs00154208_m1
Cytokeratin 20	CK20	Hs00300643_m1
Epidermal growth factor receptor	EGFR	Hs01076078_m1
Epithelial cell adhesion molecule	EPCAM	Hs00158980_m1
Golgie membrane protein 1	GOLM1	Hs00213061_m1
Kallikrein 2	KLK2	Hs00428383_m1
Kallikrein 3	KLK3	Hs03063374_m1
Kallikrein 4	KLK4	Hs00191772_m1
Kallikrein 5	KLK5	Hs01548153_m1
Kallikrein 14	KLK14	Hs00983579_m1
Kallikrein 15	KLK15	Hs00213832_m1
Prostate cancer gene 3	PCA3	Hs01371938_m1

Plasminogen activator urokinase	PLAU	Hs01547054_m1
Plasminogen aktivator urokinase receptor	PLAUR	Hs00182181_m1
Prostate stem cell antigen	PSCA	Hs00194665_m1
Prostate-specific membrane antigen	PSMA	Hs00379515_m1
Serine protease inhibitor Kazal-type 1	SPINK1	Hs00162154_m1
Telomerase reverse transcriptase	hTERT	Hs00972656_m1
Transmembrane protease, serine 2	TMPRSS2	Hs00237175_m1
Transient receptor potential cation channel subfamily M member 8	TRPM8	Hs00375481_m1

Tabelle 1: Gensequenzen der Zielgene

Referenzgen	Gensymbol	Bestellnummer
Hypoxanthine phosphoribosyl-transferase 1	HPRT1	Hs01003267_m1
Tyrosine-3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	YWHAZ	Hs00237047_m1
Ubiquitin C	UBC	Hs00824723_m1

Tabelle 2: Gensequenzen der Referenzgene

3.5.1.2 Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen 200 µl, 20µl, 10µl

Corning

96-Well Hard Shell® Platte

Bio-Rad

Microseal® 'B' Film

Bio-Rad

Reaktionsgefäß 0,2 ml

Biozym®

Reaktionsgefäß 1,5 ml

Süd-LaborBedarf GmbH

3.5.1.3 Laborgeräte

Tischzentrifuge QikSpin	Süd-LaborBedarf GmbH
Vortexer MS1 Minishaker	IKA®
Real Time PCR Thermocycler CFX 96	Bio-Rad
Zentrifuge 5810 Eppendorf	Eppendorf

3.5.2 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion

Der Nachweis der in Tabelle 1 genannten Gensequenzen erfolgte mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion. Die PCR ist ein Verfahren, bei dem in-vitro das Prinzip der DNA-Replikation nachgeahmt wird, um bestimmte DNA-Sequenzen zu amplifizieren und dadurch nachzuweisen.

Der Ablauf einer PCR wird im Folgenden beschrieben:

Zuerst werden in einem Reaktionsansatz die benötigten Materialien zusammengefügt: Eine DNA-Matrize, die die nachzuweisenden Gensequenzen enthält; spezifische Primer, die als Startpunkte für die DNA-Polymerase dienen; eine hitzestabile DNA-Polymerase; Nukleotide (dNTPs) als Bauteile der amplifizierten DNA-Ketten; Puffer und $MgCl_2$, die für optimale Arbeitsbedingungen der DNA-Polymerase sorgen.

Nun wird durch zyklisches Wiederholen folgender drei Schritte die Amplifikation der gewünschten Gensequenzen erreicht.

1. Denaturierung: Durch Erhitzen des DNA-Doppelstrangs auf 94 °C lösen sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen. Es resultieren zwei komplementäre DNA-Einzelstränge.
2. Annealing: Bei ca. 50 °C binden die Primer an den DNA-Strang. Für eine zu amplifizierende Gensequenz benötigt man zwei spezifische Primer. Die Primer sind jeweils komplementär zu den 3'-Enden der Nukleinsäuresequenz des zu amplifizierenden Gens in beiden Einzelsträngen.
3. Elongation: Bei ca. 72 °C synthetisiert die hitzestabile DNA-Polymerase einen komplementären DNA-Strang mit Hilfe der bereitgestellten dNTPs, ausgehend von den Primern. Dies erfolgt in 3'-5'-Richtung.

Somit ist der gewünschte DNA-Abschnitt zwischen den Primern verdoppelt. Es erfolgt der nächste Zyklus. Die Anzahl der Zyklen beträgt ca. 40 und man erhält eine Vervielfachung der Ursprungsmatrix um ca. den Faktor 2^{40} .

Ein kompletter PCR-Durchlauf lässt sich in drei Phasen einteilen. Zu Beginn der Amplifikationen sind alle Reagenzien ausreichend vorhanden. Dies führt zu einer exponentiellen Phase, in der sich pro Zyklus die Zielsequenzen verdoppeln. Nachdem ein Großteil der Reagenzien aufgebraucht ist, geht die PCR in eine lineare Phase über, bis sie zum Schluss eine Plateauphase erreicht, bei der keine neuen Amplifikationsprodukte entstehen (Horn 2009).

Zum Nachweis der Genprodukte wurde in diesem Projekt die quantitative real-Time PCR (qPCR) angewandt. Bei dieser Methode findet direkt nach jedem Zyklus eine Messung der entstandenen Genreplikationen mittels Fluoreszenzsignalen statt. Der Fokus der Messungen liegt in der exponentiellen Phase. Somit kann direkt ein Ansteigen der Replikationen über einen Schwellenwert – dem Hintergrundrauschen – detektiert werden. Die entstehenden Fluoreszenzsignale steigen proportional zur Genkopienzahl an und lassen somit Rückschlüsse über die entstandene Menge des Genprodukts zu. Nun gibt es unterschiedliche Verfahren zur Detektion der replizierten Gensequenzen, welche auf dem Prinzip der Aussendung eines Fluoreszenzsignals basieren. In diesem Projekt wurde die Detektionsmethode mittels TaqMan-Assay verwendet. Fluorophormarkierte Oligonukleotidsonden binden hier spezifisch an Gensequenzen, die Bestandteile der amplifizierten Ziel-DNA sind. Die TaqMan Sonde besteht aus einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff (z.B. FAMTM) am 5'-Ende, danach einer Abfolge der Oligonukleotide, die an die Zielsequenz bindet, und einem nicht-fluoreszierenden Inhibitor – dem sogenannten Quencher – am 3'-Ende. Zu Beginn der Reaktion verhindert die räumliche Nähe von Reporter und Quencher zueinander ein Fluoreszieren. In Anwesenheit der Zielsequenz jedoch bindet die Sonde zwischen die Primer und wird von einer 5'-Nuklease-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase verlängert. Die so entstandene Separation von Reporter und Quencher löst eine Emission des Fluoreszenzsignals aus. Danach wird die Sonde wieder vom DNA-Strang entfernt, um ein Fortfahren der DNA-Replikation nicht zu behindern. Je höher die Kopienzahl der gesuchten Gene zu Beginn der Reaktion ist, umso höher ist deren Amplifikation und umso früher tritt ein signifikanter Anstieg des Fluoreszenzsignals auf (Applied Biosystems, Introduction to Gene Expression).

3.5.3 Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion

Die qPCR wurde in einem Reaktionsansatz mit dem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt, der folgende Reagenzien enthielt: die zuvor synthetisierte cDNA, welche 100 ng RNA entsprach; Taqman® Gene Expression Master Mix (Life Technologies™); Taqman® Primer und Hybridisierungs-Sonden – diese waren komplementär für die gesuchten zu amplifizierenden Gensequenzen. Zusätzlich wurden Primer und Sonden genutzt, um die in jeder Zelle ubiquitär vorkommenden endogenen Referenzgene (Tabelle 2: Gensequenzen der Referenzgene) zu detektieren. Dadurch konnte ein allgemeines Genexpressionsverhalten jeder Probe gemessen werden und für die Normalisierung der Ergebnisse der Zielgene verwendet werden.

Die Proben wurden in eine 96-Wells Hardshell-Platte in Duplikaten pipettiert und die Platte mit einem Microseal verschlossen. Jede Platte enthielt zusätzlich cDNA der LnCAP- und VCAP- Prostatakarzinomzelllinien als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle (Non-Template-Control) wurde dem Reaktionsansatz H₂O anstelle von cDNA hinzugefügt. Ein positives Amplifikationsergebnis in diesem Well hätte für eine Kontamination gesprochen.

Nach einem Zentrifugationsschritt wurde die Platte in den Real Time PCR Thermocycler (Bio-Rad) gestellt und die qPCR lief unter folgenden Einstellungen ab:

1. 10 min bei 95 °C
2. 15 sec bei 95 °C
3. 1 min bei 60 °C
4. 45-maliges Wiederholen von Schritt 2 und 3.

3.5.4 Auswertung der qRT-PCR

Die Software des Sequence Detection Systems (SDS) des Cyclers erstellte im Verlauf der Amplifikation ein Diagramm, welches die Präsenz und die Quantität der im Genmaterial enthaltenen Marker veranschaulichte. Hierbei stellte die x-Achse die Anzahl der Amplifikationszyklen dar und die y-Achse das Fluoreszenzsignal. Sobald ein Marker begann zu replizieren, überstieg dessen Signalintensität den Schwellenwert (Threshold) der Hintergrundfluoreszenz. Den Zyklus, bei dem dies der Fall war, nennt man Ct-Wert (Cycle Threshold). Dabei gilt: Je größer die Menge der

vorhanden DNA, desto früher tritt der Cycle Threshold ein. Da jede cDNA-Probe als Duplikat angelegt wurde, nahm man für weitere Analysationsschritte den Ct-Mittelwert dieser beiden. Kam es nur bei einer der beiden Proben zur Amplifikation, wurde dieser einzelne Ct-Wert benutzt.

Zur Bestimmung des Expressionsverhaltens der DNA-Sequenzen wurde die Methode der relativen Quantifizierung genutzt. Dabei wird die Menge der Zielsequenzen im Verhältnis zu einem Referenzgenindex in einem Kalibrator gemessen. Die genutzten endogenen Referenzgene waren in diesem Fall HPRT1, UBC und YWHAZ. Für die Kalibrierungsproben wurden 10 VCAP-Zellen (als Kalibrator nur für den Marker TRPM8) oder 10 LnCAP-Zellen (als Kalibrator für die restlichen Marker) verdünnt in 10^6 PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) verwendet. Dem relativen Expressionsverhalten der Referenzgene im Kalibrator wurde der Wert von 1.0 zugewiesen. Zum Errechnen der Zielsequenzmengen wurde die $\Delta\Delta Cq$ -Methode verwendet:

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq - \Delta Cq_{cb}$$

ΔCq , der normalisierte CT der Probe, entspricht der Differenz zwischen dem CT der Zielsequenz der Probe und dem Referenzgenindex der Probe. ΔCq_{cb} ist der normalisierte CT des Kalibrators. Da es sich um eine logarithmische Gleichung handelt, muss zum Schluss der Wert $2^{-\Delta\Delta Cq}$ errechnet werden, um die relative Expression der Zielsequenz zu erhalten (Livak and Schmittgen 2001).

Sequenzen, bei denen es nach 45 Zyklen zu keiner Amplifikation kam, erhielten den Wert 0.

Die Sensitivität der qRT-PCR für unsere Marker wurde anhand von Verdünnungsreihen ermittelt. Dabei wurden LnCAP- und VCAP-cDNA in Wasser (von 100 ng bis 1 pg) sowie LnCAP- und VCAP-Zellen in 10^6 PBMCs (von 1000 bis 0) als Triplikate pipettiert und mittels qPCR analysiert.

Die Ergebnisbeschreibung hält sich an die Richtlinien für „Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time Experiments“ (Bustin et al. 2009).

3.6 Statistische Auswertung

Die statistischen Daten wurden mit dem IBM SPSS Statistik Programm der Version 22.0 ausgewertet. Zur Berechnung der Gesamtüberlebenszeit wurde die Zeitspanne zwischen der ersten Blutentnahme bis zum Datum des Todes bzw. des letzten

Nachsorgedatums verwendet. Wilcoxon-Mann-Whitney-Analysen wurden genutzt, um die Genexpression zwischen der Kontroll- und der Trainingskohorte zu vergleichen. Für die Überlebensanalyse wurden die Patienten der Trainings- und der Validierungskohorte zum Zeitpunkt der prätherapeutischen Blutentnahme dichotomisiert, mit dem medianen Genexpressionslevel als Schwellenwert. Korrelationen mit dem Gesamtüberleben, PSA-progressionsfreiem Überleben und klinisch-progressionsfreiem Überleben wurden mittels Kaplan-Meier-Kurven mit log-rank Statistik und Cox-Regressionsanalysen mit hazard-ratios (HR) und 95%-Konfidenzintervallen (KI) errechnet.

4 Ergebnisse

Patientencharakteristika

Das Patientenkollektiv dieser Studie setzte sich zusammen aus einer Trainingskohorte (n=22), einer Validierungskohorte (n=86) und einer Kontrollgruppe. Alle Patienten unterschrieben vor Studieneinschluss eine von der lokalen Ethikkommission bewilligte Einverständniserklärung.

Die Trainingskohorte bestand aus 22 Patienten mit CRPC, welche mit verschiedenen Therapieregimen in der onkologischen Abteilung des Mount Sinai Medical Center in New York, USA, im Zeitraum von 2010-2014 behandelt wurden. Das mediane Alter der Patienten lag bei 69 Jahren, die Altersspanne bei 45-90 Jahren. Der mediane PSA-Wert der Patientengruppe betrug 35 ng/ml (0-2934 ng/ml), die medianen Blutwerte für Hämoglobin waren 11,4 g/dl (8,1-15,0 g/dl) und für die alkalische Phosphatase (AP) 111 U/l (36-1477 U/l). Der mediane Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status (ECOG) betrug 1 (0-2) und der mediane Gleason Score betrug 8 (6-9). Alle 22 Patienten hatten bereits eine vorangehende systemische Therapie für die Indikation des CRPC erhalten: 4 Patienten (18%) erhielten Docetaxel, 10 Patienten (46%) Abiraterone, 2 Patienten (9%) Cabazitaxel und 6 Patienten (27%) eine andere Systemtherapie. Die mediane Anzahl der vorangegangenen Therapieregime bezogen auf alle Patienten war 1 (0-4). 16 Patienten (89%) wiesen Knochenmetastasen auf, 3 Patienten (11 %) viszerale Metastasen. 9 Patienten (41%) verstarben im Laufe der Behandlung. Der mediane Nachbeobachtungs-Zeitraum betrug 11,8 Monate (0-36,9 Monate), das mediane Gesamtüberleben 18,7 Monate (8,1-29,4 Monate).

Die Validierungskohorte setzte sich zusammen aus 86 Patienten mit kastrationsresistentem Prostatakarzinom, die im Zeitraum von 2009-2013 in der Urologischen Klinik des Klinikums Rechts der Isar der TU München behandelt wurden. Alle Patienten erfüllten bei Einschluss die Kriterien einer progressiven Erkrankung der Prostata Cancer Working Group 2 (Scher et al. 2009). Das mediane Alter dieser Patientengruppe war 69 Jahre, die Altersspanne 50-87 Jahre. Der mediane PSA-Wert dieser Patienten betrug 245 ng/ml (0-7342 ng/ml). Die medianen Blutwerte für Hämoglobin waren 11,4 g/dl (7,6-16,1 g/dl), für AP 147 U/l (50-1899 U/l)

und für Laktatdehydrogenase (LDH) 333 U/l (47-2289 U/l). Der mediane ECOG betrug 0 (0-2), der mediane Gleason score 8 (3-10). 78 Patienten (95%) wiesen Knochenmetastasen auf, 34 Patienten (41%) viszerale Metastasen. Im Verlauf der Studie verstarben 68 (79%) der Patienten. Der mediane Nachbeobachtungs-Zeitraum lag bei 8,5 Monaten (0,4-44,2 Monate). Das mediane Gesamtüberleben betrug 10,0 Monate (7,7-12,4 Monate), das mediane PSA-progressionsfreie Überleben 3,6 Monate (3,2-4,0 Monate) und das mediane klinische progressionsfreie Überleben 4,6 Monate (2,9-6,4 Monate). Alle Patienten der Validierungskohorte standen vor einer von folgenden Systemtherapien: entweder einer Erstlinientherapie mit Docetaxel (n=21), einer erweiterten Hormontherapie mit Abiraterone nach vorangehender Chemotherapie (n=46), oder einer erweiterten Hormontherapie mit Enzalutamid nach vorangegangener Chemotherapie (n=19). Die mediane Anzahl vorangegangener Therapieregime betrug 1 (0-3). 61 Patienten (73%) hatten sich bereits einer Docetaxeltherapie unterzogen, 17 Patienten (20%) einer Abiraterontherapie, 15 Patienten einer Cabazitaxeltherapie (18%) und 9 Patienten einer anderen Systemtherapie (10%).

Die Kontrollgruppe bestand aus 43 gesunden männlichen Freiwilligen unter 40 Jahren. Die Patientencharakteristika sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

	New Yorker Trainingskohorte	Münchener Validierungskohorte
Patientenzahl	22	86
Alter in Jahren, Median (Spanne)	69 (45-90)	69 (50-87)
Blutwerte, Median (Spanne)		
PSA, ng/ml	35 (0-2934)	245 (0 -7342)
Hämoglobin, g/dl	11,4 (8,1-15,0)	11,4 (7,6-16,1)
AP, U/l	111 (36-1477)	147 (50-1899)
LDH, U/l	N/A	333 (47-2289)
ECOG, Median (Spanne)	1 (0-2)	0 (0-2)
Vorangegangene Systemtherapien für das CRPC, N= (%)		
Docetaxel	4 (18)	61 (73)
Abiraterone	10 (46)	17 (20)
Cabazitaxel	2 (9)	15 (18)
Andere	6 (27)	9 (10)
Vorangegangene Systemtherapieregime für das CRPC, Median (Spanne)	1 (0-4)	1 (0-3)
Gleason Score, Median (Spanne)	8 (6-9)	8 (3-10)
Metastasierung, N= (%)		

Knochen	16 (89)	78 (95)
Weichteilgewebe	3 (11)	34 (41)
Verstorben, N= (%)	9 (41)	68 (79)
Nachbeobachtungszeitraum, Monate, Median (Spanne)	11,8 (0,0-36,9)	8,5 (0,4-44,2)
OS, Monate, Median (95%CI)	18,7 (8,1-29,4)	9,0 (6,7-11,4)
PSA-PFS, Monate, Median (95%CI)	-	3,6 (3,2-4,0)
Klin. PFS, Monate, Median (95%CI)	-	4,6 (2,9-6,4)

Tabelle 3: Patienteneigenschaften

4.1 Selektion der Zielgene

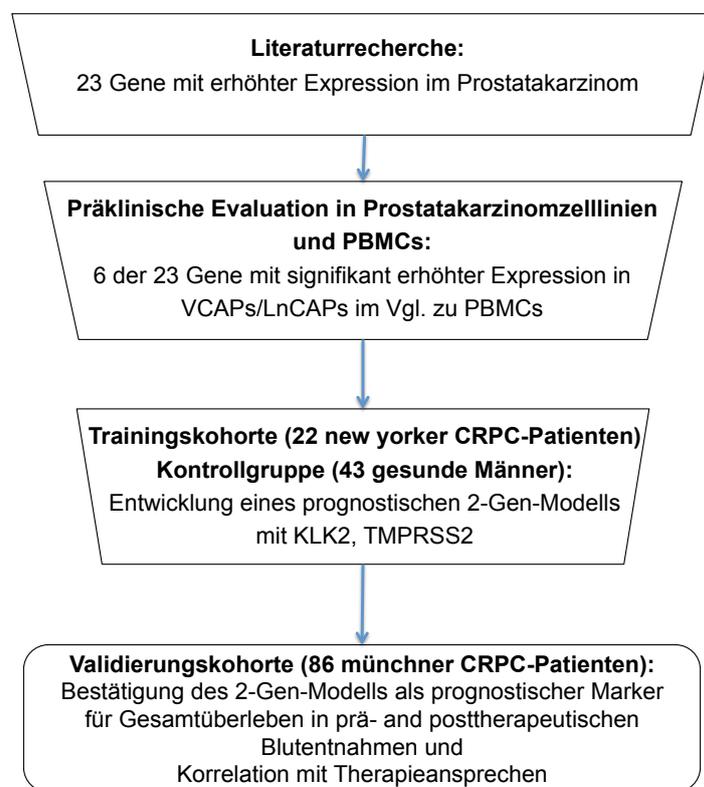


Abbildung 1: Arbeitsschritte der Zielgenselektion und Entwicklung des 2-Gen-Modells (CRPC = kastrationsresistentes Prostatakarzinom, PBMC = Periphere mononukleare Blutzellen)

Abbildung 1 gibt eine Übersicht der Arbeitsschritte der Entwicklung unseres Genmodells. Im Rahmen einer Literaturrecherche im Jahre 2013 wurden 23 Gene ausfindig gemacht, welche eine erhöhte Expression in Prostatakarzinomzellen bzw. in peripheren Blutzellen von Prostatakarzinompatienten aufweisen. Diese Gene sind in Tabelle 4 zusammen mit drei ubiquitär vorkommenden Referenzgenen aufgelistet.

Als nächster Schritt wurden mittels qPCR-Assays die Expressionslevels dieser Gene in den Prostatakarzinomzelllinien VCAP und LnCAP untersucht. Als Referenz wurde ebenfalls die Expression dieser Gene in PBMCs (peripheral blood mononuclear cells), gewonnen aus mononuklearen Zellen von fünf gesunden Freiwilligen, untersucht.

Gensymbol	Genexpression (Cq) in LnCAP	Genexpression (Cq) in VCAP	Genexpression (Cq) in PBMC (höchste Expression in 5 Proben)
AR	25,69	21,98	30,97
BIRC 5/Survivin	26,72	26,19	29,37
CA 9	35,94	37,92	36,27
CK 20	36,21	41,28	41,27
EGFR	30,79	30,90	40,08
EPCAM	27,99	25,31	35,24
GOLM1	25,36	-	29,39
KLK2	24,36	19,65	38,80
KLK3	19,76	22,93	39,75
KLK4	24,31	23,95	37,55
KLK5	40,01	-	-
KLK14	36,65	32,07	34,76
KLK15	33,87	33,45	-
PCA3	38,03	-	41,31
PLAU	39,07	35,35	29,40
PLAUR	34,36	31,99	28,01
PSCA	33,12	34,11	37,47
PSMA	23,41	26,96	38,59
SPINK1	37,31	30,77	37,25
hTERT	33,73	33,42	33,01
TMPRSS2	24,83	23,68	40,07
TRPM8	40,21	26,03	-
HPRT1	26,20	23,49	26,30
YWHAZ	23,74	18,61	21,46
UBC	24,51	20,71	21,49

Tabelle 4: Gensymbol mit der Genexpression in LnCAP-Zellen, VCAP-Zellen und PBMC-Proben. Gene mit hoher Expression in LnCAP- oder VCAP-Zellen (Cq <28) und niedriger Hintergrundexpression in 5 PBMC-Proben

(Cq>38) wurden für die weitere Analyse in peripherem Blut von CRPC-Patienten verwendet (fett gedruckt). Cq= Cycle threshold, PBMC= peripheral blood mononuclear cells

Sechs Gene (KLK2, 3, 4, PSMA, TRMPSS2 und TRPM8) mit hoher Expression in LnCAP- bzw. VCAP-Zellen (Cq<28) und gleichzeitig geringer oder nicht vorhandener Expression in PBMCs (Cq>38) wurden ausgewählt für weitere Versuche.

Methodenvalidierung der Multiplex-qPCR

Die dynamische Linearität des qPCR-Assays wurde in einer dreifach angelegten 6-log-Verdünnungsreihe überprüft und bestätigt. Hierbei wurden 100 ng bis 1 pg RNA von KLK2, KLK3, KLK4, PSMA und TMPRSS2 in LnCAP-Zelllinien bzw. TRPM8 in VCAP-Zelllinien verdünnt. Die berechnete lineare Korrelation betrug für KLK2 $r^2 = 0,987$, für KLK3 $r^2 = 0,997$, für KLK4 $r^2 = 0,994$, für PSMA $r^2 = 0,982$, für TMPRSS2 $r^2 = 0,992$, für TRPM8 $r^2 = 0,994$, für HPRT1 $r^2 = 0,991$, für UBC $r^2 = 0,992$ und für YWHAZ $r^2 = 0,993$.

Die Effizienzen der Ziel- und Referenzgene lag zwischen 90 und 102 % und wurden demnach als gleich betrachtet.

Die relative Genexpression (RGE) war über die gesamten Verdünnungsreihen hinweg stabil. Beispielhaft ist die Linearität der Cq-Werte und die RGE von KLK3 sowie der Referenzgene HPRT1, UBC und YWHAZ in LnCAP-Zellen in einer Verdünnung von 100 ng bis 1 pg in Abbildung 2 aufgeführt. Der Variationskoeffizient (CV) der RGE lag stabil unter 20% bis zu 10 pg LnCAP bzw. VCAP cDNA in allen qPCR-Analysen. Die Referenzgene hatten einen CV von unter 10% und einen mittleren M-Wert von unter 0,20. Dies spricht für eine stabile Genexpression.

Die analytische Validierung und die Sensitivität dieses Assays wurde in einer dreifach angelegten Verdünnungsreihe verifiziert, in welcher LnCAP und VCAP cDNA in 100 ng bis 1 pg Wasser verdünnt wurde sowie 0 bis 10^3 LnCAP- und VCAP-Zellen in 10^6 PBMCs verdünnt wurden. Die Verdünnungen 10^6 PBMCs versetzt mit 1, 10 und 100 LnCAP- oder VCAP-Zellen zeigten eine reproduzierbare Sensitivität von 1 bis 10 Prostatazellen für alle sechs Zielgene mit CV- und RGE-Werten unter 20%.

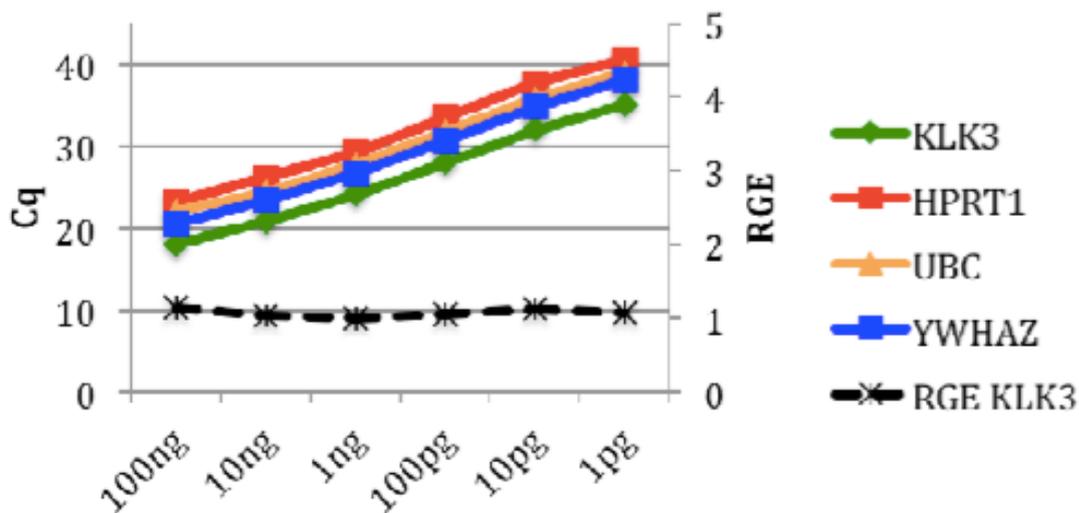


Abbildung 2: Verdünnungsreihen von LnCAP cDNA von 100ng - 1 pg. Cq-Werte des Zielgens Kallikrein 3 (KLK3) und der endogenen Referenzgene HPRT1, UBC an YWHAZ sowie die errechnete relative Genexpression (RGE) für KLK3 (Kalibrator = 1ng LnCAP DNA). RGE von KLK3 war in der gesamten Verdünnungsreihe stabil.

Nun wurde die Expression dieser sechs Gene in der New Yorker Trainingskohorte, bestehend aus 22 CRPC-Patienten, mit der Kontrollgruppe 43 gesunder Freiwilliger verglichen. Abbildung 3 zeigt den Boxplot der Genexpression der sechs prostataspezifischen RNA-Marker KLK2, KLK3, KLK4, PSMA, TMPRSS2 und TRPM8, gewonnen aus peripherem Blut, in jeweils der Trainings- bzw. der Kontrollgruppe. Nur KLK2 und TMPRSS2 wiesen im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test signifikant erhöhte Expressionswerte in CRPC-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe mit jeweils $p < 0,01$ auf.

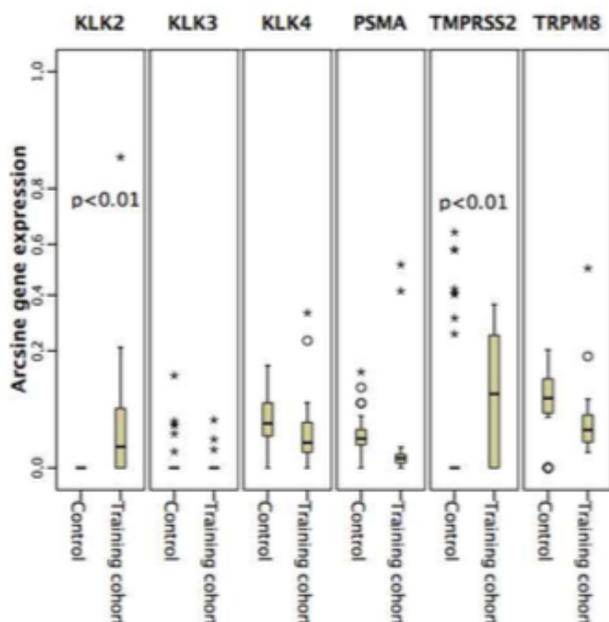


Abbildung 3: Boxplot der Genexpression prostataspezifischer RNA-Marker in peripherem Blut (KLK2, KLK3, KLK4, TMPRSS2 and TRPM8) in der Kontrollgruppe von 43 gesunden Freiwilligen und der Trainingskohorte von

22 CRPC-Patienten. Der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test zeigt eine signifikant erhöhte Genexpression für KLK2 und TMPRSS2 in CRPC-Patienten.

In einer univariaten Cox-Regressionsanalyse wurde die Expression von KLK2, KLK3, KLK4, PSMA, TMPRSS2 und TRPM8 mit dem Gesamtüberleben der Trainingskohorte korreliert (Tabelle 5). Hier zeigte KLK2 eine HR von 4,2 (95% Konfidenz-Intervall (95 % KI) = 1,0-17,5; p-Wert = 0,052), KLK3 eine HR von 1,3 (95 % KI = 0,3-6,4; p-Wert = 0,730), KLK4 eine HR von 0,6 (95 % KI = 0,2-2,5; p-Wert = 0,498), PSMA eine HR von 0,5 (95 % KI = 0,1-2,0; p-Wert = 0,313), TMPRSS2 eine HR von 4,0 (95 % KI = 1,0-16,3; p-Wert = 0,056) und TRPM8 eine HR von 1,9 (95 % KI = 0,5-7,4; p-Wert = 0,342). Somit ergaben eine hohe KLK2- bzw. TMPRSS2-Genexpression die höchste Korrelation mit der Wahrscheinlichkeit des Eintritts des Todes. Eine Kombination dieser beiden Gene erhöhte die HR auf 5,1 (KI = 1,0-25,6; p-Wert = 0,049). Dieses 2-Genmarkermodell (= 2-Gene-Panel = 2-GP) teilte die Patienten in eine Gruppe mit günstiger Prognose, in der beide Gene negativ waren, (n=9, 41%) und in eine Gruppe mit ungünstiger Prognose ein, in der mindestens ein bzw. beide Gene positiv waren (n=13, 59%).

New Yorker Trainingskohorte					
Marker	Schwellenwert	Detektionsfrequenz n (%)	HR	95% KI	p-Wert
KLK2	0,007	11 (50)	4,2	1,0-17,5	0,052
KLK3	0,001	11 (50)	1,3	0,3-6,4	0,730
KLK4	0,018	11 (50)	0,6	0,2-2,5	0,498
PSMA	0,001	11 (50)	0,5	0,1-2,0	0,313
TMPRSS2	0,219	11 (50)	4,0	1,0-16,3	0,056
TRPM8	0,022	11 (50)	1,9	0,5-7,4	0,342
2 GP	≥ Marker (KLK2, TMPRSS2) positiv	13 (59)	5,1	1,0-25,6	0,049
2 GP + KLK3	≥ Marker (KLK2, TMPRSS2, KLK3) positiv	14 (64)	4,3	0,8-21,9	0,083
2 GP +	≥ Marker	16 (73)	1,9	0,4-9,0	0,439

KLK4	(KLK2, TMPRSS2, KLK4) positiv				
2 GP + PSMA	≥ Marker (KLK2, TMPRSS2, PSMA) positiv	17 (77)	5,0	0,6-41,4	0,138
2 GP + TRPM8	≥ Marker (KLK2, TMPRSS2, TRPM8) positiv	16 (73)	5,6	0,7-46,1	0,109

Tabelle 5: Univariate Cox-Regressionsanalyse für die Korrelation der Genexpression von KLK2, KLK3, KLK4, TMPRSS2 und TRPM8 der Trainingskohorte mit dem Gesamtüberleben.

2 GP = 2-Gene-Panel (2-Genmarkermodell), KI = Konfidenzintervall, HR = Hazard ratio

Die Kaplan-Meier-Analyse ergab, dass das Gesamtüberleben in der günstigeren Prognosegruppe signifikant länger war als in der ungünstigen Prognosegruppe: medianes Überleben nicht erreicht vs. 10 Monate medianes Gesamtüberleben (95% KI 5,7-14,2; p-Wert = 0,023) (Abbildung 4).

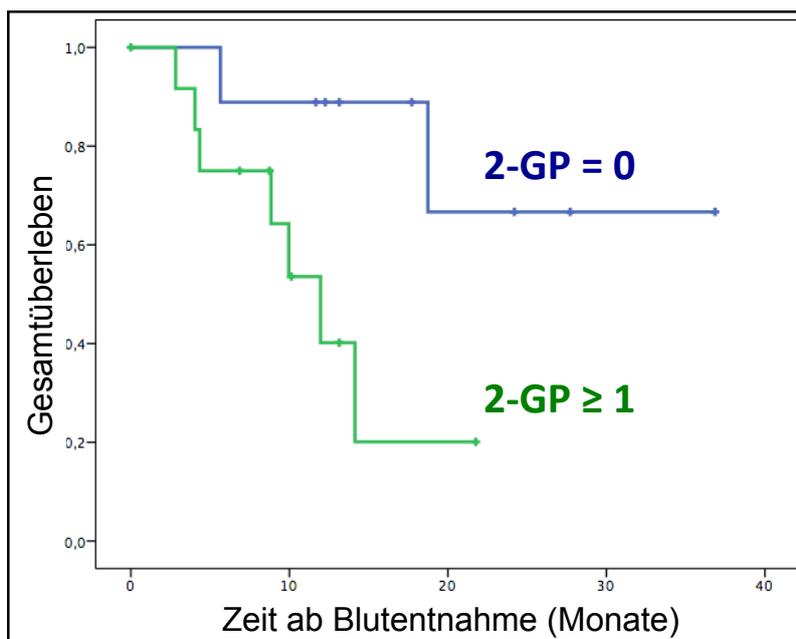


Abbildung 4: Korrelation des 2-GP, welches die Patienten in eine günstige (=0, beide Marker negativ) oder in eine ungünstige (≥1, ein bzw. beide Marker positiv) Prognosegruppe einteilt, mit dem Gesamtüberleben in der New Yorker Trainingskohorte.

Addierte man zu dem 2-Genmarkermodell KLK3, d. h. war mindestens eines der drei Gene positiv, so ergab dies eine HR von 4,3 (95 % KI = 0,8-21,9, p-Wert = 0,083). Addierte man KLK4, ergab das eine HR von 1,9 (95 % KI = 0,4-9,0, p-Wert = 0,439), addierte man PSMA, ergab das eine HR von 5,0 (95 % KI = 0,6-41,4, p-Wert = 0,138) und addierte man TRMP8, ergab das eine HR von 5,6 (95 % KI = 0,7-46,1, p-Wert = 0,109). Dies zeigte, dass eine Ergänzung anderer Gene das Prognosemodell nicht verbessert (Tabelle 5).

4.2 Prognostischer Einfluss des 2-Genmarkermodells in der Validierungsgruppe

Tabelle 6 zeigt eine univariate Cox-Regressionsanalyse für die Korrelation der Genexpression der sechs prostataspezifischen Transkripte in peripherem Blut der Münchner Validierungsgruppe vor und nach Systemtherapie mit dem Gesamtüberleben.

Vor Therapiebeginn wurde KLK2 in 43 (50%) Patienten detektiert, die HR betrug 2,3 (KI 1,4-3,8, p-Wert = 0,001). KLK3 wurde in 43 (50%) Patienten festgestellt bei einer HR von 1,4 (95 % KI = 0,9-2,3, p-Wert = 0,161). KLK4 wurde in 43 (50%) Patienten detektiert, die HR betrug 1,7 (95 % KI = 1,1-2,8, p-Wert = 0,026), PSMA in 43 (50%) Patienten, die HR betrug 1,6 (95 % KI = 1,0-2,5, p-Wert = 0,077), TMPRSS2 in 43 (50%) Patienten, die HR war 2,1 (95 % KI = 1,3-3,5, p-Wert = 0,003). TRPM8 wurde in 43 (50%) Patienten festgestellt, die HR betrug 2,1 (95 % KI = 1,3-3,5, p-Wert = 0,003).

Nach Therapieende wurde KLK2 in 12 (26%) Patienten detektiert, die HR betrug 2,3 (95 % KI = 1,1-4,8, p-Wert = 0,021), KLK3 in 13 (28%) Patienten, die HR betrug 1,7 (95 % KI = 0,8-3,4, p-Wert = 0,145), KLK4 in 24 (52%) Patienten, die HR war 1,7 (95 % KI = 0,9-3,4, p-Wert = 0,104), PSMA in 12 (26%) Patienten, die HR betrug 2,1 (95 % KI = 1,0-4,3, p-Wert = 0,042), TMPRSS2 in 15 (33%) Patienten, die HR betrug 2,7 (95 % KI = 1,4-5,5, p-Wert = 0,004) und TRPM8 wurde in 18 (39%) Patienten detektiert, mit einer HR von 1,8 (95 % KI = 0,9-3,6, p-Wert = 0,073).

Von den sechs Genen waren folglich nur KLK2 und TMPRSS2 zuverlässige Prognosemarker für das Gesamtüberleben in den Blutabnahmen vor und nach der

Systemtherapie der Validierungsgruppe mit stabil hohen HR- und signifikanten p-Werten (Tabelle 6).

Münchener Validierungskohorte					
Blutentnahme vor Therapiebeginn					
Marker	Schwellenwert	Detektionsfrequenz n(%)	HR	95% KI	p-Wert
KLK2	0,304	43 (50)	2,3	1,4-3,8	0,001
KLK3	0,097	43 (50)	1,4	0,9-2,3	0,161
KLK4	0,091	43 (50)	1,7	1,1-2,8	0,026
PSMA	0,026	43 (50)	1,6	1,0-2,5	0,077
TMPRSS2	0,822	43 (50)	2,1	1,3-3,5	0,003
TRPM8	0,111	43 (50)	2,1	1,3-3,5	0,003
Blutentnahmen nach Therapieende					
Marker	Schwellenwert	Detektionsfrequenz n(%)	HR	95% KI	p-Wert
KLK2	0,304	12 (26)	2,3	1,1-4,8	0,021
KLK3	0,097	13 (28)	1,7	0,8-3,4	0,145
KLK4	0,091	24 (52)	1,7	0,9-3,4	0,104
PSMA	0,026	12 (26)	2,1	1,0-4,3	0,042
TMPRSS2	0,822	15 (33)	2,7	1,4-5,5	0,004
TRPM8	0,111	18 (39)	1,8	0,9-3,6	0,073

Tabelle 6: Univariate Cox-Regressionsanalyse für die Korrelation von KLK2, KLK3, KLK4, TMPRSS2 und TRPM8 der Münchener Validierungskohorte mit dem Gesamtüberleben zum Zeitpunkt der Blutabnahme vor und nach der Therapie.

2GP = 2-Gene-Panel (2-Genmarkermodell), KI = Konfidenzintervall, HR = Hazard ratio

Prätherapeutische Proben

In der Validierungsgruppe (MUC) war das 2-Gen-Modell zu Beginn der Messungen in 34 Fällen günstig (40%) und in 52 Fällen ungünstig (60%). Das mediane Gesamtüberleben war signifikant länger in der günstigeren Prognosegruppe (17,3 Monate (95 % KI = 10,7-23,8) vs. 7,8 Monate (95 % KI = 6,5-9,2), p-Wert = 0,004) (Abbildung A).

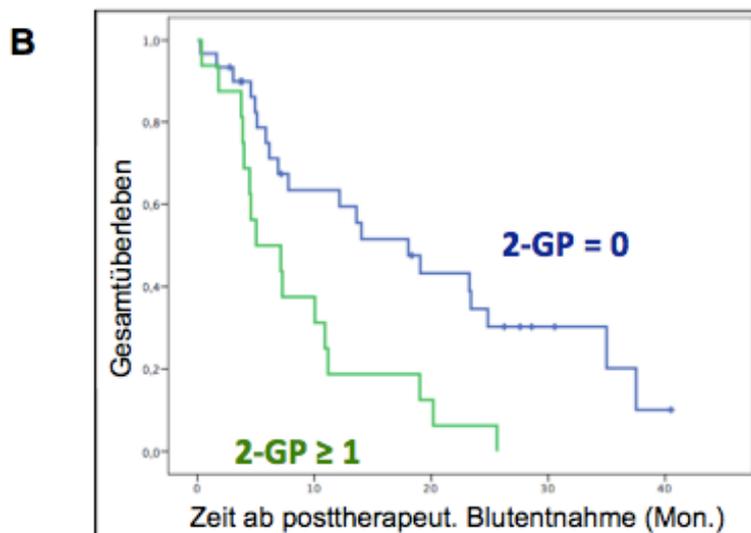
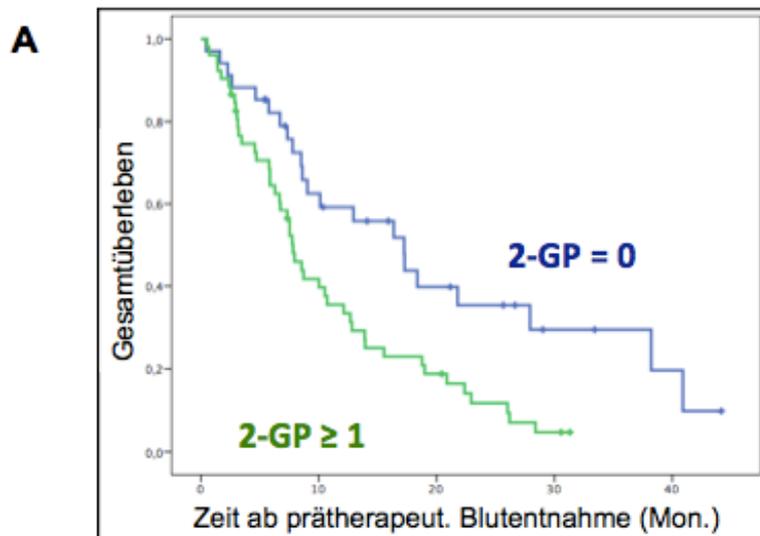


Abbildung 4: Korrelation des 2-GP, welches die Patienten in eine günstige (=0, beide Marker negativ) oder in eine ungünstige (>1, ein bzw. beide Marker positiv) Prognosegruppe einteilt, mit dem Gesamtüberleben bei der prätherapeutischen Blutentnahme (A) und bei der posttherapeutischen Blutentnahme nach 9-16 Wochen (B) in der Münchener Validierungsgruppe.

In einer uni- und multivariaten Cox-Regressionsanalyse haben wir das 2-Genmarkermodell (ungünstig vs. günstig) in Blutentnahmen vor der Systemtherapie als Prognosefaktor für CRPC-Patienten mit etablierten prognostischen klinischen Befunden bzw. Laborwerten verglichen. Dies waren der ECOG-Status (1 vs. 0; 2 vs. 0), Weichteilmetastasen (vorhanden vs. nicht vorhanden), der Hb-Wert (in g/dl, kontinuierlich), LDH (U/L, kontinuierlich), AP (U/l, kontinuierlich), der PSA-Wert (ng/dl, kontinuierlich) und der Gleason-Score (8-10 vs. 6-7). Die Cox-Regressionsanalyse wurde dem Effekt der angehenden Systemtherapie angepasst.

In der univariaten Analyse ergab der ECOG-Status 0 vs. 1 eine HR von 2,1 (95 % KI = 1,1-3,8, p-Wert = 0,024 und 1 vs. 2 eine HR von 5,4 (95 % KI = 2,6-11,4, p-Wert <0,001), Weichteilmetastasen eine HR von 1,8 (95 % KI = 1,1-3,0, p-Wert = 0,029), der HB- Wert eine HR von 0,8 (95 % KI = 0,7-0,9, p-Wert <0,001), die LDH eine HR von 1,0 (95 % KI = 1,0-1,0, p-Wert <0,001), die AP eine HR von 1,0 (95 % KI = 1,0-1,0, p-Wert <0,001), der PSA-Wert eine HR von 1,0 (95 % KI = 1,0-1,0, p-Wert = 0,132), der Gleason-Score eine HR von 0,7 (95 % KI = 0,4-1,3, p-Wert = 0,279) und das 2-GP eine HR von 2,3 (95 % KI = 1,3-4,1, p-Wert = 0,003). Somit lieferten alle Faktoren einen signifikanten Prognosewert außer dem PSA-Wert und dem Gleason Score.

In der multivariaten Analyse ergab der ECOG-Status eine HR von 0,8 (95 % KI = 0,3-1,8, p-Wert = 0,794) bzw. von 2,1 (95 % KI = 0,8-5,4, p-Wert = 0,119), Weichteilmetastasen eine HR von 1,8 (95 % KI = 1,1-3,9, p-Wert = 0,031), der Hb-Wert eine HR von 0,8 (95 % KI = 0,7-1,0, p-Wert = 0,32), die LDH eine HR von 1,0 (95 % KI = 1,00-1,00, p-Wert = 0,641), die AP eine HR von 1,0 (95 % KI = 1,00-1,00, p-Wert = 0,237) und das 2-GP eine HR von 2,1 (95 % KI = 1,1-4,0, p-Wert = 0,034). Hier waren nur die Ergebnisse der Weichteilmetastasen, des Hb-Wertes und des 2-GP-Markermodells signifikant, wobei das 2-GP die höchste HR aufwies (Tabelle 7). Dies bestätigt das 2-Genmarkermodell als unabhängigen prognostischen Risikofaktor für das Ereignis des Todes.

	Kategorien	n=	Univariate Analyse			n=	Multivariate Analyse		
			HR	95% KI	p-Wert		HR	95% KI	p-Wert
ECOG-Status	1 vs. 0	23 vs. 47	2,1	1,1-3,8	0,024	21 vs. 40	0,8	0,3-1,8	0,794
	2 vs. 0	14 vs. 47	5,4	2,6-11,4	<0,001	11 vs. 40	2,1	0,8-5,4	0,119
Weichteilmetastasen	ja vs. nein	34 vs. 48	1,8	1,1-3,0	0,029	30 vs. 42	1,8	1,1-3,9	0,031
Hämoglobin, g/dl	kontinuierlich	84	0,8	0,7-0,9	<0,001	72	0,8	0,7-1,0	0,032
LDH, U/l	kontinuierlich	75	1,0	1,0-1,0	<0,001	72	1,0	1,0-1,0	0,641
AP, U/l	kontinuierlich	81	1,0	1,0-1,0	<0,001	72	1,0	1,0-1,0	0,237
2-GP	ungünstig vs. günstig	48 vs. 38	2,3	1,3-4,1	0,003	41 vs. 31	2,1	1,1-4,0	0,034
PSA	kontinuierlich	84	1,0	1,0-1,0	0,132				

Gleason Score	8-10 vs. 6-7	40 vs. 26	0,7	0,4- 1,3	0,279
---------------	--------------	-----------------	-----	-------------	-------

Tabelle 7: Uni- und multivariate Cox-Regressionsanalyse für die Korrelation des Gesamtüberlebens, angepasst an den Effekt der Systemtherapie, in der Münchener Validierungskohorte zum Zeitpunkt der prätherapeutischen Blutentnahme. AP = alkalische Phosphatase; KI = Konfidenzintervall; ECOG = Eastern Cooperative Oncology Group; LDH = Laktatdehydrogenase; PSA = prostataspezifisches Antigen.

Posttherapeutische Proben

9 – 16 Wochen nach Therapiebeginn wurde erneut Blut entnommen. Es gab von 46 CRPC-Patienten der Validierungsgruppe verfügbare Blutproben. Das 2-Genmarkermodell war bei 30 Patienten (65%) günstig und bei 16 Patienten (35%) ungünstig. Medianes Gesamtüberleben war signifikant länger in der günstigen Prognosegruppe (18,0 (95 % KI = 9,5-26,6) vs. 5,0 Monate (95 % KI = 0,0-10,0) (log-rank p-Wert = 0,003)) (Abbildung B).

Die Ergebnisse wurden mit einem PSA-Abfall als posttherapeutischem prognostischen Biomarker in peripherem Blut verglichen. Tabelle 8 zeigt die Korrelation des 2-Genmarkermodells sowie ein PSA-Abfall von mind. 30% bzw. mind. 50% mit dem Gesamtüberleben in der Validierungskohorte 9-16 Wochen nach Therapiebeginn. Die 16 Patienten, bei denen das 2-Genmarkermodell ungünstig ausfiel, hatten ein medianes Gesamtüberleben von 5,0 Monaten (95 % KI = 0,0-10,0). 30 Patienten wiesen ein günstiges 2-Genmarkermodell auf, bei ihnen war das mediane Gesamtüberleben 18 Monate (95 % KI = 9,5-26,6). Dies ergab eine HR von 2,7 (95 % KI = 1,2-6,1) und einen signifikanten p-Wert von 0,004. Einen PSA-Abfall von unter 30% hatten 21 Patienten mit einem medianen Gesamtüberleben von 6,1 Monaten (95 % KI = 2,8-9,5). Ein PSA-Abfall von mehr als 30% war bei 25 Patienten der Fall, sie hatten ein medianes Gesamtüberleben von 14,0 Monaten (95 % KI = 4,4-23,6). Dies ergab eine HR von 1,7 (95 % KI = 0,9-3,3) und einen p-Wert von 0,127. Ein PSA-Abfall von unter 50% hatten 17 Patienten mit einem medianen Gesamtüberleben von 7,1 Monaten (95 % KI = 3,5-10,8). Einen PSA-Abfall von mehr als 50% war bei 29 Patienten der Fall, sie hatten ein medianes Gesamtüberleben von 14,0 Monaten (95 % KI = 10,4-17,7). Dies ergab eine HR von 1,4 (95 % KI = 0,7-2,8) und einen p-Wert von 0,317. Demnach weist das 2-Genmarkermodell als

einziges eine signifikante und somit überlegene Korrelation mit dem Gesamtüberleben in posttherapeutischen Blutproben im Vergleich zu einem PSA-Abfall auf.

	Kategorien	n=	medianes Gesamtüberleben (95%KI), Monate	log-rank p-Wert	HR (95% KI)	p-Wert
2-GP	ungünstig vs. günstig	16 vs. 30	5,0 (0,0-10,0) vs. 18,0 (9,5-26,6)	0,003	2,7 (1,2-6,1)	0,004
PSA-Abfall	<30% vs. ≥30%	21 vs. 25	6,1 (2,8-9,5) vs. 14,0 (4,4-23,6)	0,122	1,7 (0,9-3,3)	0,127
PSA-Abfall	<50% vs. ≥50%	17 vs. 29	7,1 (3,5-10,8) vs. 14,0 (10,4-17,7)	0,314	1,4 (0,7-2,8)	0,317

Tabelle 8: Korrelation des 2-GP und eines prostataspezifischen Antigen-Abfalls von mind. 30% bzw. mind. 50% mit dem Gesamtüberleben in der Münchener Validierungsgruppe zum Zeitpunkt der posttherapeutischen Blutentnahme nach 9-16 Wochen. (KI = Konfidenzintervall)

Evaluation der prä- und posttherapeutischen Blutproben im Verlauf

Des Weiteren wurden die prä- und posttherapeutischen Blutproben im Verlauf untersucht als Indikatoren für Therapieansprechen in Korrelation mit dem Gesamtüberleben (Abbildung A), dem PSA-progressfreien Überleben (Abbildung B) und dem klinisch progressionsfreien Überleben (Abbildung C).

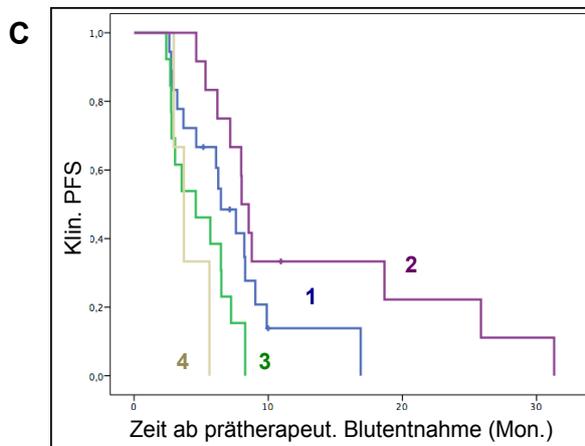
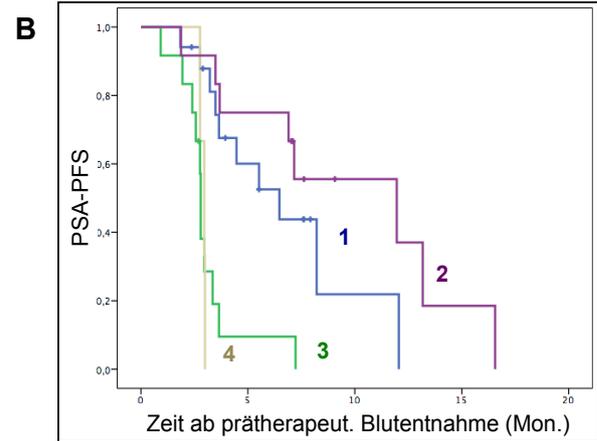
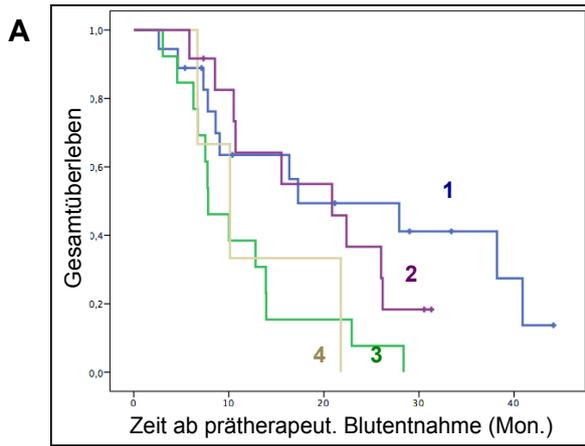
Ein günstiges 2-Genmarkermodell vor und nach Therapie war bei 18 Patienten der Fall (39%). Ein ungünstiges 2-Genmarkermodell vor und nach Therapie war bei 13 Patienten der Fall (28%). Eine Konversion von ungünstigem zu günstigem 2-Genmarkermodell gab es bei 12 Patienten (26%). Und eine Konversion von günstigem zu ungünstigem 2-Genmarkermodell gab es bei 3 Patienten (7%).

Medianes Gesamtüberleben der Patienten, die von der ungünstigen zur günstigen Genkonstellation wechselten, erhöhte sich signifikant von 7,8 Monaten (95 % KI = 4,9-10,8) auf 20,9 Monate (95 % KI = 9,9-31,9, log-rank p-Wert = 0,009). Das

Gesamtüberleben derer, die von der günstigen zur ungünstigen Genkonstellation wechselten, fiel nicht signifikant von 17,3 Monate (95 % KI = 0,0-36,6) auf 10,1 Monate (95 % KI = 4,7-15,6, log-rank p-Wert = 0,202).

Medianes PSA-progressionsfreies Überleben von Patienten, die von ungünstigem zu günstigem 2-Genmarkermodell konvertierten, erhöhte sich signifikant von 2,8 (95 % KI = 2,7-2,8) auf 12,0 (95 % KI = 2,7-21,2, log-rank p-Wert unter 0,001) Monaten. Bei Patienten, die von günstigem zu ungünstigem konvertierten, fiel das mediane PSA-progressionsfreie Überleben signifikant von 6,5 (95 % KI = 3,2-9,8) auf 3,0 Monate (95 % KI = 2,6-3,3, log-rank p-Wert = 0,002).

Medianes klinisches progressionsfreies Überleben von Patienten, welche von ungünstigem zu günstigem 2-Genmarkermodell konvertierten, erhöhte sich signifikant von 4,6 (95 % KI = 1,5-7,7) auf 8,0 Monate (95 % KI = 7,1-9,0, log-rank p-Wert = 0,002). Bei Patienten, die vom günstigen zu ungünstigen konvertierten, fiel es nicht signifikant von 6,5 (95 % KI = 4,6-8,3) auf 3,7 Monate (95 % KI = 2,5-4,9, log-rank p-Wert = 0,063).



Gruppe	2GP zu Beginn	2GP nach 9-16 Wochen
1	günstig	günstig
2	ungünstig	günstig
3	ungünstig	ungünstig
4	günstig	ungünstig

Abbildung 5 Longitudinaler Verlauf des 2-GP von der prä- zur posttherapeutischen Blutentnahme nach 9-16 Wochen in Korrelation mit dem Gesamtüberleben (A), PSA-progressionsfreiem Überleben (PSA-PFS) (B) und dem klinisch progressionsfreiem Überleben (klinisch PFS) (C).

5 Diskussion

5.1 Notwendigkeit neuer Biomarker für Therapieansprechen und Prognose in CRPC-Patienten

Das Prostatakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung bei Männern und die Entwicklung eines kastrationsresistenten Prostatakarzinoms ist eine der Haupttodesursachen im Rahmen dieser Erkrankung (Halabi et al. 2014). In den letzten Jahren wurden verschiedene neue Therapieregime für die Erst- und Zweitlinientherapie des CRPC entwickelt und zugelassen, zu denen aktuell die Chemotherapeutika Abiraterone, Docetaxel, Enzalutamid und Cabazitaxel sowie die Radionuklidtherapie mit Radium-223-Dichlorid zählen. Das Krankheitsstadium des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms weist allerdings eine große Heterogenität bezüglich Progress, Therapieansprechen und Prognose auf. Sowohl der PSA-Wert - der meist erforschte Tumormarker des Prostatakarzinoms - als auch die RECIST-Kriterien - welche in vielen soliden Tumoren zur Beurteilung eines Therapieansprechens mittels Bildgebung herangezogen werden – konnten im Falle des CRPC nicht als Prognoseindikatoren überzeugen (Collette 2005; Petrylak et al. 2006; Armstrong, Garrett-Mayer, Ou Yang, et al. 2007) (Scher et al. 2005).

Mehrere Arbeitsgruppen beschäftigten sich mit dem Ziel, geeignete Prognosemodelle für das CRPC zu etablieren. Die ersten Nomogramme von Smaletz et al (Smaletz et al. 2002) bzw. von Halabi et al (Halabi et al. 2003) setzten sich aus einer Kombination von Blutwerten (z.B. PSA, LDH, AP, Hb) und klinischen Parametern (z.B. ECOG, Gleason score, Alter) zusammen. Allerdings entstanden sie vor der Zulassung des Chemotherapeutikums Docetaxel, welches über die kommenden Jahre das meist verwendete Medikament zur CRPC-Behandlung wurde. Armstrong et al (Armstrong, Garrett-Mayer, Yang, et al. 2007) (Armstrong et al. 2010), sowie erneut Halabi et al (Halabi et al. 2014) (Halabi et al. 2013) erstellten aktualisierte Nomogramme unter Berücksichtigung der Art des Tumorfortschreitens (PSA-Anstieg, radiologischer Progress, Schmerzprogress) (Armstrong) oder der Zeitspanne seit der letzten Docetaxel-/Hormontherapie (Halabi). Nachteil dieser Studien ist die Beschränkung auf ein Therapieregime – z.B. die Untersuchung eines

Patientenkollektivs, welches eine Zweitlinientherapie mit Cabazitaxel bekam, nach Chemotherapie mit Docetaxel (Halabi et al. 2013) - v.a. vor dem Hintergrund, dass heutzutage eine große Variabilität an Therapieoptionen für das CRPC besteht. Zudem spricht die heutige längere Überlebenszeit für eine Überholung dieser Nomogramme (Omlin et al. 2013) .

Ein vielversprechender Tumormarker ist die Anzahl zirkulierender Tumorzellen im Blut von CRPC-Patienten, welche nachweislich mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Danila et al. 2007) (J. S. de Bono, Scher, Montgomery, Parker, Miller, Tissing, Doyle, Terstappen, Pienta, and Raghavan 2008a) (Scher et al. 2009) (Goldkorn et al. 2014). Allerdings ist die nachweisbare Anzahl zirkulierender Tumorzellen, v.a. bei Patienten in frühen CRPC-Stadien bzw. vor einer Chemotherapie, noch sehr niedrig und somit wenig aussagekräftig. Neue Tumormarker werden benötigt, deren Gentranskripte mittels validen reproduzierbaren qPCR-Assays mit einer höheren Sensitivität und Spezifität als CellSearch[®] und zu einem früheren Zeitpunkt im Blut von CRPC-Patienten detektiert werden können, um somit diese Patienten früher in günstige bzw. ungünstige Prognosegruppen einzuteilen (J. S. de Bono, Scher, Montgomery, Parker, Miller, Tissing, Doyle, Terstappen, Pienta, and Raghavan 2008a).

In dieser Studie wurde ein 2-Gen-MarkermodeLL aus prostataspezifischen Gentranskripten entwickelt, welches zuverlässig das Überleben vor und nach einer Systemtherapie eines CRPC-Patienten vorhersagt und als möglicher Studienendpunktmarker für ein Therapieansprechen herangezogen werden kann.

5.2 Etablieren eines validen qPCR-Assays

Ein wichtiger erster Schritt dieser Studie war es, einen validen qPCR-Assay zu etablieren, um die Vergleichbarkeit von Studienergebnissen zu gewährleisten.

5.3 Präklinische Selektion von Genen mit erhöhter Transkription im Prostatakarzinom

In einer Literaturrecherche wurden 23 Gene zusammengetragen, welche eine erhöhte Expression in Prostatakarzinomzellen bzw. in Blut von

Prostatakarzinompatienten aufweisen. In einem standardisierten vorklinischen Versuchsaufbau wurde die Expression dieser 23 Gene in den Prostatakarzinomzelllinien LnCAP und VCAP sowie in PBMCs von gesunden Freiwilligen mittels qPCR untersucht. Die Expression der ubiquitär vorkommenden Gene HPRT1, YWHAZ und UBC diente als Referenz. Alle qPCR-Reaktionen fanden im gleichen Volumen statt (20 µl), in denen cDNA des Zielgens, gewonnen aus jeweils 100 ng RNA, enthalten war. Um zuverlässigere Genexpressionslevel zu erzielen, wurde jeder Versuch doppelt angesetzt und der Durchschnitts Cq-Wert zur weiteren Analyse verwendet. Für die Normalisierung der relativen Expression der Zielgene diente als Kalibrator die Expression von 10 VCAPs bzw. LnCAPs in 10⁶ PBMCs.

5.3.1 Die Problematik der Literatur über Biomarker

Nur sechs der Gene wiesen eine erhöhte Expression in Prostatakarzinomzelllinien auf, wovon laut Literatur bei vier Genen bereits im Blut von Prostatakarzinompatienten eine erhöhte Expression beschrieben wurde (KLK2, KLK3, PSMA und TRPM8) und bei zwei Genen bisher nur eine erhöhte Expression im Prostatakarzinom-Gewebe im Vergleich zu gesundem Prostatagewebe (KLK4 und TMPRSS2). Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass es in der Literatur über prostatakarzinomspezifische Gene erhebliche Unzulänglichkeiten gibt, zum einen bezüglich der Unvollständigkeit der Literatur über Biomarker, zum anderen bezüglich fehlender Assay-Standards der Studien. Schon McShane et al diskutierten 2012 diese Problematik in der Entwicklung neuer Tumormarker (McShane and Hayes 2012). Ihnen zu Folge behindern mangelnde Regulierungen, Vergütungen sowie klare Strukturen und Konzepte des Studiendesigns die Umsetzung von Tumormarkerforschung in den klinischen Alltag mit nützlichen Tests, die einen Therapieerfolg indizieren. Was die Unvollständigkeit bzw. die Unzulänglichkeit der Literatur über die Entwicklung neuer Tumormarker betrifft, machen sie drei systematische Fehler in der Veröffentlichung von Tumormarkerstudien verantwortlich: erstens, die Nichtveröffentlichung von negativen Studienergebnissen (v.a. nicht in Journalen mit einem hohen Impact-Faktor), zweitens das selektive Veröffentlichen von Studieninhalten (z.B. werden nur Ergebnisse publiziert, welche mit der Erwartungshaltung früherer Studienergebnisse übereinstimmen) und drittens

das unvollständige Berichten über den Studienaufbau (oft fehlen detaillierte Beschreibungen zu Studiendesign, Patientenselektion und Patienten-Nachsorge, Probengewinnung, Methodik und Sensitivität bzw. Spezifität des verwendeten Assays). Damit Forscher, Journallektoren und -redakteure, Kliniker und Patienten Studienergebnisse richtig interpretieren können, müssen diese systematischen Fehler minimiert werden. Als Lösungsansätze werden u.a. das Etablieren eines prospektiven Registers für Tumormarkerstudien vorgeschlagen (McShane and Hayes 2012).

5.3.2 Vorteile und Fehlerquellen der Methodik

5.3.2.1 RNA-Reinigung aus Vollblutproben

Essentiell für die Erstellung eines akkuraten Genexpressionsprofils eines Patienten aus dessen Blutprobe und die Vergleichbarkeit der Genexpressionen verschiedener Patienten ist ein standardisierter Ablauf der Probengewinnung und -aufarbeitung unter der Minimierung von Kontamination und vorzeitigem Abbau des Genmaterials. Zur Reinigung zellulärer RNA aus Vollblut verwendeten wir das PAXgene™ Blood RNA Kit. Für die zukünftige Umsetzung unseres Assays im klinischen Alltag ist die leichte Zugänglichkeit zum Probenmaterial des Patienten ein großer Vorteil. Im Vergleich zur Gewinnung von Genmaterial aus Prostatagewebe oder Lymphknoten ist eine Blutentnahme wenig invasiv, schnell durchzuführen und kann im Krankheitsverlauf beliebig oft wiederholt werden. Durchgeführt von verschiedenen Personen, stellt sie jedoch auch eine erste mögliche Fehlerquelle dar. Je nach Körperlage, Bewegung davor und danach und der Stauzeit werden kolloidosmotischer und hydrostatischer Druck beeinflusst und es kann zu Konzentrationsunterschieden der Blutzellen von über 10% kommen (Dörner 2013), wobei die absolute abgenommene Menge in die PAXgene™ Blood RNA Tubes immer 2,7 ml betrug. Von viel wichtigerer Bedeutung allerdings ist die Instabilität der RNA ex vivo. Während des Transportes und der Lagerung des Blutes und somit der RNA bei Raumtemperatur können Schwankungen um das 1000-fache der Kopienzahl auftreten (Rainen et al. 2002). Gründe hierfür sind ein schnell einsetzender RNA-Abbau und die Induktion der Expression verschiedener Gene

nach der Blutentnahme. Dies kann erhebliche Folgen für das Genexpressionsprofil bedeuten. Eine entscheidende Rolle im RNA-Abbau spielen die ubiquitär vorkommenden RNAsen. Dies sind stabile, aktive Enzyme, welche keine Kofaktoren benötigen und schwer zu inaktivieren sind. Es genügen bereits kleine Mengen aus dem Umfeld, um den RNA-Gehalt einer Probe signifikant herabzusetzen, z.B. von Bakterien oder Schimmelpilzen auf der Haut, aus den Behältnissen, aus den Gerätschaften im Labor oder Staub aus der Luft.

Um dies zu verhindern und die Stabilität der RNA *in vitro* zu verbessern und einen Transport bei Raumtemperatur länger zu ermöglichen, enthalten die verwendeten PAXgene™ Blood RNA Tubes ein patentiertes Reagenz, welches vor Abbau durch RNAsen schützt, um Veränderungen der Genexpression gering zu halten. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Proben bei -80° C eingefroren, um Veränderungen an der RNA vorzubeugen. Bei der RNA-Aufarbeitung wurden hohe Hygienestandards eingehalten, z.B. kurze Öffnungszeiten der Probenbehältnisse sowie das Tragen von Laborkitteln und stets neuen Handschuhen. Nach der RNA-Reinigung wurde die Ausbeute mittels optischer Dichte gemessen. Durch die spektralphotometrische Dichtemessung bei 260 und 280 nm in ultraviolettem Licht ließ sich nicht nur die RNA-Konzentration bestimmen, sondern sie ermöglichte auch Rückschlüsse zur RNA-Reinheit. Es wurden nur Proben zur cDNA-Synthese weiterverwendet, welche die Reinheitsanforderungen eines OD_{260}/OD_{280} -Verhältnis von 1,8-2,2 aufwiesen.

5.3.3 Die reverse Transkriptase-Reaktion

Zur Herstellung der cDNA verwendeten wir das Superscript® VILO™ cDNA Synthesis Kit. Hierbei musste erneut eine RNase-Kontamination vermieden werden. Des Weiteren musste das Verhältnis der Reagenzien auf ein Reaktionsvolumen von 100µl exakt abgestimmt werden und es mussten die Inkubationszeiten eingehalten werden.

5.3.4 Gennachweis mittels Polymerase-Kettenreaktion

5.3.4.1 PCR-Methoden: qualitative vs. quantitative PCR

Man unterscheidet zwei Nachweisverfahren in der PCR: die qualitative und die quantitative PCR.

In der traditionell verwendeten qualitativen bzw. Endpunkt-PCR werden die kopierten DNA-Sequenzen erst im Anschluss mittels Gelelektrophorese gemessen. Es wird nur erfasst, ob ein Genprodukt bis zur Plateauphase auftritt oder nicht, ohne eine Aussage über die Ausgangsmenge der Zielgene in der untersuchten Probe treffen zu können. Nachteile dieses Verfahrens sind zudem die Dauer von bis zu mehreren Tagen, eine niedrige Sensitivität und eine fehlende Automatisierung des Verfahrens (Applied Biosystems).

In diesem Projekt wurde die quantitative real-Time PCR angewandt, bei der nach jedem Zyklus eine Messung der entstandenen Genreplikationen durch Fluoreszenzsignale stattfindet. Von Vorteil hierbei ist, dass direkt erfasst wird, ob ein Überschreiten der Replikationen über einen Schwellenwert stattgefunden hat. Zudem steigen die entstehenden Fluoreszenzsignale proportional zur Anzahl der Genkopien an und lassen somit Rückschlüsse über die entstandene Menge des Genprodukts zu. Die quantitative PCR hat sich in den letzten Jahren im Nachweis von Biomarkern durchgesetzt, da eine präzise und reproduzierbare Bestimmung der Expression mehrerer Gene in einem großen Probenvolumen möglich ist (VanGuilder, Vrana, and Freeman 2008).

5.3.4.2 Nachweisverfahren in der qPCR: der TaqMan-Assay als geeignete Methode

Basierend auf der Aussendung eines Fluoreszenzsignals gibt es in der quantitativen PCR unterschiedliche Methoden zum Nachweis der replizierten Gensequenzen.

Das Reagenz SYBR Green bindet unspezifisch an alle anfallenden doppelsträngigen DNA-Produkte, die während des PCR-Vorgangs akkumulieren. So entsteht im Verlauf ein Ansteigen des Fluoreszenzsignals, das jedoch nicht spezifisch für die gewünschte Zielsequenz ist. Vorteil ist eine hohe Sensitivität, Nachteil eine geringe Spezifität. Das Entstehen von Primer-Dimeren kann zu falsch-positiv hohen Fluoreszenzsignalen führen, eine Primer-Optimierung kann laut Hersteller diesen Effekt verringern (Applied Biosystems). Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist,

dass ein Multiplex-Assay nicht möglich ist, d.h. ein Versuchsansatz, in dem mehrere Gene gleichzeitig nachgewiesen werden sollen.

In diesem Projekt wurde die Detektionsmethode mittels TaqMan-Assay verwendet. Fluorophormarkierte Oligonukleotidsonden binden hier spezifisch an Gensequenzen, die Bestandteile der amplifizierten Ziel-DNA sind. Das Fluoreszenzsignal entsteht durch Hydrolyse der Sonde in Anwesenheit der nachzuweisenden Gensequenz (s. Material und Methoden). Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Aussendung des Signals direkt proportional zur entstandenen Menge der gewünschten DNA-Sequenz ist. Zudem weist sie eine hohe Spezifität auf, da drei Nukleotidsequenzen unabhängig voneinander hybridisieren müssen, um eine Fluoreszenz zu generieren. Dies minimiert falsch-positive Signale. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit eines Multiplex-Assay: Wie in unserer Studie durchgeführt, ist der Nachweis vieler Gensequenzen gleichzeitig möglich.

Des Weiteren gibt es noch die Detektion mittels Sondenhybridisierung im LightCycler (Roche) und die sogenannten ‚Hairpin-Primer‘, welche ein Fluoreszenzsignal durch deren Entfaltung auslösen, nachdem eine Hybridbindung zur Zielsequenz stattgefunden hat. Beide Verfahren sind in ihrer Spezifität mit der TaqMan-Methode vergleichbar (VanGuilder, Vrana, and Freeman 2008).

5.4 Bestimmung der Sensitivität des qPCR-Assays

Die Sensitivität unseres qPCR-Assays wurde mittels Verdünnungsreihen überprüft. Dreifach angelegte Verdünnungsreihen der cDNA der 6 Gene in den Prostatakarzinomzelllinien LnCAP bzw. VCAP wiesen eine dynamische Linearität auf und die relative Genexpression blieb über die Verdünnungen hinweg stabil. Die Validierung dieser Methode wurde ebenfalls in dreifach angelegten Verdünnungsreihen von LnCAP und VCAP cDNA in Wasser bzw. von LnCAP- und VCAP-Zellen in PBMCs vorgenommen. 1, 10 und 100 LnCAP-/VCAP-Zellen gespickt in 10^6 PBMCs zeigten einen reproduzierbaren Nachweis von 1 bis 10 Prostatazellen für alle sechs Zielgene. Die Voraussetzung, neue Biomarker in den klinischen Alltag einzuführen, ist der zuverlässige, reproduzierbare und akkurate Nachweis dieser Marker in Patientenblut mittels qPCR. Die Ergebnisse der Sensitivitätsüberprüfung unserer Methodik des qPCR-Assays erfüllen diese Voraussetzungen und die

Einhaltung in zukünftigen Studien würde eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse ermöglichen.

5.5 Das 2-Gen-Markermodell als eigenständiger Prognoseindikator

5.5.1 Verifizierung der präklinischen Laborergebnisse im Blut von CPRC-Patienten

Als nächstes erfolgte die Umsetzung der Expressionsergebnisse prostataspezifischer Gene von Prostatazelllinien in die klinische Realität im Sinne einer Genexpressionsanalyse des Blutes von CPRC-Patienten. Die sechs Genmarker, welche in den Prostatakarzinomzelllinien eine erhöhte Expression aufwiesen (KLK2, KLK3, PSMA, TRPM8, KLK4 und TMPRSS2), wurden im Blut von CRPC-Patienten der New Yorker Trainingskohorte untersucht und die Ergebnisse wurden in Relation gesetzt zur Expression dieser sechs Gene im Blut von gesunden Freiwilligen der Kontrollgruppe. Hier stellte sich heraus, dass nur zwei der Gene, nämlich KLK2 und TMPRSS2, bei CRPC-Patienten signifikant erhöht sind ($p < 0,01$).

5.5.2 Zusammenhang einer Genmarkererhöhung mit dem Überleben und Erstellen eines 2-Genmarkermodells

Die Expression von KLK2, KLK3, KLK4, PSMA, TMPRSS2 und TRPM8 wurde mit dem Gesamtüberleben der Trainingskohorte korreliert. Hier waren es ebenfalls KLK2 und TMPRSS2, welche, wenn im Patientenblut erhöht, die höchste Korrelation mit dem Eintritt des Todes aufwiesen und der Nachweis beider Gene verschlechterte die Prognose zusätzlich. KLK2 und TMPRSS2 transkribieren beide prostataspezifische androgenabhängige Serinproteasen, welche eine Rolle in der Krankheitsprogression und der Entwicklung der Kastrationsunabhängigkeit im Prostatakarzinom spielen (Shang et al. 2014) (Lilja, Ulmert, and Vickers 2008) (Yu et al. 2010). Anhand dieser Ergebnisse erstellten wir ein Prognosemodell, welches CPRC-Patienten in zwei Gruppen einteilte: Patienten, bei denen beide Marker negativ waren und Patienten, bei denen mindestens einer der beiden Marker positiv war. Wir postulierten ein schlechteres klinisches Ergebnis für Marker-positive Patienten.

5.5.3 Validierung des 2-Genmarkermodells

In der Münchener Validierungsgruppe wurde den Patienten vor Beginn einer Systemtherapie und 9-16 Wochen nach Therapieende Blut entnommen und auf alle sechs Genmarker untersucht. Hier erwiesen sich ebenfalls nur KLK2 und TMPRSS2 als zuverlässige Prognosemarker und die Einteilung der Patienten in eine ungünstige vs. günstigere Prognosegruppe zeigte eine signifikant längere Überlebenszeit der Patienten der günstigeren Gruppe, bei denen sowohl KLK2 als auch TMPRSS2 negativ waren.

Darüber hinaus erwies sich unser 2-Genmarkermodell als unabhängiger Prognosefaktor für das Gesamtüberleben von CPRC-Patienten im Vergleich mit etablierten klinischen Markern der vorbeschriebenen Nomogramme, nämlich der ECOG-Status, Weichteilmetastasen, der Hb-, LDH-, AP-, PSA-Wert sowie der Gleason Score. Sogar im Vergleich zu dem am erprobtesten Tumormarker im Prostatakarzinom, dem PSA-Wert, zeigte das 2-Genmarkermodell einen besseren prognostischen Zusammenhang als ein PSA-Abfall um 30 bzw. 50 % nach Therapieende. Im Verlauf der Therapie korrelierte eine Konversion des 2-Genmarkermodells, z.B. von ungünstig zu günstig, mit einer dementsprechenden Veränderung des Gesamtüberlebens, des PSA-Progress freien Überlebens und des klinischen progressions-freien Überlebens. Folglich scheint das 2-Genmarkermodell ein guter Indikator für ein Therapieansprechen und kann somit möglicherweise in Zukunft im klinischen Alltag eine Entscheidungshilfe darstellen für das Fortsetzen oder Abbrechen eines Therapieregimes.

5.6 Die Anzahl von CTCs im Blut von CRPC-Patienten – ein komplementäres Prognosemodell

Vergleichbare Studienergebnisse lieferten bis jetzt die Anzahl zirkulierender Tumorzellen im peripheren Blut, detektiert mittels CellSearch[®] Assay in CPRC-Patienten (Danila et al. 2014) (J. S. de Bono, Scher, Montgomery, Parker, Miller, Tissing, Doyle, Terstappen, Pienta, and Raghavan 2008b) (Thalgott et al. 2013) (Thalgott et al. 2015) (Danila et al. 2007) (Goldkorn et al. 2014) (Olmos et al. 2008) (Scher et al. 2009), welcher von der US-amerikanischen Arzneimittelbehörde FDA genehmigt wurde. Der Nachweis und die Anzahl von CTCs im Blut von CRPC-

Patienten korreliert mit den prognostisch wichtigen Laborwerten AP, LDH, Hb, und dem PSA-Wert und erwies sich sogar als besserer und unabhängiger Prognoseindikator als diese (J. S. de Bono, Scher, Montgomery, Parker, Miller, Tissing, Doyle, Terstappen, Pienta, and Raghavan 2008b) (Danila et al. 2007) (Olmos et al. 2008). Parallel zu unseren Ergebnissen zeigte sich, dass Patienten, eingeteilt in günstige und ungünstige Prognosegruppen ein besseres bzw. schlechteres klinisches Ergebnis bezüglich des Gesamtüberlebens haben, je nachdem, ob weniger oder mehr als fünf zirkulierende Zellen pro 7,5 ml Blut vor und nach einem Therapieregime detektiert werden (Danila et al. 2007). Auch eine Konversion von der besseren zur schlechteren Prognosegruppe und umgekehrt im Verlauf einer Therapie korrelierte mit einem schlechteren bzw. besseren Gesamtüberleben (J. S. de Bono, Scher, Montgomery, Parker, Miller, Tissing, Doyle, Terstappen, Pienta, and Raghavan 2008b) (Olmos et al. 2008). Beide Prognosemodelle - die CTC-Anzahl und prostataspezifische Genmarker im Blut, wie in der hier beschriebenen Promotion – wiesen übereinstimmende Ergebnisse auf und zeigten eine enge Korrelation mit dem Gesamtüberleben (Helo, Cronin, Danila, Wenske, Gonzalez-Espinoza, Anand, Koscuizka, Vaananen, et al. 2009) (Danila et al. 2014). Sowohl Danila et al als auch Helo et al kamen zu der Schlussfolgerung, dass beide Ansätze in Kombination umfassendere Informationen zur aktuellen Tumorbilogie und zum Tumorprogress geben und somit komplementär genutzt werden können. In manchen Patienten konnten prostataspezifische Gentranskripte mittels PCR nachgewiesen werden, bei denen der CellSearch Assay kein Nachweis von CTCs erbrachte. Dies ist vor allem bei Patienten ohne vorherige Chemotherapie der Fall, bei denen die CTC-Anzahl üblicherweise noch gering ist. Auf der anderen Seite gab es auch Patienten mit positivem CTC-Nachweis, bei denen keine oder nur geringe prostataspezifische Gentranskripte nachgewiesen wurden. Dies lässt sich z.B. durch die therapeutische Suppression des Androgenrezeptors erklären, wodurch viele der Zielgene herunterreguliert werden (Helo, Cronin, Danila, Wenske, Gonzalez-Espinoza, Anand, Koscuizka, Vaananen, et al. 2009). Bis dato ist CellSearch der einzige FDA-zertifizierte Assay zur CTC-Detektion, jedoch mit dem Nachteil, dass im klinischen Alltag in nur ca. 40 % der CRPC-Patienten CTCs nachgewiesen werden können, v.a. wie erwähnt bei Patienten ohne vorangegangene Chemotherapie. Zudem variieren die Prognosen von Patienten mit niedrigen CTC-Zahlen sehr stark (Danila et al. 2014). Zusammen können beide Prognosemodelle

die in vivo-Karzinomeigenschaften und das Ansprechen auf Therapieoptionen besser widerspiegeln als ein Markeransatz alleine und somit Patienten mit einem besseren bzw. schlechteren klinischen Ergebnis eindeutiger differenzieren (Helo, Cronin, Danila, Wenske, Gonzalez-Espinoza, Anand, Koscuizka, Väänänen, et al. 2009).

5.7 Prognosemarker als neue Studienendpunkte

In den letzten Jahren gab es eine Vielzahl an Neuzulassungen für unterschiedliche Präparate für das CRPC (s. Einleitung). In der Entwicklung weiterer neuer CRPC-Medikamente wird es hierdurch zu einer noch größeren Herausforderung, einen klaren Überlebensvorteil nachzuweisen. Wenn der primäre Endpunkt das Gesamtüberleben - also der Eintritt des Todes eines Probanden - darstellt, bedarf es sehr umfangreicher und kostenintensiver Studien mit einer großen Patientenzahl, welche sich aufgrund aufwendiger Nachverfolgungen der Patientendaten über einen langen Zeitraum erstrecken und somit risikobehaftet sind. Um die Wirksamkeit neuer CRPC-Medikamente zeitsparender und kostengünstiger nachzuweisen, ist die zuverlässige und reproduzierbare Erfassung von leicht zugänglichen Indikatoren des posttherapeutischen klinischen Ergebnisses der CRPC-Patienten (wie CTCs oder Genmarker im Patientenblut es sind) notwendig, die idealerweise den Todeseintritt als Studienendpunkt ablösen können (Scher et al. 2016) (J. S. de Bono, Scher, Montgomery, Parker, Miller, Tissing, Doyle, Terstappen, Pienta, and Raghavan 2008b) (Danila et al. 2014).

Prentice et al entwickelten schon 1989 vier Kriterien, welche Biomarker aufweisen müssen, um als sekundäre Studienendpunkte eines neuen Therapieansatzes herangezogen werden zu dürfen:

1. Die Therapie muss einen signifikanten Effekt auf den klinischen Endpunkt haben.
2. Die Therapie muss einen signifikanten Effekt auf den vorgeschlagenen Biomarker haben.
3. Der Biomarker muss einen signifikanten Einfluss auf den klinischen Endpunkt haben.
4. Der komplette Effekt auf den klinischen Endpunkt muss von dem Biomarker erfasst werden (Prentice 1989).

Eine Arbeitsgruppe um Howard I. Scher untersuchte 2015 die Anzahl von zirkulierenden Tumorzellen als einen solchen möglichen sekundären Endpunkt in CRPC-Patienten, welche mit Abirateron plus Prednison bzw. mit Prednison alleine im Anschluss an eine Docetaxeltherapie behandelt wurden. Neben dem Ergebnis, dass eine Abiraterontherapie einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber einer Therapie mit Prednison alleine darstellt, kamen sie zusätzlich zu dem Schluss, dass die Anzahl zirkulierender Tumorzellen im Blut als einzelner Biomarker die Erfüllung des vierten der eben erwähnten Kriterien verfehlte. CTCs in Kombination mit dem LDH-Wert hingegen erfüllte alle vier Kriterien. Hierbei unterschieden sie in drei Risikogruppen, und zwar in Patienten mit weniger als 5 CTCs in 7,5 ml Blut bei beliebigem LDH-Wert, Patienten mit 5 oder mehr CTCs in 7,5 ml Blut und einem LDH-Wert unter 250 U/L und in Patienten mit 5 oder mehr CTCs in 7,5 ml Blut und einem LDH-Wert über 250 U/L (Scher et al. 2016). Unsere Studienergebnisse deuten darauf hin, dass in Zukunft der Anstieg prostataspezifischer Genmarker im Blut ebenso als potentieller sekundärer Endpunkt herangezogen werden kann. Hierfür sind weiterführende Studien notwendig. Mit der schwierigen Aufgabe, Standards für die Erforschung von Biomarkern als neue Studienendpunktmarker zu erstellen, beschäftigen sich sowohl die U.S. Food and Drug Administration als auch die ‚Oncology Biomarker Qualification Initiative‘ (J. S. de Bono, Scher, Montgomery, Parker, Miller, Tissing, Doyle, Terstappen, Pienta, and Raghavan 2008b). Von solch Markern profitieren sowohl CRPC-Patienten bei der Entscheidung für oder gegen eine strapaziöse Therapie als auch CRPC-Forschungsgruppen bezüglich der Effektivität potentieller neuer Therapeutika.

6 Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung bei Männern und die Entwicklung eines kastrationsresistenten Prostatakarzinoms ist eine der Haupttodesursachen im Rahmen dieser Erkrankung. Dieses Krankheitsstadium weist allerdings eine große Heterogenität bezüglich Progress, Therapieansprechen und Prognose auf. Bisherige Prognosemodelle setzen sich aus einer Kombination von Blutwerten und klinischen Parametern zusammen. Da in den letzten Jahren eine Vielzahl neuer Medikamente und Therapieregime für die Behandlung des metastasierten kastrationsresistenten Prostatacarzinoms zugelassen wurde, ist eine Überholung dieser prognostischen Indikatoren notwendig. In dieser Studie wurde ein 2-Gen-Markermodell aus prostataspezifischen Gentranskripten entwickelt, welches zuverlässig das Überleben von Patienten mit kastrationsresistentem Prostatakarzinom vor und nach einer Systemtherapie vorhersagt.

In einem standardisierten vorklinischen Versuchsaufbau wurde die Expression von 23 Genen, welche eine erhöhte Expression in Prostatakarzinomzellen bzw. in Blut von Prostatakarzinompatienten aufweisen, in Prostatakarzinomzelllinien sowie in peripheren mononuklearen Blutzellen von gesunden Freiwilligen mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion untersucht. Die sechs Genmarker, welche in den Prostatakarzinomzelllinien eine erhöhte Expression aufwiesen (KLK2, KLK3, PSMA, TRPM8, KLK4 und TMPRSS2), wurden im Blut von Patienten mit kastrationsresistentem Prostatakarzinom untersucht und die Ergebnisse wurden in Relation gesetzt zur Expression dieser Gene im Blut von gesunden Freiwilligen. Hier stellte sich heraus, dass nur zwei der Gene, nämlich KLK2 und TMPRSS2, bei erkrankten Patienten signifikant erhöht sind. Die Expression von KLK2, KLK3, KLK4, PSMA, TMPRSS2 und TRPM8 wurde mit dem Gesamtüberleben korreliert. Hier waren es ebenfalls KLK2 und TMPRSS2, welche, wenn im Patientenblut erhöht, die höchste Korrelation mit dem Eintritt des Todes aufwiesen und der Nachweis beider Gene verschlechterte die Prognose zusätzlich. Anhand dieser Ergebnisse erstellten wir ein Prognosemodell, welches Patienten mit kastrationsresistentem Prostatakarzinom in zwei Gruppen einteilte: Patienten, bei denen beide Marker negativ waren, und Patienten, bei denen mindestens einer der beiden Marker positiv war. Wir postulierten ein schlechteres klinisches Ergebnis für Marker-positive Patienten. In einer Validierungsgruppe wurde den Patienten vor Beginn einer

Systemtherapie und 9-16 Wochen nach Therapieende Blut entnommen und auf alle sechs Genmarker untersucht. Hier erwiesen sich ebenfalls nur KLK2 und TMPRSS2 als zuverlässige Prognosemarker und die Einteilung der Patienten in eine ungünstige und in eine günstigere Prognosegruppe zeigte eine signifikant längere Überlebenszeit der Patienten der günstigeren Gruppe, bei denen sowohl KLK2 als auch TMPRSS2 negativ waren. Darüber hinaus erwies sich unser 2-Genmarkermodell als unabhängiger Prognosefaktor für das Gesamtüberleben im Vergleich mit etablierten klinischen Markern der vorbeschriebenen Nomogramme, nämlich der Performance-Status der Eastern Cooperative Oncology Group, Weichteilmetastasen, Blutwerte von Hämoglobin, Laktatdehydrogenase, alkalische Phosphatase, der PSA-Wert, sowie der Gleason Score. Sogar im Vergleich zu dem am erprobtesten Tumormarker im Prostatakarzinom, dem PSA-Wert, zeigte das 2-Genmarkermodell einen besseren prognostischen Zusammenhang als ein PSA-Abfall um 30 bzw. 50 % unter Therapie. Im Verlauf der Therapie hing eine Konversion des 2-Genmarkermodells, z.B. von ungünstig zu günstig, in einem Patienten mit einer dementsprechenden Veränderung des Gesamtüberlebens, des PSA-Progress freien Überlebens und des klinischen progressionsfreien Überlebens zusammen. Folglich ist das 2-Genmarkermodell ein Indikator für ein Therapieansprechen und kann somit möglicherweise in Zukunft im klinischen Alltag eine Entscheidungshilfe darstellen für das Fortsetzen oder Abbrechen eines Therapieregimes.

Die deutliche Zunahme an zugelassenen Chemotherapeutika für das fortgeschrittene kastrationsresistente Prostatakarzinom in den letzten Jahren macht es zu einer großen Herausforderung, einen klaren Überlebensvorteil weiterer neuer Medikamente nachzuweisen. Um deren Wirksamkeit zeitsparender und kostengünstiger zu erforschen, ist die zuverlässige und reproduzierbare Erfassung von leicht zugänglichen Indikatoren des posttherapeutischen klinischen Ergebnisses betroffener Patienten notwendig, die idealerweise den Todeseintritt als Studienendpunkt ablösen können. Unsere Studienergebnisse deuten darauf hin, dass in Zukunft der Anstieg prostataspezifischer Genmarker im Blut ebenso als potentieller sekundärer Endpunkt herangezogen werden kann.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Arbeitsschritte der Zielgenselektion und Entwicklung des 2-Gen-Modells (CRPC = kastrationsresistentes Prostatakarzinom, PBMC = Periphere mononukleare Blutzellen)_____ 37

Abbildung 2: Verdünnungsreihen von LnCAP cDNA von 100ng - 1 pg. Cq-Werte des Zielgens Kallikrein 3 (KLK3) und der endogenen Referenzgene HPRT1, UBC an YWHAZ sowie die errechnete relative Genexpression (RGE) für KLK3 (Kallibrator = 1ng LnCAP DNA). RcGE von KLK3 war in der gesamten Verdünnungsreihe stabil_____ 39

Abbildung 3: Boxplot der Genexpression prostataspezifischer RNA-Marker in peripherem Blut (KLK2, KLK3, KLK4, TMPRSS2 and TRPM8) in der Kontrollgruppe von 43 gesunden Freiwilligen und der Trainingskohorte von 22 CRPC-Patienten. Der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test zeigt eine signifikant erhöhte Genexpression für KLK2 und TMPRSS2 in CRPC-Patienten._____ 39

Abbildung 4: Korrelation des 2-GP, welches die Patienten in eine günstige (=0, beide Marker negativ) oder in eine ungünstige (>1, ein bzw. beide Marker positiv) Prognosegruppe einteilt, mit dem Gesamtüberleben bei der prätherapeutischen Blutentnahme (A) und bei der posttherapeutischen Blutentnahme nach 9-16 Wochen (B) in der Münchener Validierungsgruppe. _____ 44

Abbildung 5: Longitudinaler Verlauf des 2-GP von der prä- zur posttherapeutischen Blutentnahme nach 9-16 Wochen in Korrelation mit dem Gesamtüberleben (A), PSA-progressionsfreiem Überleben (PSA-PFS) (B) und dem klinisch progressionsfreiem Überleben (klinisch PFS) (C)_____ 49

8 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Gensequenzen der Zielgene</i>	28
<i>Tabelle 2: Gensequenzen der Referenzgene</i>	28
<i>Tabelle 3: Patienteneigenschaften</i>	36
<i>Tabelle 4: Gensymbol mit der Genexpression in LnCAP-Zellen, VCAP-Zellen und PBMC-Proben. Gene mit hoher Expression in LnCAP- oder VCAP-Zellen (Cq <28) und niedriger Hintergrundexpression in 5 PBMC-Proben (Cq>38) wurden für die weitere Analyse in peripherem Blut von CRPC-Patienten verwendet (fett gedruckt). Cq= Cycle threshold, PBMC= peripheral blood mononuclear cells</i>	37
<i>Tabelle 5: Univariate Cox-Regressionsanalyse für die Korrelation der Genexpression von KLK2, KLK3, KLK4, TMPRSS2 und TRPM8 der Trainingskohorte mit dem Gesamtüberleben.</i>	41
<i>Tabelle 6: Univariate Cox-Regressionsanalyse für die Korrelation von KLK2, KLK3, KLK4, TMPRSS2 und TRPM8 der Münchener Validierungskohorte mit dem Gesamtüberleben zum Zeitpunkt der Blutabnahme vor und nach der Therapie.</i>	43
<i>Tabelle 7: Uni- und multivariate Cox-Regressionsanalyse für die Korrelation des Gesamtüberlebens, angepasst an den Effekt der Systemtherapie, in der Münchener Validierungskohorte zum Zeitpunkt der prätherapeutischen Blutentnahme. AP = alkalische Phosphatase; KI = Konfidenzintervall; ECOG = Eastern Cooperative Oncology Group; LDH = Laktatdehydrogenase; PSA = prostataspezifisches Antigen.</i>	46
<i>Tabelle 8: Korrelation des 2-GP und eines prostataspezifischen Antigen-Abfalls von mind. 30% bzw. mind. 50% mit dem Gesamtüberleben in der Münchener Validierungsgruppe zum Zeitpunkt der posttherapeutischen Blutentnahme nach 9-16 Wochen. (KI = Konfidenzintervall)</i>	47

9 Quellenverzeichnis

- Armstrong, A J, E Garrett-Mayer, R de Wit, I Tannock, and M Eisenberger. 2010. "Prediction of Survival Following First-Line Chemotherapy in Men with Castration-Resistant Metastatic Prostate Cancer." *Clinical Cancer Research* 16 (1): 203–11. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2514.
- Armstrong, A J, E Garrett-Mayer, Y C Ou Yang, M A Carducci, I Tannock, R de Wit, and M Eisenberger. 2007. "Prostate-Specific Antigen and Pain Surrogacy Analysis in Metastatic Hormone-Refractory Prostate Cancer." *Journal of Clinical Oncology* 25 (25): 3965–70. doi:10.1200/JCO.2007.11.4769.
- Armstrong, A J, E S Garrett-Mayer, Y C O Yang, R de Wit, I F Tannock, and M Eisenberger. 2007. "A Contemporary Prognostic Nomogram for Men with Hormone-Refractory Metastatic Prostate Cancer: a TAX327 Study Analysis." *Clinical Cancer Research* 13 (21): 6396–6403. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1036.
- Beer, Tomasz M, Andrew J Armstrong, Dana E Rathkopf, Yohann Loriot, Cora N Sternberg, Celestia S Higano, Peter Iversen, et al. 2014. "Enzalutamide in Metastatic Prostate Cancer Before Chemotherapy.." *N Engl J Med* 371 (5): 424–33. doi:10.1056/NEJMoa1405095.
- Brierley, James D, Mary K Gospodarowicz, and Christian Wittekind. 2016. *TNM Classification of Malignant Tumours*. John Wiley & Sons.
- Bustin, S A, V Benes, J A Garson, J Hellemans, J Huggett, M Kubista, R Mueller, et al. 2009. "The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments." *Clinical Chemistry* 55 (4): 611–22. doi:10.1373/clinchem.2008.112797.
- Collette, L. 2005. "Is Prostate-Specific Antigen a Valid Surrogate End Point for Survival in Hormonally Treated Patients with Metastatic Prostate Cancer? Joint Research of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer, the Limburgs Universitair Centrum, and AstraZeneca Pharmaceuticals." *Journal of Clinical Oncology* 23 (25): 6139–48. doi:10.1200/JCO.2005.08.156.
- Danila, D C, G Heller, G A Gignac, R Gonzalez-Espinoza, A Anand, E Tanaka, H Lilja, et al. 2007. "Circulating Tumor Cell Number and Prognosis in Progressive Castration-Resistant Prostate Cancer." *Clinical Cancer Research* 13 (23): 7053–58. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1506.
- Danila, Daniel C, Aseem Anand, Nikolaus Schultz, Glenn Heller, Mingliang Wan, Clifford C Sung, Charles Dai, et al. 2014. "Analytic and Clinical Validation of a Prostate Cancer-Enhanced Messenger RNA Detection Assay in Whole Blood as a Prognostic Biomarker for Survival." *European Urology* 65 (6). European Association of Urology: 1191–97. doi:10.1016/j.eururo.2013.07.006.
- Danila, Daniel C, Martin Fleisher, and Howard I Scher. 2011. "Circulating Tumor Cells as Biomarkers in Prostate Cancer.." *Clinical Cancer Research* 17 (12): 3903–12. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2650.
- de Bono, J S, H I Scher, R B Montgomery, C Parker, M C Miller, H Tissing, G V Doyle, L W W M Terstappen, K J Pienta, and D Raghavan. 2008a. "Circulating Tumor Cells Predict Survival Benefit From Treatment in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer." *Clinical Cancer Research* 14 (19): 6302–9.

- doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0872.
- de Bono, J S, H I Scher, R B Montgomery, C Parker, M C Miller, H Tissing, G V Doyle, L W W M Terstappen, K J Pienta, and D Raghavan. 2008b. "Circulating Tumor Cells Predict Survival Benefit From Treatment in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer." *Clinical Cancer Research* 14 (19): 6302–9. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0872.
- de Bono, Johann S, Christopher J Logothetis, Arturo Molina, Karim Fizazi, Scott North, Luis Chu, Kim N Chi, et al. 2011. "Abiraterone and Increased Survival in Metastatic Prostate Cancer.." *N Engl J Med* 364 (21). Massachusetts Medical Society: 1995–2005. doi:10.1056/NEJMoa1014618.
- de Bono, Johann Sebastian, Stéphane Oudard, Mustafa Özgüroglu, Steinbjørn Hansen, Jean-Pascal Machiels, Ivo Kocak, Gwenaëlle Gravis, et al. 2010. "Prednisone Plus Cabazitaxel or Mitoxantrone for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Progressing After Docetaxel Treatment: a Randomised Open-Label Trial.." *Lancet (London, England)* 376 (9747): 1147–54. doi:10.1016/S0140-6736(10)61389-X.
- Deutsche Krebsgesellschaft. 2014. "Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Interdisziplinäre Leitlinie Der Qualität S3 Zur Früherkennung, Diagnose Und Therapie Der Verschiedenen Stadien Des Prostatakarzinoms." <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html> (Zugriff am 07.08.2015).
- Dörner, Klaus. 2013. *Taschenlehrbuch Klinische Chemie Und Hämatologie*. Georg Thieme Verlag.
- Eisenhauer, E A, P Therasse, J Bogaerts, L H Schwartz, D Sargent, R Ford, J Dancey, et al. 2009. "New Response Evaluation Criteria in Solid Tumours: Revised RECIST Guideline (Version 1.1).." *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*. doi:10.1016/j.ejca.2008.10.026.
- Epstein, Jonathan I, William C Jr Allsbrook, Mahul B Amin, Lars L Egevad, and the ISUP Grading Committee. 2005. "The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma." *The American Journal of Surgical Pathology* 29 (9): 1228.
- Goldkorn, A, B Ely, D I Quinn, C M Tangen, L M Fink, T Xu, P Twardowski, et al. 2014. "Circulating Tumor Cell Counts Are Prognostic of Overall Survival in SWOG S0421: a Phase III Trial of Docetaxel with or Without Atrasentan for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer." *Journal of Clinical Oncology* 32 (11): 1136–42. doi:10.1200/JCO.2013.51.7417.
- Halabi, S, C Y Lin, E J Small, A J Armstrong, E B Kaplan, D Petrylak, C N Sternberg, et al. 2013. "Prognostic Model Predicting Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Survival in Men Treated with Second-Line Chemotherapy." *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 105 (22): 1729–37. doi:10.1093/jnci/djt280.
- Halabi, S, C Y Lin, W K Kelly, K S Fizazi, J W Moul, E B Kaplan, M J Morris, and E J Small. 2014. "Updated Prognostic Model for Predicting Overall Survival in First-Line Chemotherapy for Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer." *Journal of Clinical Oncology* 32 (7): 671–77. doi:10.1200/JCO.2013.52.3696.
- Halabi, Susan, Eric J Small, Philip W Kantoff, Michael W Kattan, Ellen B Kaplan, Nancy A Dawson, Ellis G Levine, Brent A Blumenstein, and Nicholas J Vogelzang. 2003. "Prognostic Model for Predicting Survival in Men with

- Hormone-Refractory Metastatic Prostate Cancer..” *Journal of Clinical Oncology* 21 (7): 1232–37. doi:10.1200/JCO.2003.06.100.
- Heck, Matthias M, Mark Thalgott, Margitta Retz, Petra Wolf, Tobias Maurer, Roman Nawroth, Georgios Hatzichristodoulou, Jürgen E Gschwend, and Hubert Kübler. 2012. “Rational Indication for Docetaxel Rechallenge in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer..” *BJU International* 110 (11 Pt B). Wiley/Blackwell (10.1111): E635–40. doi:10.1111/j.1464-410X.2012.11364.x.
- Heidenreich, Axel, Patrick J Bastian, Joaquim Bellmunt, Michel Bolla, Steven Joniau, Theodor van der Kwast, Malcolm Mason, et al. 2018. “EAU Guidelines on Prostate Cancer. Part II: Treatment of Advanced, Relapsing, and Castration-Resistant Prostate Cancer.” *European Urology* 65 (2). Elsevier: 467–79. doi:10.1016/j.eururo.2013.11.002.
- Helo, P, A M Cronin, D C Danila, S Wenske, R Gonzalez-Espinoza, A Anand, M Koscuizka, R M Vaananen, et al. 2009. “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 with Survival.” *Clinical Chemistry* 55 (4). Clinical Chemistry: 765–73. doi:10.1373/clinchem.2008.117952.
- Helo, Pauliina, Angel M Cronin, Daniel C Danila, Sven Wenske, Rita Gonzalez-Espinoza, Aseem Anand, Michael Koscuizka, Riina-Minna Väänänen, et al. 2009. “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 with Survival.” *Clinical Chemistry* 55 (4). Clinical Chemistry: 765–73. doi:10.1373/clinchem.2008.117952.
- Horn, Florian. 2009. *Biochemie Des Menschen*. Georg Thieme Verlag.
- Kellokumpu-Lehtinen, Pirkko-Liisa, Ulrika Harmenberg, Timo Joensuu, Ray McDermott, Petteri Hervonen, Claes Ginman, Marjaana Luukka, et al. 2013. “2-Weekly Versus 3-Weekly Docetaxel to Treat Castration-Resistant Advanced Prostate Cancer: a Randomised, Phase 3 Trial..” *The Lancet Oncology* 14 (2): 117–24. doi:10.1016/S1470-2045(12)70537-5.
- Lilja, Hans, David Ulmert, and Andrew J Vickers. 2008. “Prostate-Specific Antigen and Prostate Cancer: Prediction, Detection and Monitoring.” *Nature Reviews Cancer* 8 (4). Nature Publishing Group: 268–78. doi:10.1038/nrc2351.
- Livak, Kenneth J, and Thomas D Schmittgen. 2001. “Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT Method.” *Methods* 25 (4): 402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- McShane, L M, and D F Hayes. 2012. “Publication of Tumor Marker Research Results: the Necessity for Complete and Transparent Reporting.” *Journal of Clinical Oncology* 30 (34): 4223–32. doi:10.1200/JCO.2012.42.6858.
- Olmos, D, H T Arkenau, J E Ang, I Ledaki, G Attard, C P Carden, A H M Reid, et al. 2008. “Circulating Tumour Cell (CTC) Counts as Intermediate End Points in Castration-Resistant Prostate Cancer (CRPC): a Single-Centre Experience.” *Annals of Oncology* 20 (1): 27–33. doi:10.1093/annonc/mdn544.
- Omlin, Aurelius, Carmel Pezaro, Deborah Mukherji, Amy Mulick Cassidy, Shahneen Sandhu, Diletta Bianchini, David Olmos, et al. 2013. “Improved Survival in a Cohort of Trial Participants with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Demonstrates the Need for Updated Prognostic Nomograms.” *European Urology* 64 (2). European Association of Urology: 300–306.

- doi:10.1016/j.eururo.2012.12.029.
- Parker, C, S Nilsson, D Heinrich, S I Helle, J M O'Sullivan, S D Fosså, A Chodacki, et al. 2013. "Alpha Emitter Radium-223 and Survival in Metastatic Prostate Cancer.." *N Engl J Med* 369 (3). Massachusetts Medical Society: 213–23. doi:10.1056/NEJMoa1213755.
- Petrylak, D P, D P Ankerst, C S Jiang, C M Tangen, M H A Hussain, P N Lara, J A Jones, et al. 2006. "Evaluation of Prostate-Specific Antigen Declines for Surrogacy in Patients Treated on SWOG 99-16." *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 98 (8): 516–21. doi:10.1093/jnci/djj129.
- Petrylak, Daniel P, Catherine M Tangen, Maha H A Hussain, Primo N Lara, Jeffrey A Jones, Mary-ellen Taplin, Patrick A Burch, et al. 2004. "Docetaxel and Estramustine Compared with Mitoxantrone and Prednisone for Advanced Refractory Prostate Cancer.." *N Engl J Med* 351 (15). Massachusetts Medical Society: 1513–20. doi:10.1056/NEJMoa041318.
- Prentice, R L. 1989. "Surrogate Endpoints in Clinical Trials: Definition and Operational Criteria.." *Statistics in Medicine* 8 (4): 431–40.
- Rainen, Lynne, Uwe Oelmueller, Stewart Jurgensen, Ralf Wyrich, Cynthia Ballas, Jim Schram, Chris Herdman, et al. 2002. "Stabilization of mRNA Expression in Whole Blood Samples.." *Clinical Chemistry* 48 (11): 1883–90.
- Riethdorf, Sabine, and Klaus Pantel. 2010. "Advancing Personalized Cancer Therapy by Detection and Characterization of Circulating Carcinoma Cells." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1210 (1). Blackwell Publishing Inc: 66–77. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05779.x.
- Ryan, CJ, MR Smith, and JS de Bono. 2013. "Abiraterone in Metastatic Prostate Cancer Without Previous Chemotherapy." *N Engl J Med*.
- Scher, H I, S Halabi, I Tannock, M Morris, C N Sternberg, M A Carducci, M A Eisenberger, et al. 2008. "Design and End Points of Clinical Trials for Patients with Progressive Prostate Cancer and Castrate Levels of Testosterone: Recommendations of the Prostate Cancer Clinical Trials Working Group." *Journal of Clinical Oncology* 26 (7): 1148–59. doi:10.1200/JCO.2007.12.4487.
- Scher, Howard I, Glenn Heller, Arturo Molina, Gerhardt Attard, Daniel C Danila, Xiaoyu Jia, Weimin Peng, et al. 2016. "Circulating Tumor Cell Biomarker Panel as an Individual-Level Surrogate for Survival in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer." *Journal of Clinical Oncology*, September. American Society of Clinical Oncology. doi:10.1200/JCO.2014.55.3487;page:string:Article/Chapter.
- Scher, Howard I, Karim Fizazi, Fred Saad, Mary-ellen Taplin, Cora N Sternberg, Kurt Miller, Ronald de Wit, et al. 2012. "Increased Survival with Enzalutamide in Prostate Cancer After Chemotherapy.." Edited by Richard C Cabot, Nancy Lee Harris, Eric S Rosenberg, Jo-Anne O Shepard, Alice M Cort, Sally H Ebeling, and Emily K McDonald. *N Engl J Med* 367 (13). Massachusetts Medical Society: 1187–97. doi:10.1056/NEJMoa1207506.
- Scher, Howard I, Michael J Morris, William K Kelly, Lawrence H Schwartz, and Glenn Heller. 2005. "Prostate Cancer Clinical Trial End Points: 'RECIST'ing a Step Backwards.." *Clinical Cancer Research* 11 (14): 5223–32. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0109.
- Scher, Howard I, Xiaoyu Jia, Johann S de Bono, Martin Fleisher, Kenneth J Pienta, Derek Raghavan, and Glenn Heller. 2009. "Circulating Tumour Cells as Prognostic Markers in Progressive, Castration-Resistant Prostate Cancer: a Reanalysis of IMMC38 Trial Data." *The Lancet Oncology* 10 (3). Elsevier: 233–39.

- doi:10.1016/S1470-2045(08)70340-1.
- Shang, Zhiquan, Yuanjie Niu, Qiliang Cai, Jing Chen, Jing Tian, Shuyuan Yeh, Kuo-Pao Lai, and Chawnshang Chang. 2014. "Human Kallikrein 2 (KLK2) Promotes Prostate Cancer Cell Growth via Function as a Modulator to Promote the ARA70-Enhanced Androgen Receptor Transactivation." *Tumor Biology* 35 (3). Springer Netherlands: 1881–90. doi:10.1007/s13277-013-1253-6.
- Smaletz, Oren, Howard I Scher, Eric J Small, David A Verbel, Alex McMillan, Kevin Regan, W Kevin Kelly, and Michael W Kattan. 2002. "Nomogram for Overall Survival of Patients with Progressive Metastatic Prostate Cancer After Castration.." *Journal of Clinical Oncology* 20 (19): 3972–82. doi:10.1200/JCO.2002.11.021.
- Tannock, Ian F, Ronald de Wit, William R Berry, Jozsef Horti, Anna Pluzanska, Kim N Chi, Stéphane Oudard, et al. 2004. "Docetaxel Plus Prednisone or Mitoxantrone Plus Prednisone for Advanced Prostate Cancer.." *N Engl J Med* 351 (15): 1502–12. doi:10.1056/NEJMoa040720.
- Thalgott, M, M M Heck, M Eiber, M Souvatzoglou, G Hatzichristodoulou, V Kehl, B J Krause, et al. 2015. "Circulating Tumor Cells Versus Objective Response Assessment Predicting Survival in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Patients Treated with Docetaxel Chemotherapy." *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 141 (8). Springer Berlin Heidelberg: 1457–64. doi:10.1007/s00432-015-1936-z.
- Thalgott, Mark, Brigitte Rack, Tobias Maurer, Michael Souvatzoglou, Matthias Eiber, Veronika Kreß, Matthias M Heck, et al. 2013. "Detection of Circulating Tumor Cells in Different Stages of Prostate Cancer." *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 139 (5): 755–63. doi:10.1007/s00432-013-1377-5.
- VanGuilder, H D, K E Vrana, and W M Freeman. 2008. "Twenty-Five Years of Quantitative PCR for Gene Expression Analysis." *Biotechniques*.
- Yu, Jindan, Jianjun Yu, Ram-Shankar Mani, Qi Cao, Chad J Brenner, Xuhong Cao, Xiaoju Wang, et al. 2010. "An Integrated Network of Androgen Receptor, Polycomb, and TMPRSS2-ERG Gene Fusions in Prostate Cancer Progression." *Cancer Cell* 17 (5). Elsevier Ltd: 443–54. doi:10.1016/j.ccr.2010.03.018.

Danksagung

Zum Schluss möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Jürgen Gschwend, Direktor der Klinik für Urologie am Klinikum rechts der Isar der technischen Universität München bedanken sowie bei Frau Prof. Dr. med. Margitta Retz, für meine Annahme als Doktorandin. Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Roman Nawroth, Leiter des urologischen Forschungslabors für den Zugang zum Laboratorium, bedanken.

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn PD Dr. med. Matthias Heck für seine engagierte, gewissenhafte und geduldige Betreuung sowie seine persönliche Unterstützung und Führung durch das von ihm bereitgestellte Forschungsthema.

Vielen Dank an meine Familie für ihren Rückhalt und Zuspruch während dieser Zeit.