

Aus der
Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
und der Abteilung für Urologie und Kinderurologie,
Krankenhaus der Barmherzigen Brüder Trier, Akademisches Lehrkrankenhaus der
Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Bestimmung von Biomarkern im Blut
zur Prognose- und Therapiebeurteilung bei Patienten
mit metastasiertem kastrationsresistentem Prostatakarzinom (mCRPC)**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von
Maximilian Peter Sparwasser
geb. 07.09.1987 in Illertissen

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher Vorstand:	x
1. Gutachter:	x
2. Gutachter:	x
Tag der Promotion:	08. Dezember 2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis	7
1. Einleitung	8
1.1. Epidemiologie des Prostatakarzinoms	10
1.2. Pathogenese des Prostatakarzinoms.....	11
1.3. Definition des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms (CRPC).....	12
1.4. Rolle und Aufbau des Testosterons und des Androgenrezeptors	13
1.4.1. Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse und physiologische Rolle des Testosterons.....	13
1.4.2. Androgenrezeptor und sein molekularer Aufbau	15
1.4.3. Signaltransduktion des Androgenrezeptors.....	18
1.5. Mechanismus der Metastasierung	19
1.5.1. Zirkulierende Tumorzellen (CTC).....	20
1.5.2. Organotropie des Prostatakarzinoms.....	20
1.5.2.1. Lymphknotenmetastasen.....	22
1.5.2.2. Knochenmetastasen	22
1.5.2.3. Viszerale Metastasen	23
1.6. Bildgebende Verfahren und deren Einsatzzeitpunkt im Stadium des CRPC	23
1.7. Therapie des hormonsensiblen Prostatakarzinoms (HSPCa)	25
1.8. Therapie des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms (CRPC)	25
1.8.1. Management von Patienten mit mCRPC.....	27
1.8.2.1. Abirateron	27
1.8.2.2. Enzalutamid	29
1.8.2.3. Chemotherapie.....	31
1.8.2.3.1. Docetaxel	31
1.8.2.3.2. Cabazitaxel	33
1.9. Molekularpathologische Ursachen für das CRPC.....	34
1.9.1. Androgenrezeptor-Splicevariante AR-V7	35
1.9.2. Resistenzmechanismen beim CRPC	36
1.9.3. Rezeptorunabhängige Stimulation - Das „Non-Genomic Rapid Signaling“	39
1.10. Zielsetzung.....	40
2. Literaturdiskussion	40
2.1. Biomarker beim Prostatakarzinom	40
2.1.1. Aktuelle Biomarker im Stadium des CRPC.....	41
2.1.2. Aktueller Stand der translationalen Forschung im Bereich des AR-V7	44
2.2. Sequenzielle Therapie im Stadium des CRPC	47
3. Material und Methodik	48
3.1. Material und Reagenzien.....	48
3.1.1. Verbrauchsmaterialien.....	48
3.1.2. Gebrauchsmaterialien	49
3.1.3. Geräte.....	49
3.1.4. Biochemikalien und Lösungen	50
3.1.5. Kits.....	51

3.1.6. Antikörper.....	51
3.1.6.1. Primäre Antikörper.....	51
3.1.6.2. Sekundäre Antikörper.....	52
3.1.6.3. Software.....	52
3.1.7. Isolation disseminierter mononukleärer Zellen mittels OncoQuick	53
3.1.8. Zellkultivierung der Prostatazelllinie 22Rv1	53
3.1.9. Material und Reagenzien: Westernblot-Analyse.....	54
3.2. Methodik	54
3.2.1. Studienprotokoll, Ethikvotum und Einschlusskriterien.....	54
3.2.2. Erfassung und Bewertung klinischer Daten.....	55
3.2.3. CTC-Isolation	55
3.2.3.1. Aufbereitung des Citrat-Blutes via OncoQuick.....	56
3.2.3.2. Bestimmung der Zellzahl via Neubauer-Zählkammer	57
3.2.3.3. Übertragung auf Objektträger via Zytospin.....	58
3.2.4. Methodik der immunhistochemischen Doppelfärbung	58
3.2.4.1. Vorbereitung und Vorbehandlung der Objektträger	59
3.2.4.2. Immunhistochemische Färbung mit Anti-CK8/18-Antikörper.....	61
3.2.4.3. Immunhistochemische Färbung mit Anti-AR-V7-Antikörper	62
3.2.4.4. Gegenfärbung und Versiegelung der Präparate	63
3.2.4.5. Immunhistochemische Positivkontrolle und „no primary antibody control“.....	63
3.2.4.6. Mikroskopische Auswertung der Präparate	64
3.2.5. Statistische Analyse	64
3.2.6. AR-V7 Antikörper-Testung im Westernblot.....	65
3.3. Zellkultivierung	66
4. Ergebnisse.....	68
4.1. Patientenkollektiv, Performance-Status und initiale Ausprägung des Prostatakarzinoms	68
4.1.1. Vortherapie in kurativer Intention (Radiatio oder rPx)	68
4.1.2. Intervall bis Diagnose eines CRPC	69
4.2. Spezifische Merkmale der Therapiegruppen	70
4.2.1. Die Patientenkohorte Abirateron	70
4.2.2. Die Patientenkohorte Enzalutamid.....	70
4.2.3. Die Patientenkohorte Docetaxel.....	70
4.2.4. Die Patientenkohorte Cabazitaxel.....	71
4.2.5. Prätherapeutisches Metastasierungsmuster der Patientenkohorte	71
4.3. Biochemischer und radiologischer Verlauf unter Therapie bei CRPC	71
4.3.1. Betrachtung des PSA-Nadir und der PSA-Remission/Rezidiv unter Therapie.....	72
4.3.1.1. Betrachtung der PSA-Remission und des PSA-Rezidiv in Abhängigkeit der Therapiegruppen	72
4.3.2. Bildmorphologische Kontrolle des Therapieerfolges.....	76
4.3.2.1. Radiologisches Follow-up bezogen auf die jeweiligen Therapiegruppen.....	76
4.3.3. Vergleich des biochemischen und radiologischen Ansprechens unter Therapie	77
4.4. Follow-up	80
4.5. Auswertung und Interpretation der immunhistochemischen Färbung.....	80

4.5.1. Antikörperverifizierung	80
4.5.2. Schematische Darstellung der Positiv-/Negativkontrollen der Zelllinie 22Rv1	81
4.5.3. Evaluation der Blutentnahmen und Isolation der zirkulierenden Tumorzellen (CTC)	82
4.5.4. Objektträgergewinnung und immunhistochemische Färbung.....	82
4.5.4.1. Beurteilung der CTC mit Detektion der CK8/18- und AR-V7-Expression.....	83
4.6. Der AR-V7 Status in CTCs als Prognosefaktor und Entscheidungskriterium der Tumorthherapie beim CRPC.....	85
4.6.1. Prädiktiver Wert von AR-V7 positiven CTCs bei Patienten unter Behandlung mit Antiandrogenen oder taxanbasierter Chemotherapie	85
4.6.2. Prädiktiver Wert von AR-V7 positiven CTCs bei Patienten unter Behandlung mit Antiandrogenen (Abirateron u. Enzalutamid).....	88
4.6.3. Prädiktiver Wert von AR-V7 positiven CTCs bei Patienten unter Behandlung mit taxanbasierter Chemotherapie (Docetaxel u. Cabazitaxel).....	90
4.6.4. Beurteilung der Konversion der AR-V7 Positivität/Negativität unter Therapie als Prognosefaktor	92
5. Diskussion.....	93
6. Zusammenfassung.....	108
7. Literaturverzeichnis	110
8. Anhang	122
8.1. Patienteninformation und Patienteneinwilligung	122
8.2. Entnahme der Blutprobenserien gruppiert nach Therapieregime	125
8.3. Excell-Tabelle mit Patientendaten der taxanbasierten Therapiegruppe (Doce + Caba).....	126
8.4. Excell-Tabelle mit Patientendaten der antihormonellen Therapiegruppe (Abi + Enza)	127
8.5. Boxplot-Analysen ergänzend zu Unterpunkt 4.6.....	129
9. Danksagung.....	130
10. Tabellarischer Lebenslauf	130

Abkürzungsverzeichnis

ABC Proteine Abi A.d. AF 1/2 ADT AK ASRI AR AR-V7 AZ	ATP binding cassettes Abirateron Aqua destillata Activation Factor 1/2 Antiandrogene Therapie Antikörper Androgen-Signalweginhibitoren Androgenrezeptor Androgenrezeptor Variante 7 Allgemeinzustand	A
BE bPFS	Blutentnahme Biochemisches progressionsfreie Überleben	B
Caba ciAREs CRPC CTC CK CNV CSPC CYP	Cabazitaxel Classical Androgen Response Elements Kastrationsresistentes Prostatakarzinom Zirkulierende Tumorzellen Cytokeratin Copy Number Variants Kastrations-sensibles Prostatkarzinom Cytochrom P	C
d DBD DHEA DHT ddPCR Doce DMSO	Tag DNA- Binding-Domain Dehydroepiandrosteronacetat Dihydrotestosteron digital droplet PCR Docetaxel Dimethylsulfoxid	D
Enza ER ETS EZM	Enzalutamid Estrogenrezeptor E26 = homologue transcription factor family Extrazellulärmatrix	E
FDA FGF	Food and Drug Administration U.S. Fibroblast Growth Faktor	F
Ga-68 PSMA GnRH	Gallium-68 Prostata-spezifische-Membranantigen Gonadotropin Releasing Hormon	G
HPC HRP HRPC HRE H-Region HSP-90 HSPCa	Hereditäre Prostatakarzinom Meerettichperoxidase hormonrefraktär Prostata Karzinom hormone regulatory or responsive elements Hinge-Region Heat Schock Protein 90 Hormonsensibles Prostatakarzinom	H
IAB	intermittierender Androgenblockade	I
kDA	Kilodalton	K
LBD LH LHRH LTA	Ligand- Binding Domain luteinisierendem Hormon luteinisierendes Hormon Releasing Hormon labortechnische Assistentin	L
MGAT4C mCRPC mCSPC MFS	alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein 4-beta-N-acetylglucosaminyltransferase C metastasierte CRPC metastasiertes kastrations-sensibles Prostatakarzinom metastasenfreies Überleben	M
NCCN NLS nmCRPC NPCs NTD	National Comprehensive Cancer Network nuclear localization signal Nicht-metastasierte CRPC nuclear-pore complexes Amino(N)- Terminal Domain	N
OS OT	Overall Survival Objektträger	O
PBS PCa PFS PET-CT PSA PSMA ptDNA	Phosphat Bufferd Saline Prostatakarzinom progression-free survival Positron emission tomography-computed tomography Prostata-spezifische Antigen Prostata-spezifische-Membranantigen plasma tumor DNA	P
RanGTP RAP74 RECIST rPx rPFS	Ras-related nuclear protein Guanosinriphosphat RNA polymerase II-associating protein 74 Response evaluation criteria in solid tumors radikale Prostatovesikulotomie radiologisches progressionsfreie Überleben	R
selAREs SNP SPECT-CT SRE	selective Androgen Response Elements Single Nucleotide Polymorphism single photon emission computed tomographie skeletal related event	S
TIF TRUS	Transkriptionsfaktoren Transrektaler Ultraschall	T
UCT	Universitäre Zentrum für Tumorerkrankungen	U

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse mit Negativer-Feedback-Schleife
Abb. 2: Schematische Darstellung funktioneller Anteile des AR und Testosteroninteraktion
Abb. 3: Blockade der 17 α -Hydroxylase durch Abirateron
Abb. 4: Wirkmechanismus von Enzalutamid
Abb. 5: Molekulare Bestandteile des Spindelapparates und der schematische Ablauf der Mitose
Abb. 6: Schematische Darstellung des genetischen Aufbaues des Androgenrezeptors
Abb. 7: Schematische Darstellung der Resistenzmechanismen beim Prostatakarzinom
Abb. 8: Der Proteinauftrag des AR-V7-AK für Westernblot-Analyse an 22Rv1-Zelllinien
Abb. 9: (Bildrechte ©Greiner Bio-One) Schematische Darstellung Dichtezentrifugation OncoQuick
Abb. 10: Intervall bis Diagnose eines CRPC
Abb. 11: Metastasierungsmuster der Gesamtkohorte
Abb. 12: prozentualer PSA-Abfall der Therapiegruppen
Abb. 13: exemplarischer PSA-Verlauf unter Cabazitaxel
Abb. 14: exemplarischer PSA-Verlauf unter Docetaxel
Abb. 15: exemplarischer PSA-Verlauf unter Enzalutamid
Abb. 16: exemplarischer PSA-Verlauf unter Abirateron
Abb. 17: Biochemischer und radiologischer Progress unter Therapie
Abb. 18: Westernblot-Analyse des AR-V7 Antikörpers
Abb. 19: Positiv- und Negativkontrollen der 22Rv1-Zelllinien nach AR-V7/CK 8/18-AK-Färbung
Abb. 20: CTCs der Patientenproben nach AR-V7/CK 8/18-AK-Färbung
Abb. 21: Exemplarische CTCs von Patientenproben mit AR-V7 Nachweis
Abb. 22: Exemplarische CTC von Patientenproben nach ohne AR-V7 Nachweis
Abb. 23: CTCs einer Patientenprobe mit positiver AR-V7(rot)/+CK 8/18(braun)-AK-Färbung
Abb. 24: CTCs einer Patientenprobe mit positiver CK8/18(braun)-AK-Färbung

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Biomarker beim hormonsensiblen Prostatakarzinom
Tab. 2: Experimentelle Biomarker im Stadium des CRPC
Tab. 3: Kummulative Eigenschaften der Gesamtkohorte der Patienten mit CRPC
Tab. 4: Kummulative Eigenschaften der antiandrogenen Therapiegruppe (Enza und Abi)
Tab. 5: Kummulative Eigenschaften der taxanbasierten Therapiegruppe (Doce und Caba)
Tab. 6: Blutentnahme-Serien mit Bezug auf die jeweiligen Patientengruppen
Tab. 7: Blutentnahme-Tabelle

Figures

- Figure 1: Waterfall-Plot der Gesamtkohorte mit Analyse des PSA-Ansprechens in Korrelation zur CTC/AR-V7 Positivität
Figure 2: Kaplan-Meier-Schätzer zur Analyse eines biochemischen Rezidivs bezogen auf die Gesamtkohorte in Abhängigkeit der CTC/AR-V7 Positivität
Figure 3: Kaplan-Meier-Schätzer zur Analyse eines radiologischen Rezidivs bezogen auf die Gesamtkohorte in Abhängigkeit der CTC/AR-V7 Positivität
Figure 4: Waterfall-Plot der antiandrogenen Therapiegruppe mit Analyse des PSA-Ansprechens in Korrelation zur CTC/AR-V7 Positivität
Figure 5: Kaplan-Meier-Schätzer zur Analyse eines biochemischen Rezidivs bezogen auf die antiandrogene Therapiegruppe in Abhängigkeit der CTC/AR-V7 Positivität
Figure 6: Kaplan-Meier-Schätzer zur Analyse eines radiologischen Rezidivs bezogen auf die antiandrogene Therapiegruppe in Abhängigkeit der CTC/AR-V7 Positivität
Figure 7: Waterfall-Plot der taxanbasierten Therapiegruppe (Doce und Caba) mit Analyse des PSA-Ansprechens in Korrelation zur CTC/AR-V7 Positivität
Figure 8: Kaplan-Meier-Schätzer zur Analyse eines biochemischen Rezidivs bezogen auf die taxanbasierte Therapiegruppe in Abhängigkeit der CTC/AR-V7 Positivität
Figure 9: Kaplan-Meier-Schätzer zur Analyse eines radiologischen Rezidivs bezogen auf die taxanbasierte Therapiegruppe in Abhängigkeit der CTC/AR-V7 Positivität

1. Einleitung

„The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate“ lautete die 1941 veröffentlichte Abhandlung von Charles Huggins und Clarence V. Hodges die eine Androgenabhängigkeit des Prostatakarzinoms (PCa) belegte (1). Die Kollegen demonstrierten, dass ein Androgenentzug mit Reduktion des Testosteronlevels im Serum positiven und eine erhöhte Androgenzufuhr negativen Einfluss auf die Tumorprogression haben (1). Daraus schlussfolgerten sie, dass Prostatakarzinomzellen Androgene als Energiequelle für ihren Metabolismus nutzen. Hiermit war der Grundstein für die erste systemische Therapie im Sinne der Androgendeprivation gelegt worden. Dieses Grundprinzip mit Suppression des Androgenhaushaltes im Blut hat über Dekaden hinweg die systemische Therapie bei disseminierter Prostatakarzinomerkrankung bestimmt. Kommt es trotz Kastrationsniveau zu einem Progress liegt ein kastrationsresistentes Prostatakarzinom (CRPC) vor (2). Pathophysiologisch bilden sich hier auf Grund einer ausgeprägten Heterogenität der Prostatakarzinomzellen Resistenzen gegenüber der antiandrogenen Therapie aus (3). Dafür sind im Stadium des CRPC in den letzten Jahren eine Vielzahl neuer Medikamente etabliert worden.

Im Stadium des nicht-metastasierten CRPC wurde in der SPARTAN Studie (4) eine Verlängerung des medianen metastasenfremen Überlebens (MFS) von 40,5 Monate vs. 16,2 Monate und für Enzalutamid in der PROSPER Studie (5) ein medianes MFS von 36,6 Monate vs. 14,7 Monate gegenüber der Placebogruppe demonstriert.

Die 1st-line Therapie beim metastasierten CRPC umfasst nach Empfehlung der EAU Guidelines 2019 (2) Abirateron (6) oder Enzalutamid (7) oder Docetaxel (8). Die COU-AA-302 (6) und die PREVAIL Studie zeigen dabei eine Verlängerung des Overall Survival (OS) für Abirateron auf 34,7 (6) bzw. für Enzalutamid auf 32,4 Monate (9) bei Chemotherapie-naiven Patienten. Ebenfalls steht in der 1st-line Therapie das Chemotherapeutikum Docetaxel mit einer Verlängerung des OS von 18,9 Monaten zur Verfügung (8). Für die 2nd-line Therapie sind neben den bereits genannten Medikamenten, weiterhin Cabazitaxel und Radium-223 optional einsetzbar. In den Zulassungsstudien von Enzalutamid (7) und Abirateron (10) in der 2nd-line Therapie bei Chemotherapieversagern zeigen sich dabei eine Verbesserung des OS um 4,8 bzw. 4,6 Monate. Cabazitaxel, ein semi-synthetisches Derivat

taxanbasierter Chemotherapeutika, ist zwar in der 2nd-line Therapie im Rahmen der TROPIC Studie (11) zugelassen, wird aber meist nach den Ergebnissen der FIRSTANA Studie (12) erst in der 3rd – oder 4th-line Therapie eingesetzt (2). Radium-223 zeigt in der ALSYMPCA Studie nach erfolgter 1st-line Hormontherapie und bei Chemotherapie-unfähigen CRPC Patienten eine Verbesserung des OS um 3,6 Monate (13), wird jedoch ebenfalls meist frühestens in der 3rd-line appliziert (2).

Die Anwendung des CYP17-Inhibitors Abirateron (Abi) und des Androgenrezeptor-Blockers Enzalutamid (Enza), sowie der Chemotherapien Docetaxel (Doce) und Cabazitaxel (Caba) sind dabei mit der Gefahr vergesellschaftet durch Ausbildung heterogener Resistenzmechanismen zu einem frühzeitigen Therapieversagen zu führen. Hier wäre ein Werkzeug wünschenswert an Hand dessen die Initiierung eines individuellen Therapie-Algorithmus beim CRPC abgeleitet werden kann.

Einer der Hauptgründe für das Therapieversagen scheinen dabei das Auftreten von Splicevarianten insbesondere des AR-V7 zu sein. Eine Reihe von Arbeitsgruppen (14-18) postulieren dabei, dass die Expression der Splicevariante des Androgenrezeptors AR-V7 in zirkulierenden Tumorzellen eine Prognose über das Ansprechen der o.g. Therapien zulässt. Splicevarianten entstehen dabei durch alternatives Zusammensetzen von Exons im Rahmen der Prozessierung der prä-mRNA zur mRNA, wodurch nach Translation abgewandelte Proteinkomplexe entstehen (19, 20). Folglich entstehen hier Varianten des Androgenrezeptors bei verändertem molekularem Aufbau und funktionellen Unterschieden (19).

Die o.g. Kollegen führen dabei ein Therapieversagen auf die insuffiziente Wirkung auf den AR-V7 zurück. Zudem wird hier postuliert, dass Androgen-Signalweginhibitoren (Abi oder Enza) diesem Resistenzmechanismus mehr unterlegen sind, als taxanbasierte Chemotherapien (Doce oder Caba) (21). Damit wird suggeriert, dass der AR-V7 Status als Biomarker beim CRPC fungieren könnte (16). Biomarker sind dabei messbare und objektivierbare Merkmale die auf pathologische oder physiologische Prozesse hinweisen können (22). Im Rahmen des CRPC sind neben dem AR-V7 viele experimentelle Biomarker-Studien in Erprobung die Therapieentscheidungen in Zukunft verbessern sollen (23-26), ein viel diskutierter Biomarker bleibt dabei der AR-V7.

Mehrere Studien haben dabei aufzeigen können, dass die weitere Zerlegung isolierter zirkulierender Tumorzellen (CTC) in seine molekularen Bestandteile individuelle Informationen liefern kann (15, 16, 27-29). CTCs sind von einem Tumorzellverbund in das Lymph- oder Blutstromgebiet abgesonderte Tumorzellen, die nach erfolgreicher Extravasation und Migration in ein sekundäres Gewebe das Potential besitzen, Fernmetastasen auszubilden (30). Diese CTCs können dabei aus Vollblut isoliert und zur Diagnostik herangezogen werden.

Insbesondere der Nachweis der Androgenrezeptor Splicevariante AR-V7 auf CTCs hat dabei im Rahmen weiterer molekularer Charakterisierung in der Verwendung als prädiktiver Biomarker großes Interesse erlangt. Basierend auf dem Protein- oder mRNA-Spiegel, haben mehrere Arbeitsgruppen zeigen können, dass der Nachweis von AR-V7 in CTCs das Potential beherbergt prädiktiv Therapieentscheidungen in Stadium des CRPC zu fällen (15, 18, 31).

Zwar sind zuletzt standardisierte methodische Ansätze zum Nachweis von AR-V7 aus CTCs etabliert worden (14, 32), dennoch bleiben diese valide Aussagen bezüglich seines prädiktiven Wertes beim CRPC schuldig.

1.1. Epidemiologie des Prostatakarzinoms

Das PCa ist mit jährlich 1,276,106 Neudiagnosen (449,761 in Europa und 234,378 in Nordamerika) und jährlich 358,989 Todesfällen weltweit eine der häufigsten Tumorentitäten der Welt (33, 34). 90% der Prostatakarzinomneuerkrankungen werden dabei im lokalisierten Stadium detektiert (35). Die Inzidenz ist dabei weiterhin, vor allem im Hinblick auf den demographischen Wandel und die Ausweitung der Screening-Programme, steigend (36, 37). Die Mortalität ist hingegen in einigen Industrienationen leicht rückläufig (38). Das Durchschnittsalter der Erkrankten beträgt 66 Jahre (35), wobei rund 85 % (39) der Diagnosen nach dem 65ten Lebensjahr gestellt werden. Die 5 Jahres Überlebensrate beträgt dabei bei lokalisierten Tumoren 100 %, bei primär metastasierten Tumoren lediglich 31 % (35). Dabei hat sich die Zahl des PCa, die vor dem 70ten Lebensjahr diagnostiziert werden („*age shift*“), als auch die Zahl der lokalisierten Tumore („*stage shift*“), sprich der undifferenzierten Tumore, stark erhöht (40). Beides ist primär auf die ausgeweiteten Screening-Programme zurückzuführen. Autopsiestudien (41) aus

Detroit (USA) haben zudem ergeben, dass 30 % der 30-jährigen, 50 % der 50-jährigen und 75 % der 85-jährigen Männer ein latentes PCa aufweisen (42). Bei der Betrachtung der Inzidenz einzelner Länder stellt man interessanterweise erhebliche Diskrepanzen fest. Während eine geringe Inzidenz in asiatischen Ländern herrscht, ist sie traditionell in den Industrienationen der westlichen Welt am höchsten. Diese Diskrepanzen werden vornehmlich auf diätische und genetische Faktoren zurückgeführt (39, 43).

1.2. Pathogenese des Prostatakarzinoms

Genetische Faktoren: Familiäre Prädispositionen sind durch die 2-3-fache Zunahme der Inzidenz bei einem erkranktem Verwandten ersten Grades verifiziert. Ferner nimmt das Risiko auf das 3-5 fache zu, wenn der Verwandte bei Diagnosestellung ≤ 65 Jahre alt war oder ≥ 2 weitere Verwandte erkrankt waren (44-46). Skandinavische Zwillingsstudien schätzen die Erblichkeit des PCa sogar auf 58 % (47) bzw. 42 % (48) ein. Vor allem durch die Suche nach genetischen Variationen in Form von SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) und neuerdings CNVs (*Copy Number Variants*), konnten bereits einige Genloci bzw. Gensequenzen, wie beispielsweise *TMPRSS2* oder *CDKN2B-AS1*, bestimmt werden, die mit einem erblichen Risiko für das PCa einhergehen (49). Darüber hinaus enthalten SNPs und CNVs zusätzlich prognostische Information über das Gesamtüberleben und die Sterblichkeit (49, 50). SNPs sind dabei genetische Variationen die sich nur durch einen einzelnen Nukleotid innerhalb einer DNA-Sequenz unterscheiden. CNVs beziehen sich hingegen auf genetische Variationen einiger hunderter Nukleotide. Hierbei kommt es zum Verlust durch Deletion oder zum Gewinn durch Duplikation von Genmaterial. Beides kann pathologische Auswirkungen haben. Neben den bereits länger bekannten Genen, wie für *EPAC2*, *RNASEL*, *MSR1*, *CHEK2*, *CAPZB*, *Vitamin-D-Rezeptor* und *PON1* (43), die eine mögliche Verbindung zu hereditären PCa besitzen, konnten seitdem weitere vielversprechende Genloci identifiziert werden. *HOXB13* ist beispielsweise ein Transkriptionsfaktor kodiert auf 17q21-22 (51) und tritt signifikant in hereditären PCa (HPC)-Familien gehäuft auf. Weiterhin wurde basierend auf einer Kohorte (52) mit 1903 Patienten kaukasischen Ursprungs aus der „*Tyrol Prostate Specific Antigen Screening Cohort*“ zwei CNVs mit erhöhtem Risiko für PCa identifiziert (53). Der eine Genlocus auf 15q21.3 steht in Verbindung

mit Bindungsstellen des AP-1 (*activator protein*) Transkriptionsfaktors, der andere Genlocus auf 12q21.31 codiert durch das *MGAT4C* Gen die *Glycosyltransferase alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein 4-beta-N-acetylglucosaminyltransferase C* (*MGAT4C*). *MGAT4C* moduliert dabei in *in vitro* Zellversuchen Migration und Proliferation benigner und maligner Tumorzellen und wird bei metastasiertem PCa verstärkt exprimiert (53). Nebst diesen stehen genetische Polymorphismen des AR im Fokus, wie der in dieser Arbeit untersuchte AR-V7. Speziell Variationen der *Polyglutamin(CAG)*- und *Polyglycin(GGC)*- *Repeats* im Exon 1 (54) sollen mit erhöhtem PCa-Risiko einhergehen. So wurde von *Giovannucci et al.* postuliert, dass eine geringe Anzahl dieser *Repeats* negative Auswirkungen hat (54-56). Die *CAG Repeats* geben dabei eine Polyglutaminkette vor, die wiederum an der DNA-Transkription der AR beteiligt ist. Je länger diese *CAG Repeats* sind, desto geringer ist die transkriptionale Aktivität des AR (54) mit protektiven Effekt auf das Auftreten eines PCa.

Ökologische Faktoren: Die Ergebnisse ökologischer Studien haben gezeigt, dass die PCa-Inzidenz positiv mit dem westlichem Lebensstil korreliert (57). Vor allem die Differenzierung eines latenten PCa in ein manifestes PCa wird dabei vermutlich durch ungesunde Ernährung forciert. Fettreiche (58), vor allem gegrilltes rotes Fleisch, sowie kalziumreiche Ernährung (42) scheinen negative Auswirkungen zu haben. Lycopin hingegen, ein Antioxidant welches in hohem Maße in Tomaten vorkommt, zeigt einen protektiven Effekt (59). Alkohol- und Nikotinkonsum scheinen hingegen kaum Auswirkungen zu haben (42).

1.3. Definition des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms (CRPC)

Per definitionem kann bei einem laborchemischen oder radiologischen Progress unter Kastrationsniveau von einem Übergang des hormonsensiblen PCa in ein CRPC gesprochen werden (2). Der vorher verwendete Terminus des HRPC (hormonrefraktär Prostata Karzinom), sprich eine Tumorentität die nicht mehr auf eine hormonablative Therapie ansprüche, ist nach heutigem Kenntnisstand obsolet (60, 61). Verschiedenste Forschungsgruppen demonstrierten, dass die Prostatakarzinomzellenzellen weiterhin sensibel auf eine Blockade der androgenen Achse reagieren (62). Das Intervall bis zur Entwicklung eines CRPC bei Patienten mit

neu-diagnostizierten HSPCa beträgt 5.8 Jahre unter kontinuierlicher Androgenblockade und 5.1 Jahre bei Durchführung einer intermittierenden Androgenblockade (63).

In älteren Studien variiert das mittlere Überleben nach Diagnosestellung eines CRPC bei asymptomatischen Patienten mit 9-27 Monaten und bei symptomatischen Patienten mit 9-16 Monaten stark (42). Aktuellere Daten aus der COU-AA-302 Studie können hingegen unter Verwendung des CYP17-Inhibitors ein OS von 34,7 Monaten (6), sowie im Rahmen der PREVAIL Studie ein OS von 35,3 Monaten aufzeigen (64). Ein CRPC ist aktuell nach den EAU Guidelines folgendermaßen definiert (2):

Serumtestosteron < 50 ng/dl oder < 1,7nmol/L plus

- a) biochemischer (drei aufeinanderfolgende PSA-Anstiege mit einwöchigem Abstand, die zwei Anstiege um 50 % über Nadir ergeben, und ein PSA-Spiegel > 2ng/ml) oder
- b) radiologischer Progression mit Auftreten neuer Läsionen, definiert als zwei oder mehr Knochen-Läsionen in der Knochenszintigrafie oder einer Läsion im Weichgewebe unter Berücksichtigung der RECIST Kriterien.

1.4. Rolle und Aufbau des Testosterons und des Androgenrezeptors

Die Interaktion zwischen Testosteron und dem Androgenrezeptor (AR) stellt die treibende Kraft des PCa dar und ist erster Ansatz der medikamentösen Tumorthherapie.

1.4.1. Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse und physiologische Rolle des Testosterons

Das steroidale Hormon Testosteron wird reaktiv durch Aktivierung der zentralen hormonellen Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse ausgeschüttet (Abb.1). Das Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) des Hypothalamus initiiert dabei die pulsatile Sekretion von luteinisierendem Hormon (LH) aus der Adenohypophyse, welches schlussendlich primär in den Leydig-Zellen des Hodens die Testosteronproduktion stimuliert (14). Mittels negativen Feedbacks im Sinne einer Rückkopplung durch das Testosteron im Blutspiegel erfolgt wiederum die Regulation der zentralen Hormonexpression.

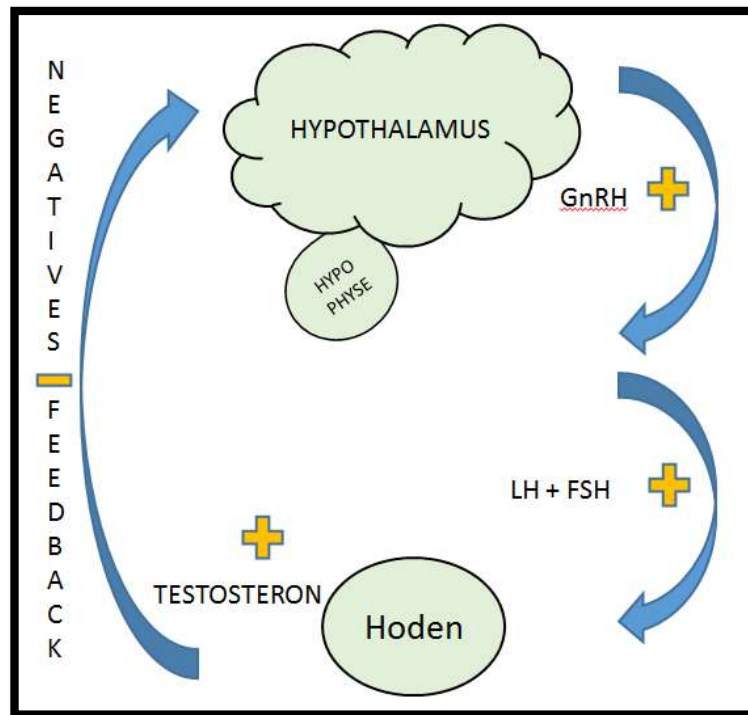


Abb. 1. Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse mit Negativer-Feedback-Schleife.

Neben dem Hoden sind auch die Nebennierenrinde, hier das Stratum reticularis, und Fettgewebe zur Testosteronproduktion im geringen Maße befähigt. Testosteron wird intrazellulär mittels der 5-Alpha-Reduktase zu seinem aktiveren Metabolit dem Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt (65). Das Hormon Testosteron führt u.a. zur Anregung des Muskel- und Knochenwachstums, Verminderung von viszeralen Fett, gesteigerter Blutbildung v.a. der Erythropoese, Libidosteigerung, Verhaltensänderung im Sinne erhöhter Aggressivität, Appetitsteigerung und Reifung der Spermatozoen bei Passage durch Nebenhoden und Ductus deferens (66). Die Restriktion des Testosteronhaushalts mit einem Zielwert $< 50 \text{ ng/dl}$ oder $< 1.7 \text{ nmol/l}$ durch eine Androgendeprivation ist dabei erster Therapieansatz einer palliativen PCa-Therapie (67). Neuere Daten weisen sogar daraufhin, dass eine Absenkung des Testosteronspiegels unter Antiandrogendeprivation auf $< 0,7 \text{ nmol/l}$ oder $0,2 \text{ mg/dl}$ innerhalb des ersten Jahres mit einem signifikant verbesserten Gesamtüberleben einhergeht (68). Die Antiandrogendeprivation führt in Abhängigkeit der Tumorausprägung oft zu einer längeren Sistierung der Erkrankung bis sich auf Grund verschiedener Mechanismen (Abb.7) aus dem PCa ein CRPC herauskristallisiert hat. Die Nebenwirkungen einer antiandrogenen Therapie sind

dabei Libidoverlust, Erektionsstörungen, Depressionen, Leistungsminderungen Schlafstörungen Hitzewallungen, Gynäkomastie und die Abnahme der Muskelkraft (15).

1.4.2. Androgenrezeptor und sein molekularer Aufbau

Der AR ist ein Steroidrezeptor zugehörig der Superfamilie der nuklearen Rezeptoren mit der Funktion eines klassischen Transkriptionsfaktors (Klassifikation: *NR3C4* = *nuclear receptor superfamily 3; group C; number 4*) (69). Er ist auf Chromosom X an Position Xq11-Xq12 lokalisiert und besteht aus 8 Exons (70, 71) zu ~2 757 bp. Vor allem aufgrund der unterschiedlichen Anzahl an *Polyglutamin(CAG)*- und *Polyglycin(GGC)*- *Repeats* im Exon 1 variiert die Gesamtanzahl seiner Aminosäuren stark (54), wobei die Referenzlänge in Anlehnung an die „*Androgen Receptor Gene Mutations Database*“ mit 920 Aminosäuren (72) angegeben wird. Der AR wird zu zwei Isoformen exprimiert: Der predominanten Isoform AR-B mit ~110 kDa, steht eine in der NTD-Region trunkeerte Isoform AR-A mit ~87 kDa gegenüber (73, 74). Die Expression des AR ist dabei in PCa-Zellen hochreguliert, wobei aufgezeigt wurde, dass hier vor allem die Isoform AR-A eleviert zu sein scheint (75). Die genauen intrazellulären Wechselwirkungen und Funktion der beiden Isoformen sind dabei weiterhin Gegenstand der Forschung. Ferner ist eine Vielzahl an Splicevarianten und Mutationen des AR insbesondere bei PCa- Patienten bekannt. Wie alle Mitglieder der Superfamilie der nuklearen Rezeptoren, besteht der AR strukturell aus vier funktionellen Einheiten (Abb.2) (76): Amino(N)-Terminal Domain (NTD), DNA-Binding-Domain (DBD), Hinge-Region (H) und Ligand-Binding Domain (LBD).

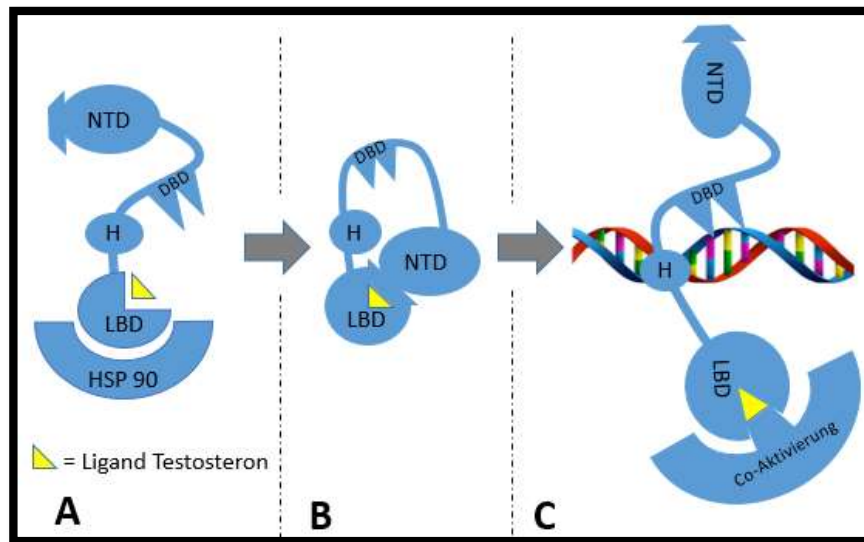


Abb.2 (modifiziert nach Shen et al. (76)): Schematische Darstellung der funktionellen Anteile des Androgen Rezeptors und die Interaktion mit Testosteron; A = AR in ungebundenem Zustand; B = nach Kopplung zu Testosteron; C = AR-Interaktion mit der DNA nach nuklearen Transfer. NTD (Amino(N)-Terminal Domain), DBD (DNA- Binding-Domain), H (Hinge-Region), LBD (Ligand- Binding Domain), HSP90 (HeatShockProtein).

NTD (Amino(N)- Terminal Domain) wird exprimiert durch Exon 1

Die NTD-Region ist in seiner Länge und insbesondere in seiner Aminosäuresequenz höchst variabel. Die NTD-Region ist für die Transaktivierung und Co-Regulatorrekrutierung während der Bindung des AR an der DNA maßgeblich (Abb.2). Dadurch kann sie die Genexpression induzieren oder reprimieren. Die Struktur der NTD-Region ist dabei in der Literatur nur unzureichend beschrieben. Es ist davon auszugehen, dass es sich hierbei überwiegend um eine α -Helix handelt. Die NTD ist nach neuesten Kenntnissen mit der Transaktivierungsregion AF-1 (*Activation Factor 1 = AR-Rezeptor Transaktivierungsdomäne*) (77) gleichzusetzen und enthält die Transaktivierungseinheiten 1 und 5. Für Steroidrezeptoren untypisch spielt im AR die AF-1 Domäne des NTD gegenüber der AF-2 des LBD bei der Transaktivierung die übergeordnete Rolle (78). Diese AF-1 Domäne liegt zunächst als einfache Aminosäuresequenz mit partiellen Sekundärstrukturen vor und wird erst durch TFIIF, ein allgemeiner Transkriptionsfaktor, bzw. durch dessen Untereinheit RAP74 (*RNA polymerase II-associating protein 74*), in eine stabile α -Helix Struktur gebracht. Hiernach ist die NTD-Region zu weiteren Interaktionen mit

Transkriptionsfaktoren, mit nuklearen Co-Aktivatoren und insbesondere mit der Carboxylgruppe des LBD fähig (79, 80).

DBD (DNA- Binding-Domain) wird exprimiert durch Exon 2 + 3

Die DBD-Region ist einem Steroidrezeptor entsprechend mit zwei Zinkfingerdomänen ausgestattet. Zinkfingerproteine sind Polypeptidketten in deren Zentrum ein Zinkion lokalisiert ist, worüber die Interaktion mit anderen Molekülen, insbesondere mit Nukleinsäure gewährleistet wird (Abb.2). Die erste Zinkfingerdomäne des AR interagiert mit der DNA, die zweite dient der Stabilisierung des AR-Komplexes bei der Dimerisation (70).

H (Hinge)-Region wird exprimiert durch Exon 4

Ursprünglich nur als flexibles Verbindungsglied zwischen DBD und LBD (Abb.2) deklariert, geht man mittlerweile von einer komplexeren Rolle aus.

Der nukleare Transport beispielsweise wird durch das nukleare Lokalisationssignal (NLS) ermöglicht. NLS ist eine Aminosäuresignalsequenz überwiegend aus Lysin und Arginin Residuen, die den Import des AR vom Zytoplasma in den Nukleus ermöglicht. Der NLS des AR besteht dabei aus einem zweiteiligen Komplex: aus der Carboxyterminale des zweiten Zinkfingers und der Aminoternale der Hinge-Region (81).

Weiterhin läuft die Bindung des AR Homodimers mit der DNA klassischerweise bei Steroidrezeptoren in einer „*head-to-head*“ Konformation ab, wobei typische Nukleinsäuresequenzen (bspw. 5'-AGAACA-3') als Erkennungselemente dienen. Für den AR sind diese typischen Elemente als sogenannte „*Classical Androgen Response Elements*“ (clAREs) beschrieben. Neben diesen clAREs, die vielen Steroidrezeptoren gemein sind, gibt es nur für den AR spezifische Erkennungselemente: die „*selective Androgen Response Elements*“ (selAREs). Eine alternative AR Dimerisation an der DNA in „*head-to-tail*“ Konformation ist vermutlich bei der Entscheidung, ob clAREs oder selAREs gebunden wird ursächlich (82). Bei der Unterscheidung zwischen clAREs und selAREs ist wiederum der Komplex aus zweitem Zinkfinger und Hinge-Region involviert (83, 84).

Zusätzlich lenken vielfältige posttranslationale Modifikationen der Hinge-Region via Acetylation, Phosphorylation, Methylation und Ubiquitation eine Vielzahl an funktionellen Effekten, die schlussendlich einen erheblichen Einfluss auf eine adäquate Gentranskription nehmen (85). Diese Summe an regulativen Funktionen macht die Hinge-Region für Mutationen sensibel und spielt folglich ebenfalls eine Rolle beim PCa (84, 86).

LBD (Ligand- Binding Domain) wird exprimiert durch des Exon 4+5+6+7+8

Mittels Röntgenkristallographie konnte die LBD-Region, welche auf dem Carboxy-Terminus des AR lokalisiert ist, sehr detailliert beschrieben werden. Die dreidimensionale Struktur entspricht einer dreischichtigen antiparallelen α -Helix, die in seiner Konformation einem „Sandwich“ (87) ähnelt. Sie ist aufgebaut aus 11 α -Helices und 4 β -Strängen, die zu einer antiparallelen β -Faltblattstruktur angeordnet sind. Die N-Termini der Helices H3, H5 und H11 bilden dabei die funktionsgebende Einheit der LBD, das LBP (Ligand Binding Pocket), welches die ligandenabhängige Stimulation des AR gewährleistet und den Startpunkt der Signaltransduktion markiert. Helix H12 ist dabei eine Art Verschlusssequenz, die das LBP nach Interaktion mit einem Liganden, ähnlich eines Deckels verschließt (88, 89) (Abb. 2). Zusätzlich beherbergt LBD die Transaktivierungsregion AF-2 (*Activation Factor 2*), welche zusätzlich Bindungen zu TIF (Transkriptionsfaktoren) und Co-Aktivatoren ermöglicht und somit Einfluss auf die Transkription ausüben kann (90-93).

1.4.3. Signaltransduktion des Androgenrezeptors

Der inaktive AR liegt primär zytoplasmatisch gebunden an sogenannte Heat-Shock-Proteine, sowie in seiner aktiven Funktion als Transkriptionsfaktor nuklear vor (94). Neuere Erkenntnisse lassen zusätzlich darauf schließen, dass neben den intrazellulären AR (iAR) auch membranständige AR (mAR) ausgebildet sind (95). Singulär und inaktiv ist der AR im Zytoplasma zu einem Chaperon gebunden. Chaperone sind supportive Moleküle, die die exakte Ausbildung komplexer Strukturen der anfänglich noch nativen AR gewährleisten und beschleunigen. Sie sind jedoch nicht für den AR spezifisch. Eine übergeordnete Rolle im AR nimmt

hierbei das Chaperon HSP-90 (*Heat Shock Protein 90*) ein (96). Die Inaktivierung dieser Chaperone ist bereits als pharmakologischer Ansatzpunkt festgemacht und könnte einen positiven Effekt auf das Gesamtüberleben haben (97, 98), vor allem da Tumorzellen zu einer erhöhten Expression dieser Chaperone neigen (99, 100). Nach intrazellulärer Umwandlung von Testosteron zu DHT durch die 5-Alpha-Reduktase bindet dieses an den AR (65). Es erfolgen nacheinander erst die Absonderung vom Chaperon, sowie anschließend eine Dimerisation im Zytoplasma. Die Dauer von der Aktivierung im Zytoplasma bis zur Translokation in den Nucleus beträgt 15 - 60min (101). Der entstandene AR-Komplex translokiert nun in den Nucleus, um nach Bindung an die Androgen-Response Elemente der DNA die genetische Expression seiner Zielgene z.B. PSA zu beeinflussen. Die Translokation des AR über die Doppelmembran des Zellkerns erfolgt über NPCs (*nuclear-pore complexes*) (102). Dabei interagiert die NLS Sequenz der Hinge-Region des AR mit den zytoplasmatischen Proteinkomplexen Importin- α und Importin- β , die den Transport über die NPC ermöglichen. Importin- α und Importin- β werden durch RanGTP (*Ras-related nuclear protein Guanosin triphosphat*) im Nucleus abgespalten und wieder zytoplasmatisch bereitgestellt (102, 103). Der AR-Ligand-Komplex kann nun mit der DNA interagieren. Die Kommunikation mit der DNA erfolgt dabei über direkte oder indirekte Bindung (104) unter Einfluss einer Vielzahl an Co-Regulatoren, die v.a. die Kommunikation mit Histonen und Transkriptionskomplexen erlauben. (72). Co-Regulatoren umfassen dabei Co-Aktivatoren (*bspw. CBP/p300*) (105) und Co-Repressoren (*z.B. NCoR/SMRT*) (106) . Aus der direkten Bindung des AR-Dimers zur DNA, hier zu spezifischen "*Androgen-Response Elements*" (ARE) (107), resultiert die Transkription. Der AR-Dimer kann dabei inhibierend und aktivierend auf die Transkription Einfluss nehmen (108). Die Translation zu Aminosäuresequenzen der durch die Transkription exprimierten mRNA erfolgt sodann an zytoplasmatischen Ribosomen.

1.5. Mechanismus der Metastasierung

Pathognomisch für maligne Tumorerkrankungen ist die Fähigkeit des invasiven Wachstums oder deren Fähigkeit über das Blut-/Lymphstromgebiet Absiedlungen des Primärtumors zu bilden (30). Diese Absiedlungen werden Metastasen oder Filiae genannt. Für das PCa sind neben nodalen Filiae v.a. Metastasen im Knochen,

seltener viszeral zu erwarten. Sie führen beim PCa v.a. zu Knochenschmerz, Fatigue, Schlafstörungen, Obstipation und anderen tumorabhängigen Komplikationen (109), welche die Lebensqualität der Patienten erheblich einschränken können. Darüber hinaus sind sie beim PCa der lebenslimitierende Faktor.

1.5.1. Zirkulierende Tumorzellen (CTC)

CTCs sind von einem Tumorzellverbund in das Lymph- oder Blutstromgebiet abgesonderte Tumorzellen die, sofern eine erfolgreiche Extravasation und Migration in ein sekundäres Gewebe erfolgt, das Potential haben eine Fernmetastase auszubilden. Eine Fernmetastase entspricht einer Metastase die nicht in der Nähe des Primärtumors lokalisiert ist oder über das lokoregionäre Lymphabstromgebiet des Primärtumors herausragt. Der Prozess der Metastasierung ausgehend von der Aussendung von CTCs und deren Einnistung in ein sekundäres Organ ist höchst ineffizient. Nur bei 0,01% der ausgesendeten CTCs kommt es zur Extravasation (110). Hinzu kommt, dass eine Persistenz und Proliferation im sekundären Gewebe nicht zwangsläufig gegeben ist. Eine Ursache für dieses Missverhältnis ist sicherlich der Tatsache geschuldet, dass die CTC nach erfolgreicher Intravasation im Blutstromgebiet erheblichen Scherkräften und dem Immunsystem ausgesetzt sind (111), wodurch nur circa 1% der CTC überhaupt überleben (112). Allerdings haben die CTCs durch Bildung von Konglomeraten v.a. mit Thrombozyten oder im Zusammenschluss mehrerer CTCs einen Mechanismus entwickelt, der zum einen die Einwirkung der Scherkräfte und des Immunsystems reduziert und gleichzeitig durch Zunahme des Durchmessers den Zirkulationsstopp im Kapillarbett fördert (111). Darüber hinaus initiieren viele CTCs bei fehlendem Kontakt zu Bestandteilen der EZM im Blutstrom die Anoikis, den programmierten Zelltod (111). Die CTC spiegelt dabei direkt (113) Eigenschaften des Primärtumors wieder.

1.5.2. Organotropie des Prostatakarzinoms

Das Phänomen, das Fernmetastasen verschiedener Tumorentitäten einem klassischen Metastasierungsmuster unterliegen, wird Organotropie genannt. Für das

PCa sind neben den nodalen Filiae v.a. Metastasen im Knochen zu erwarten. Viszerale Metastasen in Leber, Lunge und Gehirn sind seltener nehmen aber auf Grund der verbesserten CRPC-Therapie erheblich zu (114). Der Anteil an viszeralen Metastasen bei Diagnosestellung eines mCRPC liegt dabei bei ca. 17 % (115). Die Gründe der Organotropie basieren vermutlich auf einem Zusammenspiel folgender Prozesse (30, 110, 111):

- Zirkulationsstopp der CTC im Kapillarbett des Abstromgebietes
- Vorherrschendes Mikromilieu nach Extravasation
- strukturelle Beschaffenheit der CTC

Der mechanische Zirkulationsstopp der CTC im Kapillarbett eines Organs in Abhängigkeit des spezifischen Abstromgebietes des Primärtumors ist der naheliegende Grund für ein Organotropie. Klassisches Abstromgebiet der Prostata ist dabei der wirbelnahe Batson-Venen-Plexus (110, 116). Dies ist zudem eng an den vorherrschenden Perfusionsdruck im jeweiligen Organ und an dortige Passierbarkeit des Endothels gekoppelt. Lungenkapillaren sind beispielsweise relativ stark durchblutet, haben aber im Gegensatz zum Kapillarbett der Knochen eine undurchlässigere Endothelschicht (117). Eine andere Ursache für die Organotropie ist, dass bestimmte Tumore ein bestimmtes Milieu nach erfolgreicher Extravasation in das sekundäre Gewebe zur Vervielfältigung vorfinden müssen (110, 118). Das heißt bestimmte Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle und Elemente der EZM im jeweiligen Gewebe begünstigen die Tumoranheftung und –entwicklung (119, 120). So geht man beispielsweise beim PCa davon aus, dass auf Grund des hohen osteoklastischen und osteoblastischen Zellumsatzes im Knochengewebe vermehrt Wachstumsfaktoren und Fragmente des EZM bereitgestellt sind, die eine Sekundärtumorausbildung positiv beeinflussen (119-121). Zusätzlich wird beim PCa diese Affinität zum Knochengewebe durch die dortig vorherrschende erhöhte Calciumkonzentration angefeuert (122). Weiterhin wird postuliert, dass eine bestimmte Oberflächenkonfiguration und proteolytische Faktoren der CTC die Penetration in bestimmte Gewebe vereinfachen (117, 118).

1.5.2.1. Lymphknotenmetastasen

Lymphknoten sind auf Grund ihrer Funktion im Immunsystem als initialer Präsentationsort suspekter Pathogene oft erste Anlaufstelle einer Metastasierung. Betroffene Lymphknoten befinden sich dabei meist im *Foramen obturatorium* und entlang der *Arteria iliaca interna, externa und communis* (123). Eine initiale isolierte nodale Metastasierung wird mit 1 bis 12 % in der Literatur sehr divergent angegeben. Dabei waren in einer großen Studie bei fortgeschrittenem PCa im Stadium 4 bei 2,8 % isoliert nur die Lymphknoten betroffen (124). Das solitär die Lymphknoten betreffende Metastasierungsmuster hatte dabei, sowohl auf das Gesamtüberleben (43 Monate), als auch auf das PCa-spezifische Überleben (61 Monate) die weitaus beste Prognose (115, 124). In 80,2 % der Fälle liegt meist eine Kombination aus Knochen- und Lymphknotenmetastasierung vor.

1.5.2.2. Knochenmetastasen

Das PCa ist nach dem Lungenkarzinom die häufigste Ursache für die Ausbildung eine Metastase im Skelettsystem. Bei ca. 65-75 % der fortgeschrittenen PCa ist diese vorzufinden, wobei die mediane Überlebenszeit nach Erstdiagnose einer Metastase mit 12 bis 53 Monaten stark variiert (121). Im Unterschied zu den meisten anderen malignen Tumoren, bildet das PCa überwiegend osteoblastische Metastasen aus. Zwar überwiegt hier die osteoblastische Aktivität, parallel laufen allerdings ebenso osteoklastische Prozesse ab (119, 121). Osteoblastische Filiae führen im Gegensatz zu osteoklastischen Läsionen zu einer erhöhten Knochendichte. Physiologischer Weise würden sich diese beiden Prozesse die Waage halten. Beim PCa kommt es zu einer Überstimulation der Osteoblasten, die auf Grund der Zunahme des Knochengewebes auch eine reaktive Hochregulation der osteoklastischen Aktivität nach sich zieht. Obwohl damit Knochenumsatz und Dichte des Knochengewebes steigen, resultiert ein Stabilitätsverlust mit Fraktur neigung des Knochens. Ursächlich hierfür ist, dass bei den Metastasen die stabilitätsgebenden Kollagenbündel nicht adäquat in dichten lamellaren Zellbündeln angeordnet werden, sondern diffus in lockeren Zellverbindungen miteinander verknüpft sind (119, 121). Die Hälfte aller mCRPC Patienten durchläuft dabei auf Grund der ossären Filiae mindestens einmalig ein sogenannten „*skeletal related*

event“ (SRE) (13). Diese SRE sind alle durch ossäre Filiae ausgelösten Komplikationen und bestehen beim PCa in erster Linie aus Knochenschmerzen (125) bzw. bei protrahiertem Verlauf aus Spinalkompression oder Frakturen.

1.5.2.3. Viszerale Metastasen

Viszerale Metastasen beim PCa sind zwar seltener, gehen allerdings mit einer wesentlichen höheren Mortalität einher (115). Ein Patient mit viszeraler Metastase und schlechtem Allgemeinzustand bei Diagnosestellung hat dabei ein medianes Überleben von 12 Monaten im Gegensatz zu einem medianen Überleben von 53 Monaten bei solitär ossärer Metastasierung und gutem Allgemeinzustand zu erwarten (121). Der Anteil an viszeralen Metastasen bei Diagnosestellung eines mCRPC liegt bei ca. 17 % (115), wovon 8 % auf Lungenmetastasen, 7 % auf Lebermetastasen und 1 % auf sonstige Metastasierungsregionen entfallen. Eine Lebermetastase geht dabei mit der schlechtesten Prognose (OS 12 Monate) und eine Lungenmetastase mit einer schlechten Prognose (OS 17 Monate) einher (115). Weiterhin konnte in einer radiologischen Studie mit PET-CT Kontrolle an CRPC Patienten aufgezeigt werden, dass der Anteil an viszeralen Metastasen mit der Dauer der Erkrankung konstant zunimmt. Während zu Beginn des CRPCs 14 % viszeral metastasiert waren, hatten im Verlauf fast 50 % drei Monate prä mortal viszerale Metastasen ausgebildet (114).

1.6. Bildgebende Verfahren und deren Einsatzzeitpunkt im Stadium des CRPC

Die Bildgebung ist elementarer Bestandteil des *Staging* und *Monitorings* von CRPC Patienten. Dabei liefert sie Informationen über die Metastasenverteilung, gibt Auskunft über die Prognose und lässt eine Beurteilung des Therapieansprechen oder -versagens zu (126). Bei allen Patienten sollte ein CT Thorax/Abdomen/Becken (\leq 5-mm axiale Schichten) mit Kontrastmittel erfolgen, alternativ kann bei Kontrastmittel-Intoleranz ein MRT erfolgen (126). Die bildmorphologische Lokalisation von Metastasen liefert zudem einen wichtigen Hinweis auf die erwartbare Prognose. So konnte Halabi *et al.* aufzeigen, dass eine reine nodale Metastasierung (OS 31,6 Monate) oder ossäre Metastasierung (OS 21,3 Monate) eine wesentlich günstigere

Prognose aufweisen als Lungen- (OS 19,4 Monate) und Lebermetastasen (OS 13,4 Monate) (127). Neben dem Spiral-CT und dem PET-CT steht zudem die Knochenszintigraphie zur Verfügung. Ein einheitliches evidenzbasiertes Vorgehen wie Patienten mit CRPC radiologisch geführt werden sollten, gibt es aktuell noch nicht (128). Während eine bildgebende Routinediagnostik bei stabilen Patienten mit CRPC noch vor wenigen Jahren nicht vorgeschlagen wurde, ist man heute der Auffassung in regelmäßigen Abständen eine bildgebende Re-Evaluation durchzuführen (129). Zusätzlich ist der Einsatz eines bildgebenden Verfahrens im Vorfeld jeder Initiierung neuer Therapien indiziert (128). Die Wahl des Verfahrens ist vom individuellen Krankheitsbild abhängig. Die Standardkombination zur Erfassung von Metastasen besteht aus CT und Knochenszintigraphie (129). Das CT spiegelt dabei die morphologische und das Knochenszintigramm die molekulare Ebene der Tumorlast wieder. Dabei ist anzumerken, dass das Szintigramm nicht die Tumorlast direkt, sondern nur eine erhöhte osteoblastische Aktivität anzeigt. Osteolytische und mikrometastatische Herde werden nicht detektiert, wobei entzündliche und degenerative Veränderungen zusätzlich den Tumornachweis verfälschen können (128). Für die Diagnostik von Weichteilen oder der Frage der Lokalinfiltration ist das MRT überlegen. Das PET-CT ist eine Fusion aus einer herkömmlichen CT und einer Positronenemissionstomographie bei der ein Radiopharmakon verabreicht wird. Das Radiopharmakon emittiert dabei Positronen, die nach Verschmelzung mit einem Elektron Vernichtungsstrahlung aussenden, welche mittels eines Detektorsystems erfasst werden kann (130). Karzinome unterliegen dabei auf Grund eines ineffizienten Metabolismus einem gesteigerten Glukosebedarf (131). Das Radiopharmakon reichert sich in diesen stoffwechselreichen Arealen vermehrt an. Nach Überlagerung mit der CT, welches die Morphologie der Organe und des Gewebes widerspiegelt, kann man etwaige pathologische Prozesse ableiten. Beim PCa wurde meist ein C-11-Cholin-PET/CT-Untersuchung verwendet. Eine Weiterentwicklung dieses Prinzips ist die Kopplung eines Positronenemitters, meist Gallium-68 (^{68}Ga), an ein Antigen das spezifisch mit Oberflächenmolekülen von Prostatazellen interagiert. Das sogenannte *prostataspezifische Membranantigen* (PMSA) ist dabei ein transmembranes Glykoprotein, welches überwiegend von Prostataepithelzellen exprimiert wird (132). Es entsteht der Tracer Ga-68 PSMA (*Gallium-68 Prostata-spezifische-Membranantigen*). Hiermit werden keine stoffwechselreichen Areale dargestellt, sondern primär Prostatazellen (132). Das Ga-

68 PSMA-PET/CT scheint den anderen Verfahren bezüglich Spezifität und Sensitivität, sowohl beim Nachweis viszeraler als auch bei ossären Metastasen überlegen zu sein (132). Zusätzlich ist die Konjugation eines Radionuklids zu PSMA möglich, was bereits ein therapeutischer Ansatz im fortgeschrittenem Stadium im Sinne der Theranostik ist (132, 133). Die Theranostik beschreibt dabei die zunehmende Interferenz zwischen Diagnostik und Therapie im Rahmen der personalisierten Medizin. Die ¹⁷⁷Lu-PSMA-Liganden-Therapie ist jedoch nach S3-Leitlinie Prostatakarzinom 2019 nur nach Ausschöpfen aller Therapieoptionen und nach Vorstellung in einem interdisziplinären Tumorboard empfohlen (134). Ein positiver Effekt der ¹⁷⁷Lu-PSMA-Liganden-Therapie beim mCRPC ist dabei vielfach beschrieben (135, 136), jedoch insbesondere im Hinblick auf den Überlebensvorteil noch nicht hinreichend gesichert (134). Die erste prospektive Phase II Studie von *Hofman et al.* konnte bei 30 CRPC Patienten eine PSA Reduktion von > 50 % in 57 % der Fälle, als auch eine medianes PFS von 7,6 und eine OS von 13,5 Monaten nachweisen. Zudem zeigte sich eine verbesserte Lebensqualität bei weitestgehend milden Nebenwirkungsprofil (v.a. Xerostomie, Fatigue, Thrombozytopenie) (137).

1.7. Therapie des hormonsensiblen Prostatakarzinoms (HSPCa)

Die medikamentöse Tumorthherapie bei fortgeschrittenen Tumoren beruht auf einer antiandrogenen Deprivationstherapie mit Restriktion des Testosteronhaushalts. Medikamente der Wahl sind LHRH-Agonisten oder LHRH-Antagonisten, die eine Progression um circa 36 Monate aufschieben (138). Bei primär metastasiertem PCa mit hoher Tumorlast wird nach positiven Resultaten in der CHAARTED und STAMPEDE Studie bei gutem Allgemeinzustand des Patienten eine initiale Chemotherapie mit Doce parallel zur antihormonellen Therapie empfohlen (129, 139, 140). Beruhend auf dieser Beobachtung konnte auch die Therapie mit Abi bei primär metastasiertem PCa ähnlich verbesserte Effekte erzielen (141, 142).

1.8. Therapie des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms (CRPC)

Patienten mit einem nicht-metastasiertem CRPC (nmCRPC) kann nach Versagen der ADT bei biochemischen Rezidiv ohne Nachweis von Metastasen seit Anfang

2019 Apalutamid oder Enza verschrieben werden (2, 143). Für Apalutamid wurde hier im Rahmen der SPARTAN Studie eine Verlängerung des medianen MFS von zwei Jahren (40,5 vs. 16,2 Monat) demonstriert (4).

Nach Diagnosestellung eines mCRPC stehen für die 1st-line Therapie folgende Medikamente zur Wahl: Abi, Caba, Doce, Enza. Welches der Medikamente verabreicht werden sollte, liegt einer individuellen Entscheidung basierend auf der Betrachtung der Komorbiditäten, des Tumorbefalls und des körperlichen Zustandes des Patienten zu Grunde. Die Anwendung von Radium-223 ist nur noch ab der 2nd-line optional einsetzbar (2). Obwohl nach den EAU-Guidelines die genannten Medikamente für die 1st-line Therapie gleichgestellt sind, hat sich doch ein gewisses Therapieschema etabliert. Eine Chemotherapie mit Doce 75 mg/m² alle 3 Wochen sollte bei symptomatischen Patienten in gutem Allgemeinzustand sowie Patienten mit viszeraler Metastasierung nahe gelegt werden (129). Weiterhin zeigen Studien, dass die Sequenz Abi vor Enza Vorteile bezogen auf das progressionsfreie Intervall, nicht aber auf das Gesamtüberleben gegenüber einer umgekehrten Therapieabfolge hat (144). Die Gabe von Caba konnte bei Therapieversagern eines Docetaxel-Schemas eine signifikant verbesserte Überlebensrate von 3 Monaten gegenüber einer Mitoxanton-Therapie ausweisen (11), weshalb Caba vor allem als potente Reservesubstanz bei Docetaxel-Resistenz in der 2nd- oder 3rd-line Therapie eingesetzt wird (129). Radium-223 ist eine Radionuklid-Therapie und wird vor allem bei multipel ossär metastasiertem CRPC angewandt. Es hat hier eine Verbesserung des Gesamtüberlebens nach Doce um 3,6 Monate aufzeigen können (13). Zudem sollte die konsequente Durchführung primären Androgendeprivation im Stadium des CRPCs mit LHRH-Agonisten oder LHRH-Antagonisten bis zum Tode des Patienten berücksichtigt werden (129, 145). Ein Therapiewechsel erfolgt, wenn 2 der folgenden 3 Kriterien erfüllt sind:

- konsekutive Anstiege des PSA
- radiologischer Progress erkennbar
- Zunahme klinischer Beschwerden mit AZ-Verschlechterung

1.8.1. Management von Patienten mit mCRPC

Patienten mit metastasiertem CRPC (mCRPC) sollten in einem multidisziplinärem Team behandelt werden (129). Vor Therapiebeginn sollte der Testosteronhaushalt kontrolliert und im Kastrationsbereich liegen (134). Eine routinemäßige Einbestellung der Patienten unter Evaluierung des PSA, klinischer Symptome und der Beschaffenheit des Skelettsystems sollte regelmäßig erfolgen. Bezüglich des Skelettsystems sollte vor allem auf Schmerzen, Instabilitäten mit Frakturneigungen und auf ein Prodrom einer Rückenmarkskompression geachtet werden (129). Die aktuellsten Empfehlungen geben zudem an, dass bereits mit Einleitung der ADT eine Knochendichtemessung durchgeführt werden sollte, um in Abhängigkeit hiervon eine osteoprotektive Therapie zu evaluieren (146). Im hormon-naiven Stadium ist dabei eine Therapie mit Bisphosphonaten nicht empfohlen (134). Eine Osteoprotektion im Rahmen des ossär metastasierten CRPC hingegen sollte mit Denosumab oder Bisphosphonaten durchgeführt werden, wobei keine Empfehlung zu eine der beiden Therapien durch die S3 Leitlinie Prostatakarzinom 2019 erfolgt ist (134). Supportiv sollten beide Wirkstoffe täglich mit oral mindestens 500 mg Calcium und 400 I.E. Vitamin D ergänzt werden (134). Vor Therapie sollte eine Überprüfung des Zahnstatus erfolgen, da Denosumab und Bisphosphonate Osteonekrosen insbesondere des Kiefers auslösen können (147-149). Neben der adäquaten Schmerztherapie bei Knochenmetastasen besteht zudem die Option eine perkutane Bestrahlung bei persistierenden Knochenschmerzen, drohender spinalen Kompression, nach operativer Stabilisierung oder bei erhöhtem Frakturrisiko durchzuführen (134). Eine Bildgebung bei metastasierten und nicht-metastasierten Patienten empfiehlt sich vor Therapiewechsel, bei klinischen Symptomen und sollte routinemäßig alle 6 Monate durchgeführt werden (128, 129).

1.8.2.1. Abirateron

Abi ist ein Androgenbiosynthese-Inhibitor der die Androgensynthese nicht nur im Hoden, sondern auch in der Nebenniere und im Tumorgewebe hemmt (150). Dabei wird das Enzym CYP17 oder präziser die 17 α -Hydroxylase, selektiv und irreversibel inhibiert (Abb.3). 17 α -Hydroxylase ist für die Konversion der aus dem Cholesterol stammenden Pregnenolone in 17 α -Hydroxy-Pregnenolone und Progesterone in 17 α -

Hydroxy-Progesterone verantwortlich (150). Beides sind Vorläuferstadien, die nach weiterer enzymatischer Überführung in Dehydroepiandrosteron und anschließend Androstendion, schlussendlich das Hormon Testosteron bilden (Abb. 3). Abi blockiert somit die Testosteronsynthese. Zudem wird parallel durch Inhibierung des Präkursorstadium 17-a-Hydroxy-Progesteron die Kortisolsynthese eingeschränkt. Eine reaktive Hochregulation des ACTH-Haushalts aus der Hypothalamus-Hypophysen-Achse kann dabei zu einem sekundären Mineralkortikoidexzess führen (150). Deshalb wird das Prodrug Abirateronacetat, der inaktive Metabolit, immer mit Prednisolon oder Prednison verabreicht. Die Gabe erfolgt täglich oral mit 1000mg Abi (4x250mg) plus 5mg Prednison (1x 5mg) (150, 151).

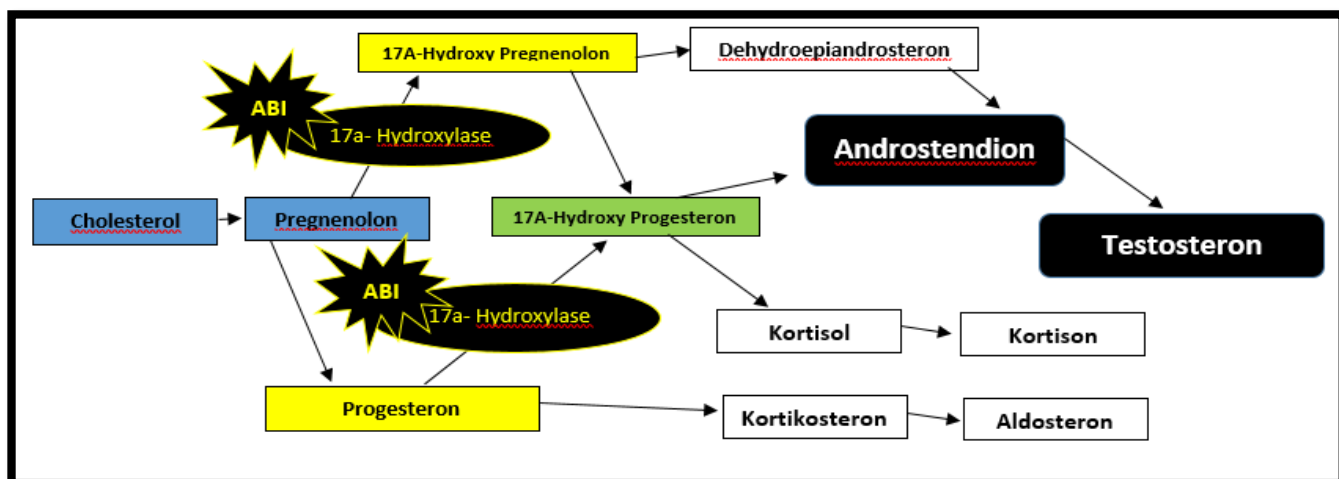


Abb.3 (modifiziert nach Mateo et al. (150): Blockade der 17 α -Hydroxylase durch Abi mit konsekutiver Kortison- und Testosteronsuppression.

Abi wird primär beim mCRPC eingesetzt. Hier konnte es als 1st-line Therapeutikum in der Zulassungsstudie (152) im Vergleich zur Placebogruppe ein verbessertes PFS (16,5 Monate vs. 8,3 Monate) aufzeigen. Das OS konnte dabei um 4,4 Monate verlängert werden. Zusätzlich konnte die Studie in allen sekundären klinischen Endpunkten, wie Schmerzsymptomatik und funktionaler Verschlechterung, einen Vorteil durch Abi darstellen (152). Diese positiven Erkenntnisse konnten anschließend in mehreren Studien verifiziert werden (6, 150, 153). Abi kann ebenso in der 2nd-line Therapie des CRPC angewendet werden und konnte hier nach Doce neben verbesserten PFS insbesondere eine Reduktion klinischer Symptome, wie

Fatigue und Knochenbeschwerden abbilden (10, 154). Der Anwendungsbereich für Abi ist neben dem Stadium des CRPC bereits um die Therapie des primär-metastasierten PCa erweitert worden (141, 142) und wird folglich bei hormonsensiblen Patienten in Kombination mit einer klassischen ADT angewendet. *Fizazi et al.* konnten dabei aufzeigen, dass sich durch diese Kombinationstherapie eine verbesserte Überlebensrate nach drei Jahren von 66 % im Gegensatz zu 49 % in der Placebogruppe erreichen und dass sich das PFS auf 30,0 Monate vs. 14,8 Monaten bei alleiniger ADT expandieren lässt (142). Die Nebenwirkungen durch Abi begründen sich in erster Linie auf der Manipulation des Kortisolstoffwechsels und entsprechen insbesondere der Hypokalämie (55 – 88 %), Hypertonie (17 – 40 %) und peripheren Ödemen (15-30 %) (150). Weiterhin wurde eine gewisse Hepatotoxizität mit konsekutivem Transaminasenanstieg beobachtet.

1.8.2.2. Enzalutamid

Enza wird der Klasse der Androgen-Signalweginhibitoren (ASRI) zugeordnet. Es wirkt zusätzlich zu der klassischen zytoplasmatischen Androgenrezeptorblockade, ähnlich der nicht-steroidalen Antiandrogene (bspw. Bicalutamid und Flutamid), zudem verstärkt auf die nukleare Translokation und die anschließende Modulation der Genexpression (150). Enza unterbindet dabei antagonistisch die Interaktion zwischen AR und Ligand im Zytoplasma (Abb.4). Der entstandene Enzalutamid-AR-Komplex verringert zudem die Translokation in den Nucleus und führt schlussendlich zu einer reduzierten Affinität des Androgenrezeptor-Liganden-Komplexes zur DNA der PCa-Zellen (150) (Abb.4). Die Expression notwendiger Proteine und die Rekrutierung weiterer Koaktivatoren werden dadurch inhibiert. Das Tumorstadium ist dementsprechend supprimiert und die PCa-Zellen induzieren vermehrt die Apoptose (155). Durch einen 16β - ^{18}F - 5α -DHT Ligandenbindungstest (156), bei welchem das Substrat DHT unter Zugabe ASRI um die AR konkurrieren, wurde die potente Blockade des AR durch Enza demonstriert. Die Affinität des Androgenrezeptor-Liganden-Komplexes ist dabei um das 8-fache höher als bei Bicalutamid (150) und nur um das 2 bis 3-fache niedriger, als die Affinität seines physiologischen Substrates DHT. Bicalutamid hat hier beispielsweise nur eine 30-fache niedrigere Affinität als DHT vorzuweisen (156).

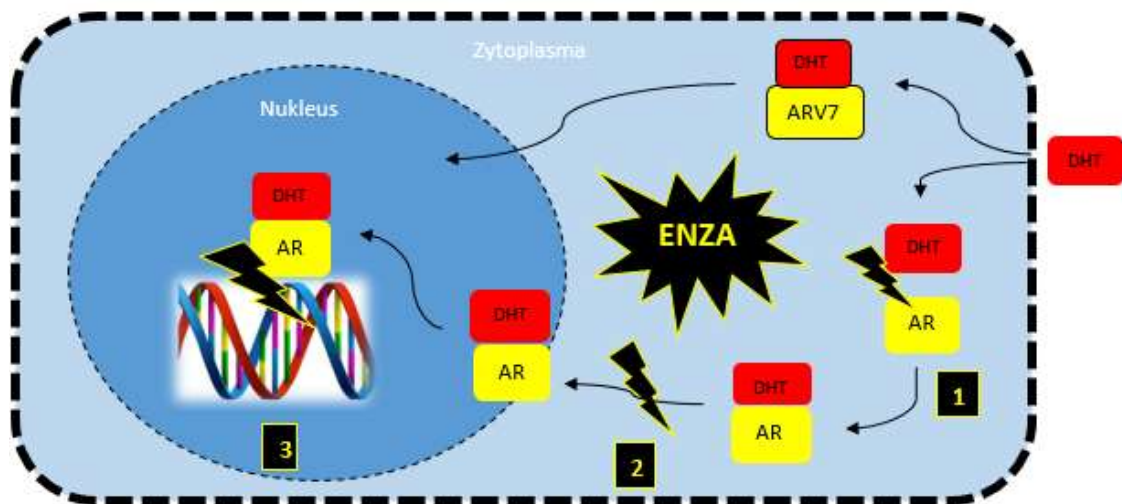


Abb. 4 (modifiziert nach Mateo et al. (150)): Wirkmechanismus von Enzalutamid (Enza) nach Kopplung mit Dihydrotestosteron (DHT). 1) Blockade von DHT auf zytoplasmatischer Ebene; 2) Blockade der nuklearen Translokation; 3) Nukleare Blockade der AR-DNA-Interaktion.

Weiterhin konnte in vitro an LnCAP-Zelllinien eine ausgeprägte Inhibition der Genexpression der Proteine PSA und der transmembranen Serinprotease 2 (TMPRSS2), als Zeichen einer starken nuklearen Aktivität durch Enza nachgewiesen werden (155). Die optimale Dosierung wird bei täglicher einmaliger oraler Gabe mit 160mg (4x40mg) angegeben (157). Beruhend auf den Daten der AFFIRM Studie wurde Enza 2013 für das CRPC zugelassen. Eine Therapie mit Enza im Anschluss auf eine Docetaxel-Therapie konnte dabei eine Überlebenszeitverlängerung von 4,8 Monate, sowie eine Reduktion der Schmerzen bei verbesserter Lebensqualität aufzeigen (7). Die PREVAIL Studie konnten daraufhin auch bei Chemotherapie-naiven Patienten ein prolongiertes Langzeitüberleben von 35,3 Monaten vs. 31,3 Monaten und ein um 14,6 Monate verbessertes rPFS darstellen (64). Weiterhin wurde ausgehend von der TERRAIN Studie bei asymptomatischen oder mild symptomatischen Patienten mit mCRPC ein Vorteil der Therapie mit Enza im Gegensatz zu Bicalutamid nachgewiesen (158). Aktuell laufen diverse Phase-II-Studien, die eine Anwendung von Enza in hormonnaiver, sowie neoadjuvanter Situation und in Kombination mit Abi oder Doce bei CRPC beleuchten werden. Nebenwirkungen einer Enza Therapie waren innerhalb der AFFIRM Studie Fatigue (7), Diarrhoe und Hitzewallungen und innerhalb der PREVAIL Studie (64, 159) Fatigue, Verstopfung, Athralgie und Hypertension. Weiterhin war bei ersterer eine um 0,6 % höhere Wahrscheinlichkeit für Schlaganfälle ersichtlich, die sich aber in der

PREVAIL Studie nicht signifikant bestätigt (7). Eine kardio- oder lebertoxische Wirkung scheint unter Enza nicht gegeben zu sein (7).

1.8.2.3. Chemotherapie

Für das Chemotherapeutikum Mitoxanton in Kombination mit Prednison wurde bereits Mitte der 90^{er} Jahre ein positiver Effekt in palliativer Situation, hier vor allem bzgl. Lebensqualität und Schmerzreduktion, beschrieben (160), ohne dabei Einfluss auf die Überlebenszeit zu nehmen (161). Dem gegenüber konnte dem Chemotherapeutikum Doce plus Prednison (75 mg/m² alle drei Wochen) zudem eine Lebenszeitverlängerung bei gleichzeitig besseren Resultaten bezüglich Schmerzkontrolle, Lebensqualität und PSA-Ansprechen verglichen mit Mitoxanton attestiert werden (8).

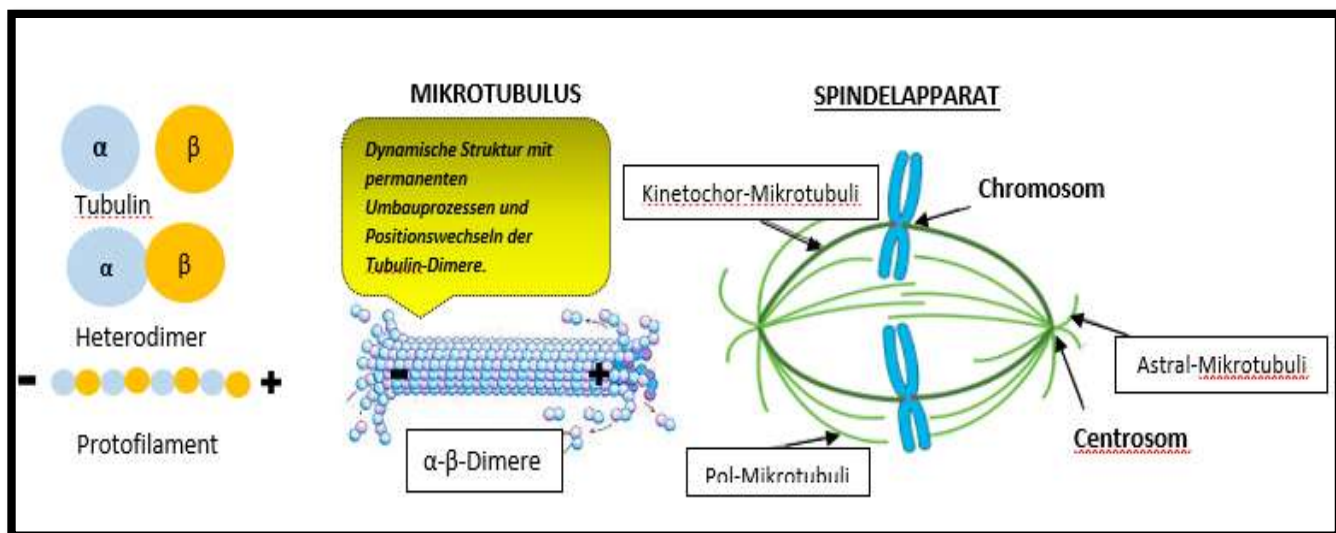


Abb.5: Molekulare Bestandteile des Spindelapparates und der schematische Ablauf der Mitose; Mikrotubuli besteht aus α -Tubulin und β -Tubulin. Diese setzen sich zu Heterodimeren zusammen und bilden hiernach nach Konjugation ein Protofilament. Mehrere Protofilamente bilden ein Mikrotubulus. Dieser ist eine dynamische Struktur der durch seinen molekularen Aufbau permanenten Umbauprozessen mit Positionswechseln der Tubulin Dimere unterworfen ist. Der Spindelapparat setzt sich aus den verschiedenen Mikrotubuli (Astral-, Pol-, Kinetochormikrotubuli) zusammen.

1.8.2.3.1. Docetaxel

Eine regelrechte Ausbildung und Anordnung der Mikrotubuli während der Mitose ist mitentscheidend für den Erfolg eines Zellzyklus (20). Die Mikrotubuli bestehen dabei aus einer Vielzahl an Tubulin-Dimeren mit je einem α - und einem β -Tubulin, die

mittels kovalenter Bindungen (162) verknüpft und in polymeren Filamenten angeordnet sind (20) (Abb.5). Die Mikrotubuli besitzen ein Plus-(+)- und ein Minus(-)-Ende, die ständigen dynamischen Veränderungen unterliegen (162). Das Plus-(+)-Ende ist davon mehr betroffen. Diese dynamischen Anpassungen beruhen zum einen auf einer dynamischen Instabilität und zum anderen auf dem sogenannten Tretmühlenmechanismus (engl. „Treadmilling“) (162). Die dynamische Instabilität besagt, dass es vor allem am Plus-(+)-Ende permanent zu Umbauprozessen entsprechend einer Verlängerungen oder Verkürzungen der Filamente unter Verlust bzw. Gewinn von Tubulin-Monomeren während der Mitose kommt (162). Das „Treadmilling“ beschreibt das Phänomen, dass die Tubulin-Dimere keiner starren Anordnung unterliegen, sondern dynamisch innerhalb der Filamente sich immer wieder neu anordnen und dabei verschiedene Positionen einnehmen können (162) (Abb.5). Diese dynamische Aktivität der Mikrotubuli ist verglichen mit der Interphase, während der Mitose um das 10 bis 100-fache heraufreguliert (162). Mit Initiierung des G2/M-Übergangs im Zellzyklus bilden sich die Mikrotubuli ausgehend von den beiden mitotischen Polen, den Centrosomen aus (20). Die beiden Centrosome bestimmen die zwischen ihnen liegende Ebene der Chromosome und die Mikrotubuli dienen dabei unter Ausbildung des Spindelapparates mit Pol-/Kinetochor- und Astral-Mikrotubuli der Zentrierung und der Stabilisation der Chromosome (20) (Abb.5).

Taxane können die Mikrotubuli reversibel binden und derart stabilisieren, dass ein Zellzyklusarrest eintritt und ein Proliferationsstopp erwirkt wird (162-164). So kommt es hier bei hohen intrazellulären Taxan-Dosen zu einer Stimulation der Polymerisation der Mikrotubuli mit erheblicher Anreicherung von Polymeren, die eine überschießende Stabilisation durch Mikrotubulibündel verursachen (162, 165). Diese massive Zunahme an Polymeren kann zusätzlich die Einleitung der Apoptose erwirken. Zudem konnte aufgezeigt werden, dass bereits niedrigere Dosen die oben beschriebenen dynamischen Veränderungen der Mikrotubuli unterdrücken und eine Inhibition der Zellproliferation erwirken (162).

In der TAX-327 Studie konnte Doce, als erstes Medikament eine Verbesserung des Langzeitüberlebens beim CRPC darstellen. Dabei lag das mediane Überleben mit Beginn der Therapie bei dreiwöchiger Gabe von Doce (75mg/m²) bei 18,9 Monaten, 17,4 Monate bei wöchentlicher Gabe von Doce (30mg/m²) und bei 16,5 Monaten in der Vergleichsgruppe mit Mitoxantron (8). Eine partielle PSA-Remission gelang unter

Doce bei 36 % bis 47 % aller Patienten mit CRPC, wohingegen bei Abi nur jeder vierte Patient dieses Sekundärziel erreichte (166). Der Anwendungsbereich von Doce ist basierend auf positiven Studienergebnissen das hormonnaive Stadium bei primär metastasiertem PCa erweitert worden. Sweeney *et al.* konnten hierbei eine Lebenszeitverlängerung von 13,6 Monaten (139) und die STAMPEDE Studie sogar von 22 Monaten (140) beim primär metastasiertem hormonsensiblen PCa publizieren. Da eine Chemotherapie unspezifisch insbesondere schnellteilende Zellen angreift, ist sie mit einer Vielzahl an Nebenwirkungen vergesellschaftet. Trotzdem sollte sie jedem Patienten mit mCRPC mit gutem Performance Status frühzeitig angeraten werden (129). Die häufigsten Nebenwirkungen in der TAX-327 Studie waren Fatigue (53%), Alopezie (65%), Neuropathie (30%) und Neutropenie (32%), wobei eine gefährliche febrile Neutropenie nur bei 3% der Patienten auftrat (8).

1.8.2.3.2. Cabazitaxel

Das ebenfalls zur taxanbasierten Chemotherapie zählende Caba wird allgemein hin als Derivat von Doce entsprechend eines Zweitgenerations-Taxans mit ähnlichem Wirkungsansatz beschrieben. Der o.g. Zellzyklusarrest ist auch hier wesentlicher Bestandteil des Wirkungsmechanismus (Abb.5). Ein übergeordnetes Problem im Rahmen des Wirkungsverlustes der Taxane spielt dabei die *Multidrug resistance* durch vermehrte Expression von "ATP binding cassettes" (ABC Proteine), welche den Efflux des Chemotherapeutikums aus dem Zytoplasma fördern und damit die induzierte toxische Wirkung abwenden. Taxane zielen dabei parallel auf diese Expression dieser ABC Protein ab, um dem o.g. Efflux vorzubeugen. Hier konnte aufgezeigt werden, dass Tumorzellen die mit Caba behandelt wurden, im Vergleich zu Doce eine 10-fach geringere Sensitivität zu u.a. ABCB1 (= auch MDR-1 oder P-Glycoprotein genannt) erwirken (167). Die intrazelluläre Konzentration scheint damit niedriger und der konsekutive Wirkungsverlust höher. Die Affinität zu diesem P-Glycoprotein ist damit unter Doce wesentlich höher als bei Caba, womit sich der Wirkungsmechanismus bei Caba in anderer Art und Weise widerspiegeln muss. Trotzdem konnte in in-vitro Modellen eine antitumoröse Aktivität bei resistenten Tumorzellen gegen Doce und Paclitaxel nachgewiesen werden (11). Die TROPIC Studie hat dabei die Therapien Mitoxantron vs. Caba nach Docetaxel-Applikation

gegenübergestellt und ein verbessertes OS (12,7 vs. 15,1) und PFS (1,4 vs. 2,8) durch Caba verifiziert (11, 168). Eingesetzt wird Caba klassischerweise als 2nd-line Chemotherapeutikum beim mCRPC nach Doce und ist hier das erste Chemotherapeutikum welches nach Therapieversagen von Doce das OS nachweislich verlängert hat. In der 1st-line Therapie bei Chemotherapie-naiven mCRPC Patienten konnte in der FIRSTANA Studie kein erhöhter Nutzen von Caba (20mg/m² und 25 mg/m²) gegenüber Doce (75mg/m²) aufgezeigt werden (12). Das OS betrug dabei in den Gruppen Caba (20mg/m²) 24,5 Monate, Caba (25mg/m²) 25,2 Monate und Doce (75mg/m²) 24,3 Monate. Ungewünschte Nebenwirkungen Grad ≥ 3 traten hier unter Caba (20mg/m²) in 41,2 %, Caba (25mg/m²) in 60,1 % und unter Doce in 46,0 % der Fälle auf (168). Unter Caba zeigt sich zudem im Nebenwirkungsprofil eine Häufung febriler Neutropenien, Diarrhoen und Hämaturien im Vergleich mit Doce. Patienten unter Doce litten hingegen häufiger an Ödemen, Alopezie, Nagelveränderungen und v.a. peripherer Neuropathie (168). Im Hinblick auf die lebensgefährliche febrile Neutropenie haben die Kollegen *Heidenreich et al.* ein erhöhtes Risiko für Patienten ≥ 75 Jahren insbesondere im ersten Zyklus unter Caba aufzeigen können. Hier sollte eine großzügige prophylaktische Gabe von G-CSF (Granulozyten-Stimulatoren) prinzipiell evaluiert werden (169). Das Entscheidungskriterium für die Auswahl des geeigneten Chemotherapeutikums und der korrekten Dosis sollte damit auf dem individuellen Patientenprofil im Abgleich mit den möglichen Nebenwirkungen basieren (12).

1.9. Molekularpathologische Ursachen für das CRPC

Eine entscheidende Frage warum es ab einem gewissen Zeitpunkt im Rahmen der Therapie unter ADT zu einem Therapieversagen und damit einem *Switch* von CSPC zu einem CRPC kommt, erklärt sich in den verschiedensten alternativen molekularenpathologischen Aktivierungsrouten von Prostatakarzinomzellen.

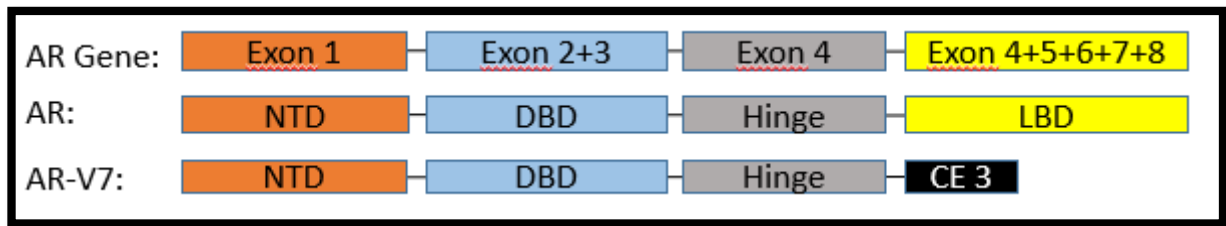


Abb. 6 (modifiziert nach Kochekpour et al. (70)): Schematische Darstellung des genetischen Aufbaues des AR, sowie die Diskrepanz im molekularen Aufbau zwischen dem AR und seiner Splicevariante AR-V7 mit trunkierter Ligand Binding-Domain; (CE 3 = cryptic exon 3).

1.9.1. Androgenrezeptor-Splicevariante AR-V7

Im Rahmen der Transkription werden DNA-Abschnitte synthetisiert und auf eine prä-mRNA kopiert. Diese wiederum enthält jedoch noch für die Biosynthese der Proteine an den Ribosomen mit folgender Entdifferenzierung einer Tertiärstruktur irrelevante Informationen, die sog. Exons. Beim Splicen werden diese Introns aus der prä-mRNA herausgeschnitten und die relevanten kopierten Codon-Sequenzen, die sog. Introns zur mRNA miteinander verknüpft. Im Rahmen der Translation an den Ribosomen entstehen schlussendlich die Proteinketten, die nach weiteren Konfigurationen den AR bildet (20). Anfang der 2000^{er} wurden erstmalig AR Aberrationen beschrieben (170). Das fehlerhafte Splicen des AR wurde dabei in einer der ersten Beschreibungen durch *Hu et al.* genauer identifiziert (19), wobei hier nicht nur eine Aberration im Sinne des AR-V7, sondern multiple Isoformen des AR Splicevarianten detektiert werden konnten (Abb.6). Jedoch war schon sich hier eine predominate Stellung des AR-V7 auf die Signaltransduktion (171, 172) erkennbar. Molekularpathologische wird folglich durch fehlerhaftes Splicen die C-terminale des AR, die der Liganden-bindenden Domäne entspricht, nicht vollständig ausgebildet, wobei die restlichen Komplexe des AR mit seinen transkriptionalen und DNA-bindenden Elementen regelrecht konfiguriert bleiben (Abb.6). Dieser Aberration verdankt der AR-V7 die Möglichkeit trotz der antiandrogenen Therapie auch weiterhin Einfluss auf die DNA-Synthese unter Aktivierung der Transkription Einfluss zu nehmen und den Metabolismus der Prostatakarzinomzelle aufrechtzuerhalten. Es wird dabei postuliert, dass die Expression von AR-V7 Rezeptoren bei fortgeschrittener PCa-Erkrankung bis um das 20-fache höher liegt und so die Entwicklung hin zu einem CRPC (173) stark begünstigt wird. Im Allgemeinen ist der

AR bei Prostatakarzinomzellen v.a. für die PSA Expression, den Lipidstoffwechsel und den Wachstum der Zelle verantwortlich (104).

1.9.2. Resistenzmechanismen beim CRPC

Beim PCa handelt es sich um eine sehr heterogene Tumorentität mit Ausbildung versatiler Resistenzmechanismen (3) (Abb.7). Neben dem AR-V7 sind mittlerweile eine Reihe von möglichen Resistenzmechanismen mit androgenabhängiger und -unabhängiger Prostatakarzinomzellaktivierung analysiert worden. Über den Beitrag der einzelnen Resistenzmechanismen am totalen Wirkverlust ist jedoch bisweilen nur wenig bekannt.

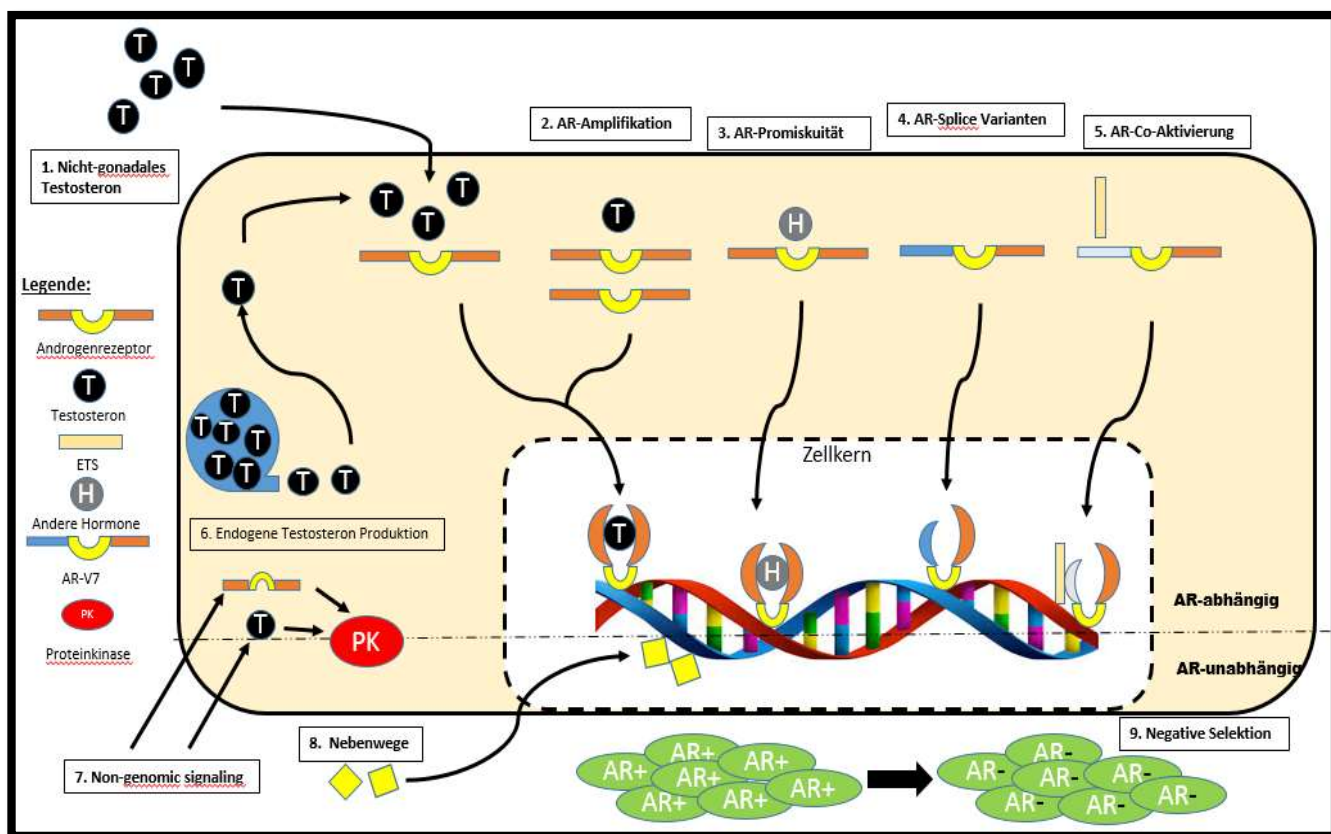


Abb. 7 (modifiziert nach Lamb et al. (174)): Schematische Darstellung der Resistenzmechanismen beim PCa auf zellulärer, nuklearer und androgenrezeptorunabhängiger Ebene. 1) nicht-testiculäre Testosteronproduktion, 2) AR-Amplifikation, 3) AR-Promiskuität, 4) AR-Varianten, 5) AR-Co-Aktivierung, 6) Endogene Testosteronproduktion, 7) Non-Genomic Rapid Signaling, 8) Nebenwege, 9) Negative Selektion.

Alternative nicht-testiculäre Testosteronproduktion (Pkt.1, Abb.7): Wie bereits erläutert ist trotz einer ADT der Nachweis von Testosteron/DHT im peripheren Blut

möglich und somit eine unterschwellige persistierende Hormonaktivierung von Prostatakarzinomzellen denkbar. Hierfür ursächlich könnte in erster Linie die Nebennierenrinde mit ihrer Testosteronproduktion in der Zona reticularis, welche auch bei Gesunden bis zu 5 % zum Testosteronhaushalt beiträgt, sein. Nachstehend kann auch der Beitrag über eine vermehrte Expression von Testosteron durch Adipozyten durch die selbige enzymatische Synthese aus Cholesterol via Cytochromen eine inkomplette Androgenblockade erklären (174).

AR-Amplifikation (Pkt.2, Abb.7): Ein auch bei Antibiotika-Resistenzen und oftmals im Rahmen der Onkogenese anderer Tumorentitäten nachgewiesener Resistenzmechanismus wird über die Amplifikation, sprich die Vermehrung von bestimmten DNA-Sequenzen, erwirkt. Dabei amplifizieren die Prostatakarzinomzellen unter dem Therapiedruck vermehrt Onkogene, hier insbesondere den AR, gegen welche sich die jeweilige Therapie richtet und erwirken somit ein Überangebot mit konsekutiven Missverhältnis von Wirkstoff und Angriffspunkt (174). Dabei konnte die Arbeitsgruppe um *Visakorpi et al.* bei ca. $\frac{1}{3}$ ihrer Patientenkohorte (n = 23) im hormonrefraktärem Stadium einen vielfach erhöhten amplifizierten Genlocus (Xq11-q13 Region) nachweisen, welcher mit einer Überexpression des AR einherging. Die Kollegen gehen davon aus, dass der Mechanismus der AR-Amplifikation v.a. bei geringen Androgenkonzentrationen ursächlich für ein Therapieversagen der ADT sein kann (175).

AR-Promiskuität (Pkt.3, Abb.7): Unter AR-Promiskuität versteht man die Abkehr vom spezifischen Aktivierungsweg des AR solitär durch Testosteron und Beginn einer unspezifischen Hormonmodulation des AR durch andere Steroide. Basierend auf vielfachen Mutationen des AR ist dieser somit unabhängig von Testosteron durch andere steroidale und nicht-steroidale Moleküle aktivierbar (174, 176). *Taplin et al.* konnten beispielsweise einer Reihe von Punktmutationen (u.a. auf Codon 874 bzw. 877) mit einhergehender mutierter AR-Expression dechiffrieren, welche ebenso durch Estrogen und Progesteron stimuliert werden konnten (3). Diese Annahme konnte explizit für die Mutation von H874 (Histidine 874) durch *Duff et al.* bestätigt werden. Hier zeigte sich einer Aktivierung des H874 mutierten Rezeptors im Vergleich mit dem Wildtyp-AR durch DHEA (Dehydroepiandrosteronacetat) um das 6,5-fache, durch Progesteron um das 9,8-fache und ebenso eine moderate Aktivierung durch Estradiol. Die Aktivierung des mutierten Rezeptors durch DHT (12-

fach) blieb dabei zwar die stärkste, jedoch ist die unspezifische steroidale Affinität und damit die Promiskuität des AR klar ablesbar (177).

AR-Varianten (Pkt.4, Abb.7): Neben dem bereits thematisierten (s.o.) AR-V7 sind eine Reihe anderer Splicevarianten bekannt, welche zu einem Wirkverlust der Antiandrogene beitragen. Das meist erforschte bleibt dabei der AR-V7 (171).

AR-Co-Aktivierung (Pkt.5, Abb.7): ETS („avian erythroblastosis virus E26 homologous transcription factor family“) sind supportive Moleküle die als Transkriptionsfaktoren die Transkription insbesondere von der DNA hin zur mRNA regulieren. Im Rahmen der Karzinogenese konnte beim PCa eine nicht-steroidale Aktivierung des AR durch diese ETS v.a. durch ETS1 demonstriert werden und somit ein persistierender endogener Einfluss des AR auf die Zelldifferenzierung, -proliferation und den Zellzyklus der Prostatakarzinomzellen aufrechterhalten werden (178).

Endogene Testosteronproduktion (Pkt.6, Abb.7): Prostatakarzinomzellen neigen insbesondere unter dem Druck einer ADT zur Ausbildung einer intratumoralen Produktion von Testosteron/DHT, wodurch eine autarke Hormonversorgung auf intrazellulärer Ebene der Prostatakarzinomzellen generiert wird (174).

Nebenwege (Pkt.8, Abb.7): Ein gänzlich androgenrezeptorunabhängiger und auch testosteronunabhängiger Nebensignaleffekt wird beim Vergleich der ebenso hormongetriebenen häufigsten Tumorerkrankung der Frau deutlich: dem Mammakarzinom. Eine Kreuzreaktion von Brustkrebszellen und Prostatakarzinomzellen durch die Androgenrezeptor-Testosteron-Kopplung respektive die Östrogenrezeptor-Östrogen-Kopplung wird schon lange vermutet (179). Eine strukturelle Ähnlichkeit beider Rezeptoren, als auch eine teilweise homolog ablaufende Biosynthese der jeweiligen Steroide sind dabei unlängst bekannt. Die Aktivierung der Prostatakarzinomzellen erfolgt dabei über den Östrogenrezeptor, hier v.a. die Subtypen ER α und ER β . Die Blockade dieser ER-Subtypen mit Tamoxifen und Raloxifen ist dabei ein Standardtherapiekonzept beim Mammakarzinom, wobei auch bei Prostatakarzinomzellen durch stromale ER α Prozesse ablaufen, die nachweislich zur malignen Entdifferenzierung beitragen können (179). Eine Vergleichsstudie zur Prävention von Prostatakarzinomerkrankung zwischen Toremifene, ein Derivat von Tamoxifen, und einer Placebogruppe die nach

Diagnose einer high grade prostatistischen intraepithelialen Neoplasie (PIN) oder negativer Biopsie ein Jahr lang therapiert wurden, demonstrierte eine signifikant erniedrigte (unter 20 mg Toremifene vs. Placebo: 24.4 % vs. 31.2 %) Rate an Prostatakarzinomdiagnosen in der Re-Biopsie in der Verumgruppe (180). Dahingehend ist davon auszugehen, dass diese Wechselbeziehung der alternativen Hormonaktivierung sowohl beim PCa, als auch beim Mammakarzinom ihren Beitrag zur Tumorprogression leistet (179).

Negative Selektion (Pkt.9, Abb.7): Dieser Resistenzmechanismus entsteht nach der teilweisen monatelangen ADT mit stetiger konsekutiver Umstrukturierung von Prostatakarzinomstammzellen von einer AR-tragenden Population hin zu einer AR-negativen Prostatakarzinomzellpopulation. Vereinfacht dargestellt wird durch die Therapie ein Selektionsdruck auf die Prostatakarzinomzellen derart aufgebaut, dass nur noch resistente Prostatakarzinomzellen zurückbleiben. Durch die sodann fehlende AR-Expression kann der Wirkverlust der ADT hinreichend erklärt werden (181).

1.9.3. Rezeptorunabhängige Stimulation - Das „Non-Genomic Rapid Signaling“

„*Non-Genomic Rapidly Signaling*“ (182) beschreibt die Fähigkeit von Steroiden und deren Rezeptoren schnell Einfluss sowohl auf zytoplasmatische Signalwege, als auch auf nukleare Transaktivierung zu nehmen, ohne dabei selbst die Zellkernmembranen passieren zu müssen (Abb.7). Weiterhin ist damit die Aktivierungsebene nicht nur auf die klassische Kopplung von AR und Steroid beschränkt, sondern beide nehmen autark voneinander an zellulären Prozessen teil. Dies wiederum erschwert die Antiandrogentherapie, da der Metabolismus der PCa-Zellen durch das „Non-Genomic Rapid Signaling“ para-adrenerg und ohne Stimulus des AR aufrechterhalten werden kann. AR und dessen Liganden sind somit in der Lage zusätzlich zu den oben beschriebenen nuklear ablaufenden Prozessen mit klassischer Bindung zur DNA, bereits im Zytoplasma als potenter Initiator bzw. Effektor von Signalwegen zu agieren. Insbesondere der Stimulation der zellulären Transduktion unter Aktivierung von Proteinkinasen durch den AR (183-187) und durch Androgene (188-190) kommt hierbei eine übergeordnete Rolle zu. Die genauen Effekte dieser nicht-genomischen Signalwege auf eine PCa Zelle sind

allerdings bis dato noch unzureichend verstanden, werden aber im Zusammenhang mit einer verstärkten Therapieresistenz und schlussendlich mit einem Tumorprogress gesehen (191).

1.10. Zielsetzung

Unser Ziel war es den Biomarker AR-V7 anhand einer Serie von CRPC-Patienten zu validieren. Hierfür detektierten wir zirkulierende Tumorzellen (CTC) aus Vollblut und charakterisierten diese durch immunhistochemischen Nachweis der AR-V7. Nach Detektion der CTCs und Interpretation des AR-V7 Status (pos. oder neg.) erfolgte die statistische Korrelation der experimentell gewonnenen Daten mit den individuellen klinischen, radiologischen und biochemischen Patientendaten, um abschließend eine Aussage über den Biomarker AR-V7 in CTCs als möglicher Prognosefaktor vor antiandrogener oder chemotherapeutischer Therapie treffen zu können.

2. Literaturdiskussion

2.1. Biomarker beim Prostatakarzinom

Biomarker sind messbare und objektivierbare Merkmale die auf pathologische oder physiologische Prozesse hinweisen können (22). Damit sollen sie eine Interpretation bzgl. Diagnose, Prognose oder Prädiktion zu lassen. Im Rahmen der translationalen Forschung und der zunehmenden individualisierten Medizin nehmen sie einen hohen Stellenwert ein. Biomarker können dabei sehr unterschiedliche Ursprünge haben. Sie können aus Patientenproben (Gewebe, Urin, Blut, etc.), radiologischen oder genetischen Merkmalen oder sogar aus mehreren Faktoren zusammen (bspw. Scores) generiert werden. Am elegantesten ist dabei die „Liquid Biopsy“, entsprechend einer Blut- oder Urinprobe die ohne große Nebenwirkung entnommen werden kann und dennoch Aufschluss über Diagnose, Prognose oder Prädiktion zulässt. Zur Detektion und Prognosebeurteilung eines PCa sind mittlerweile eine Reihe neuer Biomarker erforscht worden. Die meisten derer sind noch in der Erprobungsphase, wobei bspw. der Biomarker „Decipher GC“ (Tab.1) bereits als prognostischer Marker nach rPx zur Abwägung des Metastasierungsrisikos (192) und der „ExoDx Prostate IntelliScore“ (Tab.1) zur Vermeidung unnötiger Nadelbiopsien

Einzug in die NCCN Guidelines gefunden haben (192). Neben dem klassischen PSA Monitoring stehen weiterhin beim nicht disseminierten PCa folgenden Ansätze zur Verfügung (Tab.1):

Tab. 1. Biomarker beim hormonsensiblen Prostatakarzinom: modifiziert nach Hatakayama et al. (193) und Press et al. (192)

Probe	Biomarker	Methodik	Resultate
Blut	4 K Score	Muster aus Kallikreinen + klinischen Daten	Detektion von Gleason >7 und high risk PCa verbessert
	PHI	Formel aus PSA, proPSA, fPSA	Verbesserung der Detektion von high risk PCa vor Biopsie bei PSA 4-10ng/ml
	S2,3PSA	Anomale Glycosylation des Serum PSA als Hinweis für PCa	Optimierung der PSA-Beurteilung zur Vermeidung von Prostatabiopsien
Urin/Blut	TMPRSS2-ERG	Detektion von Fusionsgenen ERG + transmembrane Proteasen, Serin 2	Bei klinisch signifikanten PCa sind erhöhte Spiegel messbar
Urin	PCA3	Überexpression von non-coding mRNA	Reduktion der Re-Biopsien bei negativer Erstbiopsie
	ExoDx Prostate IntelliScore	Analyse von exosomaler RNA von 3 Biomarkern (PCA3, TMPRSS2:ERG, SDPEF)	Auskunft über Tumoraggressivität zur Vermeidung unnötiger Nadelbiopsien
Gewebe	Oncotyp DX test	Genetische Testung von 12 kanzerogenen Genloci und Erstellung eines „genomic prostate score“ (GPS)	Verbesserung der Detektion von high risk PCa nach Nadelbiopsie
	Decipher GC (genomic classifier)	Detektion von 22 RNA Genen nach radikaler Prostatektomie	Risikoeinschätzung einer Metastasierung nach radikaler Prostatektomie

2.1.1. Aktuelle Biomarker im Stadium des CRPC

Beim fortgeschrittenen PCa sind ebenfalls neue Biomarker basierend im Zuge der translationalen Medizin für den klinischen Alltag erforscht. Das Problem bei disseminierten Erkrankungen beruht darin, dass die Gewebeprobe die initial zur PCa Diagnose herangezogen wurde die aktuelle Tumorausprägung nicht korrekt

wiederspiegelt. Durch molekulare Veränderungen während der Krankheitsprogression und durch Ausbildung therapiebedingter Resistenzmechanismen entstehen hier neue Tumorausprägungen.

Die Entnahme von Biopsien aus Metastasen ist kein Standardverfahren beim fortgeschrittenen PCa, da es oft komplikationsträchtig und schwer durchführbar ist. Darüber hinaus liefert eine isolierte Biopsie einer einzelnen Metastase auf Grund der Heterogenität des PCa ebenfalls nicht immer generalisierbare Informationen.

Mateo et al. konnten hierbei zeigen (Tab.2), dass im Rahmen einer prätherapeutischen Gen-Sequenzanalyse sich Mutation (*BRCA1/2-* u. *ATM*) bestimmen lassen, die ein Hinweis auf ein gutes Ansprechen mit Verbesserung des OS durch den PARP-Inhibitor Olaparib prognostizieren. Basierend auf diesen Ergebnissen ist Olaparib (194) bereits durch die FDA bei Patienten mit Nachweis der *BRCA1/2-* oder *ATM*-Mutation nach taxanbasierter Chemotherapie und nach Enza oder Abi zugelassen.

Eine weitere kanzerogene genetische Aberration ist ein Defekt der Phosphatase PTEN, einem Tumorsuppressor, der zu einer Überaktivierung des PI3K/Akt-Aktivierungsweges führt (Tab.2). Diese PTEN-Mutation ist bei 40 - 50 % der mCRPC nachweisbar (23). Die Kollegen um *Rescigno et al.* (195) haben hier in einem immunhistochemischen Verfahren mit Nachweis der PTEN-Expression aus Prostatagewebe Hinweise finden können, dass Patienten mit Verlust des Tumorsuppressors PTEN mehr von einer Chemotherapie profitieren.

Die Expression von *TMPRSS2-ERG* ist weiterhin mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium assoziiert (Tab.2). So weisen hier ebenfalls 40 – 50 % der Patienten (23) mit mCRPC diese genetische Fusions-Mutation auf, wobei die Detektion von *TMPRSS2-ERG* aus Serumproben mit einem schlechteren Ansprechen auf Doce korreliert (196).

CTCs werden bei verschiedensten Tumorentitäten seit einigen Jahren als verheißungsvoller Ansatz eines neuartigen Biomarkers gehandelt (Tab.2). Dabei wird postuliert, dass beim PCa die Anzahl detektierbarer CTCs Auskunft über die Aggressivität und die Tumormasse beim CRPC (25, 197, 198) liefert und folglich mit einer schlechteren Prognose einhergeht. Exakte Kennzahlen hierfür sind jedoch noch nicht festgesetzt, was vor allem an den sehr unterschiedlichen CTC

Detektionsraten der jeweilig angewandten Verfahren liegt. Allgemein beschreibt man eine Detektionsrate (mit CellSearch^R System aus 7,5ml Vollblut) von <5 CTC als günstigen und >5 CTC als ungünstigen Faktor (25, 199). *De Bono et al.* konnten dabei bei CRPC Patienten aufzeigen, dass eine Detektionsrate von >5 CTC vor und nach neuer Therapie mit schlechterer Überlebensrate einhergeht. Gleichzeitig verbesserte sich die Prognose, wenn eine Konversion von >5 CTC vor Therapie zu <5 CTC nach Therapie stattgefunden hat (25). Weiterhin sieht man in den CTCs einen minimal invasiven Zugang im Sinne einer „Liquid Biopsy“ auf dem Weg zu einer individualisierten Tumorthherapie von PCa Patienten (25, 198, 200).

Bei der Verwendung des „*Next Generations Sequencing*“ mit Quantifizierung bestimmter genetischer Aberrationen aus dem Blutplasma zeigt sich das v.a. bei fortgeschrittenen Tumorerkrankungen und hier bei 95 % der Patienten mit mCRPC die ctDNA detektierbar ist (Tab.2) (23). Im Rahmen der 1st-line Therapie konnten hier die Kollegen *Conteduca et al.* nach Bestimmung der *AR copy numbers* aus dem Plasma mittels ddPCR belegen, dass Patienten bei einem erhöhtem Plasma Nachweis von *AR copy numbers* eher von einer Chemotherapie mit Doce und Patienten mit normwertigen *AR copy number* eher von einer Therapie mit Abi oder Enza profitieren (201).

Ein radiologischer Ansatz das Ansprechen oder die Progression unter Therapie mit Antiandrogenen zu beurteilen ist die PSMA-gestützte Bildgebung (Tab.2). Hier konnte paradoxerweise nachgewiesen werden, dass durch die Applikation von Antiandrogenen die PSMA-Expression der Prostatakarzinomzellen insbesondere beim CRPC hochreguliert wird. Die Kollegen *Evans et al.* konnten aufzeigen, dass diese Expressionsänderung mit Anstieg der PSMA-Expression nach Applikation von Enza quantitativ mittels PSMA-PET messbar ist und somit Auskunft über ein Therapieansprechen geben könnte (202). Dabei zeigte die Studie von *Emmett et al.* (24) bei ausschließlich mCRPC Patienten einen Anstieg der Intensität im 68Ga-PSMA PET bereits 9 Tage nach Beginn der neuen Therapie. Ausgehend von diesen Erkenntnissen wird postuliert, dass relative Änderung der durch Bildgebung messbaren PSMA Expression zukünftig als Biomarker bei CRPC Patienten fungieren könnten. Die Vorteile wären dabei die nicht-invasive Technik und die frühe Effektivitätskontrolle der neuen Therapie (23, 24, 26). Allerdings sind hier noch keine

genormten radiographischen Richtwerte festgesetzt, wie es beispielsweise bei der RECIST Klassifikation der Fall ist (26).

Tab.2: Experimentelle Biomarker im Stadium des CRPC

Probe	Biomarker	Methodik	Resultate	Studie
Blut	AR-V7	Immunhistochemie, ddPCR	Detektion von AR-V7 korreliert mit Resistenz gegenüber Enza/Abi	(15, 18)
	Zirkulierende Tumorzellen = CTC	CTC-Auszählung	-Anzahl von <5 CTC günstiger >5 CTC - Prognoseverbesserung bei Konversion unter Therapie zu <5 CTC	(25)
	TMPRSS2-ERG	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	Detektion von TMPRSS2-ERG prädiktiv für schlechteres Ansprechen von Doce	(196)
	Plasma Androgenrezeptor (AR) = AR-copy number (CN)	ddPCR aus Plasma	Bei normwertigen AR-Plasma sollen Patienten in der 1 st -line Abi oder Enza bzw. -Patienten mit Detektion einer AR-Zunahme profitieren mehr von Doce	(201)
Gewebe	Mutation mit PTEN loss	Immunhistochemischer Nachweis PTEN-Expression	Ansprechen auf Doce besser als auf Abi/Enza bei Nachweis PTEN loss	(195)
	Defekte DNA Reparaturgene - Mutation BRCA1/2- und ATM	Next Generation sequencing (NGS) von Tumorgewebe	Verbessertes OS unter PARP-Inhibitor Olaparib bei Patienten mit BRCA1/2- oder ATM-Mutation	(194)
Radiologie	68Ga-PSMA PET	PSMA PET/CT	Nicht-invasive quantitative Messung der PSMA Expression mit Auskunft über AR Aktivität nach Applikation von Androgen-Signalweg-Inhibitoren	(26, 202)

2.1.2. Aktueller Stand der translationalen Forschung im Bereich des AR-V7

Ein Werkzeug einen patientenindividualisierten Therapie-Algorithmus festzulegen könnte der Biomarker AR-V7 in CTCs darstellen.

Antonarakis et al. waren eine der ersten Arbeitsgruppen, die einen Zusammenhang zwischen dem Nachweis von AR-V7 und einer Resistenz gegenüber Abi und Enza darlegten (16). Dabei detektierten sie AR-V7 in mRNA Transkripten aus EpCAM-positiven CTCs bei progredientem mCRPC (18). Weiterhin konnte diese

Arbeitsgruppe demonstrieren, dass der Nachweis von AR-V7 mRNA in CTCs keine Vorhersagekraft auf eine taxanbasierte Therapie hat (21), wobei neuere Daten ebenfalls einen negativen Einfluss der AR-V7-Positivität auf eine taxanbasierter Therapie belegen (17). Hypothetisch war somit ein Werkzeug geschaffen worden, womit eine mögliche Therapie-Sequenz vorgegeben werden konnte.

Die Kollegen *Scher et al.* griffen diese Thesen auf, wählten jedoch einen immunhistochemischen Ansatz und wendeten diesen bei einer Gesamtkohorte von 161 Männern über eine Beobachtungszeitraum von 3 Jahren an (15). Sie isolierten hier CTCs mittels non-EpCAM-basierter CTC Detektion und führten eine Immunofluoreszenz-Analyse zum Nachweis kernlokalisierter AR-V7 durch (15). Dabei konnten die Kollegen die These von *Antonarakis et al.* bestätigen, dass Patienten mit Nachweis vom AR-V7 positiven CTCs von einer taxanbasierten Therapie wesentlich mehr profitierten als von einer Therapie mit ARS (15, 21). Hierbei dokumentierten sie eine Verbesserung der OS bei AR-V7-positiven Patienten von 8,9 vs. 4,6 Monate (15). So wurde bei Nachweis einer AR-V7 Positivität in CTCs die Applikation einer taxanbasierte Therapie vor Abi oder Enza suggeriert. Eine deutsche Arbeitsgruppe um *Steinestel et al.* validierten diese Aussage unter paralleler Evaluation von AR-Punktmutationen (198). Die Isolation der mRNA von CTCs aus 7,5 ml EDTA Blut von mCRPC Patienten wurde hier mittels „*AdnaTest ProstateCancerSelect Kit*“ (AdnaTest Langenhagen, Germany) durchgeführt (198). Der AR-V7 Nachweis aus der mRNA erfolgte mittels quantitativer real-time PCR. Vergleichbar zu den Kollegen *Antonarakis et al.* (16) konnten *Steinestel et al.* eine AR-V7 Positivität in 49 % der CTCs darlegen (198). Mit Anzahl der Vortherapie registrierten sie einen konsekutiven Anstieg der AR-V7-Positivität (198): nach ADT (28,6 %), ADT + Doce (66,7 %), ADT + Abi/Enza (80 %), ADT + Abi/Enza + Doce (80 %). Hier postulierten die Kollegen, dass die Differenzierung zur Splicevariante AR-V7 v.a. durch die antitumoröse Therapie vorangetrieben wird (198). Weiterhin beobachteten sie, dass 93 % der AR-V7 positiven Patienten kein PSA Ansprechen zeigten, was wiederum die sequentielle Therapie mit Abi nach Enza oder Enza nach Abi weiter in Frage stellte. Die Kollegen führen jedoch an, dass im Gegensatz zu der o.g. Publikation von *Scher et al.* (15) teilweise ein Progress unter taxanbasierter Therapie auch bei AR-V7-positiven Patienten beobachtet wurde, als auch ein Therapieansprechen bei AR-V7-positiven Patienten unter Abi (198).

Anfang 2019 veröffentlichten *Tagawa et al.* Daten die eine AR-V7 Positivität im Rahmen einer taxanbasierten Therapie an Hand einer Kohorte von 54 Patienten beurteilte (17). Dabei konnte auch hier entsprechend der Vermutung von *Steinestel et al.* (198) und entgegen der initialen Annahmen von *Antonarakis et al.* (21) und *Scher et al.* (15) gezeigt werden, dass eine AR-V7 Positivität durchaus eine Vorhersagekraft mit negativem Effekt auf eine Therapie mit Caba oder Doce hat (17).

Neben dem methodischen Ansatz aus CTCs eine AR-V7 Positivität abzuleiten gibt es bereits mehrere Ansätze dies direkt aus Serum zu detektieren. Dies hat den Vorteil, dass neben dem entfallen der CTC-Isolationsschritte und der kostengünstigen Aufarbeitung die Serumproben eine weitaus höhere Stabilität aufweisen und somit mehr Zeit zu Verfügung steht die Proben zu analysieren (14). *Bernemann et al.* wies hier allerdings auf die widersprüchlichen Erkenntnisse mehrerer Studien hin (203). So zeigten sich beispielsweise bei *Liu et al.* im Rahmen der methodischen Differenzierung ein nicht hinreichend erklärbarer AR-V7 Nachweis in CD45+ Zellen, welche eigentlich AR-V7-negativ hätten sein müssen (204). Weiterhin verweist *Bernemann et al.* (203) auf die Ergebnisse der Kollegen *Todenhofer et al.* die ebenfalls aus Vollblut, hier mittels PCR nach RNA-Extraktion, sowohl bei PCa-Patienten, als auch bei der PCa-negativen Kontrollgruppe eine AR-V7 Positivität nachwies (205). Interessanterweise waren hier zudem die parallel detektierten PCa-assoziierten Gene (*KLK*; *TMPRSS2/ERG*) nur unter den PCa-Patienten nachweislich, was den Verdacht der unspezifischen Detektion weiter bestärkt. In Bezugnahme vor allem auf die teils unspezifische AR-V7 Positivität, die u.a. auch im peritumoralen Gewebe oder in der benignen Prostata-drüse ableitbar ist (203), ist davon auszugehen, dass sich eine AR-V7 Positivität unter den bis dato durchgeführten Ansätzen im Vollblut leider nicht nur von den CTCs ableitet. Die Kollegen *Bernemann et al.* befürworten somit die Beurteilung des AR-V7 im Rahmen einer „Liquid Biopsy“ aktuell an Hand CTCs durchzuführen (203). *Pantel et al.* etablierten und veröffentlichten im *Cells* im August 2019 ein Detektionsverfahren, wo die Expression des AR-V7 in der mRNA aus CTCs repräsentativ isoliert werden konnte (14). Sie postulierten, dass der durch sie *de novo* etablierte Ansatz eine Vergleichbarkeit zukünftiger prospektiver Studien hinsichtlich des prädiktiven Wertes von AR-V7 erlauben würde. Die Isolation von epithelialen CTCs wurde hierbei mittels CellSearch® System, gefolgt von einer RNA Isolation und cDNA-Synthese und der

AR-V7-Detektion mittels einer qPCR-basierten Analyse durchgeführt (14). An Hand von mehreren AR-V7-positiven und -negativen Zellreihen und PCa-negativer Patientenproben konnten die Kollegen eine spezifische AR-V7-Detektion nachweisen (14). Hier zeigten sich eine AR-V7 Positivität nur bei PCa-Patienten und in AR-V7-positiven Zellreihen (14). Der Vorteil des durch *Pantel et al.* standardisierten Verfahrens beruhe neben der hohen Sensitivität und Spezifität, im langen Bearbeitungsfenster (24 h) und der verhältnismäßig simplen Durchführung (14). Eine Validierung dieser Studie liegt jedoch aktuell noch nicht vor.

Die Bedeutung des Biomarkers AR-V7 bleibt damit trotz vieler Hinweise auf seinen prädiktiven Wert beim mCRPC weiterhin unklar. Ebenso gibt es aktuell noch kein standardisiertes Protokoll zur Detektion des AR-V7 aus CTCs oder Vollblut.

2.2. Sequenzielle Therapie im Stadium des CRPC

Welcher Patient von welcher Medikation beim mCRPC voraussichtlich am meisten profitiert ist weiterhin unklar. Zwar konnte an Hand prospektiver Studiendaten ein gewisser Medikations-Algorithmus festgelegt werden (2), der jedoch mögliche individuelle Resistenzmechanismen der Patienten nicht berücksichtigt. So zeigt sich beispielsweise bei circa 20 % der Patienten bereits in der 1st-line Therapie eine primäre Resistenz (206) gegenüber Enza. Darüber hinaus ist eine potenzielle Kreuzreaktion zwischen Abi und Enza beschrieben, welche eine mögliche sequenzielle Abfolge beider Therapieregime zur Diskussion oder vielmehr sogar in Frage stellt (207). Aktuell liegen hier sowohl in der 1st-line, als auch in der 2nd-line Therapie prospektive Hinweise bei Chemotherapie-naiven und nach Docetaxel-Therapie vor, die bzgl. des PSA-Ansprechens, des PFS und der Verträglichkeit ein Vorteil für den Beginn der Therapie mit Abi vor Enza implizieren (208, 209). Ergänzend konnte belegt werden, dass das klinische Ansprechen der Patienten bei einer Abfolge zweier antihormoneller Therapien nacheinander im Vergleich zu einer Abfolge mit einem Chemotherapeutikum schwächer ist (144). Hier konnte gezeigt werden, dass die 2nd-line Gabe von Enza nach Abi bzgl. einer PSA-Remission der 2nd-line Gabe mit Doce unterlegen ist. Bei 2nd-line Gabe Enza war nur in 11 – 34 % ein PSA-Ansprechen ersichtlich (210, 211), während Doce ein PSA-Abfall bei 50 % beim mCRPC verbuchte (166). Zu Berücksichtigen ist hier, dass Taxane weitaus

toxischer einzustufen sind als Antiandrogen und damit Patienten mit schlechtem Allgemeinzustand nicht bedingungslos empfohlen werden können (8). Die Daten der CARD Studie zeigen zudem, dass Patienten die bereits Docetaxel- und ein ASRI-Regime (Abi oder Enza) erhalten haben von einer 3rd-line Therapie mit Cabazitaxel anstatt einer erneuten ASRI-Gabe profitieren (212). Dabei zeigten sich Vorteile für Cabazitaxel hinsichtlich des rPFS (8,0 Monate vs. 3,7 Monate), des PSA-Ansprechens (35,7 % vs. 13,5 %) und des medianen PFS (4,4 Monate vs. 2,7 Monate) (212). Insgesamt ergeben sich somit Hinweise die eine alternierende Therapieabfolge zwischen taxanbasierten und antiandrogenen Regimen mit günstigeren Effekten auf die Tumorkontrolle befürworten (210-213).

3. Material und Methodik

3.1. Material und Reagenzien

3.1.1. Verbrauchsmaterialien

Blutentnahmesystem Safety-Multifly	Sarsted
Einwegschutzhandschuh Supreno (Powder Free Nitril Exam Gloves)	Microflex, Österreich
Einwegschutzhandschuh Sempercare Nitril (Latex-frei und puderfrei)	Sempermed
FLEX IHC Microscope Slides (75 mm x 25 mm x 1 mm, beschichtet)	(Produktnummer: K802021-2) Dako, Carpinteria, USA
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
OncoQuick-Röhrchen, 50 ML, PP, 30/115 MM	(Artikelnummer: 227250) Greiner BioOne, Frickenhausen
Papiertücher	Lucart Group
Pipettenspitzen mit/ohne Filter (0,5-10 µl, 1-200 µl, 101-1000 µl)	Starlab, Ahrensburg
Pipetten (serologisch) 5 ml, 10 ml	Greiner BioOne, Frickenhausen
PP (Polypropylen)-Röhrchen 15 ml, 50 ml	VWR, Neuenkirchen
Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml Cups)	Eppendorf, Hamburg
S-Monovette 2.7ml K3 EDTA	Bestellnummer: 05.1167.001 (Sarstedt)
S-Monovette 10ml 9NC Citrat	Bestellnummer: 02.1067.001 (Sarstedt)
Universal-Alufolie u. Filterpapier	Biorad, München
Untersuchungshandschuhe Maimed sensitiv PF	Maimad, Neuenkirchen
Zellkulturflasche 25 cm ² , 75 cm ² , 150 cm ²	Greiner BioOne, Frickenhausen
Zellkulturschale steril	Greiner BioOne, Frickenhausen

3.1.2. Gebrauchsmaterialien

Glasküvetten	Glaswerk Weinheim
Halterung für Objektträger	Diapath, München
Neubauer-Kammer	Merck, Darmstadt
Objektträgermappen	
Pipetten research Eppendorf (0,5-10 µl, 1-100 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Accu-Jet Pro	Brand, Wertheim
Pinzetten (flache, glatte Spitze)	Labotec, Wiesbaden
Reaktionsgefäßständer MicroTestTube Rack	Brand, Wertheim
Reaktionsgefäßständer u. Laborwecker	VWR, Darmstadt
Zytospin (Single (1x2ml, Nr.1664)- und Triple(3x2ml, Nr. 1667)- Reservoir	Hettich, Tuttlingen
Zytospinschlitten mit Objektträgerfixierung (Nr.1662)	Hettich, Tuttlingen

3.1.3. Geräte

Absaughilfe Vacuboy	IBS Integra Biosciences, Fernw
CO2-Inkubator Hera Cell 240	Heraeus, Hanau
Dampfsterilisator Varioklav	H+P Labortechnik
Eppendorf Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Eismaschine	Ziegra
Gefrierschrank -80°C	Nalgen Nunc Int, Penfield, USA
Heißluftsterilisator Heraeus Oven	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Heraeus Fresco 21 Mikrozentrifuge	Thermo Scientific, Waltham
Kühlraum 4 °C	Thalheimer, Erlangen
Kühl-Gefrier-Kombination 4 °C/-20 °C	Bosch, Gerlingen
Labor-Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Mikroskop Axioskop 40	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop Axiovert 40CFL (Vergrößerung: 100-, 200- und 400fach)	Zeiss, Oberkochen
Mikroskopkamera AxioCam MRc5	Zeiss, Oberkochen
Personal Computer	Dell, USA
Sicherheitswerkbank Steri Flow	Heraeus, Hanau
Ultraschallbad Sonorex Super RK510	Bandelin
Vakuumpumpe MiniVac Power	PeqLab
Vortex VF2	IKA, Staufen
Wasserbad Aqualine AL18	Lauda, Lauda-Königshofen
Zentrifuge MegaFuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Zytospin-Zentrifuge 1200	Hettich Universal

3.1.4. Biochemikalien und Lösungen

Biochemikalien

Antibody Diluent	Dako, Carpinteria, USA
Aqua Dest	Braun, Melsungen
AP Substrate Buffer	Dako REAL, Carpinteria, USA
Chromogen	DAKO, EnVision FLEX, Carpinteria, USA
Chromogen Red 1-3	Dako REAL, Carpinteria, USA
DAB (3,3'-Diaminobenzidin	Dako, Carpinteria, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Doublestain Block	DAKO, EnVision G/2 Doublestain System, Carpinteria, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Gibco, Thermo Fisher, USA
Ethanol	AppliChem, Darmstadt
Formaldehyd	Sigma, St. Louis, USA
Fötale Kälberserum FCS, frei von Doxycyclin	Sigma, St. Louis, USA
Glutaraldehyd 4%	
Glycergel	
Kodan Desinfektionsspray	Schülke
Levamisole	Dako REAL, Carpinteria, USA
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Mayers Hämalaun	Merck, Darmstadt
Methanol reinst	Merck, Darmstadt
Nagellack Express Nailcare	Maybelline Jade, NewYork
Polymer/AP	DAKO, EnVision G/2 Doublestain System, Carpinteria, USA
Polymer /HRP	DAKO, EnVision G/2 Doublestain System, Carpinteria, USA
Permanent Red Substrate Buffer	AKO, EnVision G/2 Doublestain System, Carpinteria, USA
Permanent Red Chromogen	DAKO, EnVision G/2 Doublestain System, Carpinteria, USA
Peroxidase-Blocking Reagent	DAKO, EnVision FLEX
Streptavidin Alkaline Phosphatase	Dako REAL, Carpinteria, USA
Substrate Buffer	DAKO, EnVision FLEX, Carpinteria, USA
Terralin Protect	Schülke
TritonX-100	Boehringer, Mannheim
Target Retrieval Solution	DAKO, EnVision FLEX, Carpinteria, USA
Wash Buffer 10x für Immunzytochemie	Dako, Carpinteria, USA

Lösungen

Antibiotic-Antimycotic (P/S)	Gibco, Thermo Fisher, USA
Fixierlösung für Objektträger	0,04% Glutaraldehyd in PBS = 198ml PBS + 2ml 4% Glutaraldehyd
Fötale Kälberserum (FCS) 5%	Sigma, St. Louis, USA
Hepes-Puffer	Gibco, Thermo Fisher, USA
Medium RPMI 1640+ L-Glutamine	Gibco, Thermo Fisher, USA
Permeabilisierungslösung	2% TritonX-100/DMSO in PBS = 4 ml Stammlösung TritonX-100/DMSO 1:9 (bspw. 10ml TritonX-100 + 90ml DMSO) + 196 ml PBS
PBS (Phosphat Buffered Saline)	120mM NaCl + 2,7mM KCl + 10mM Kalium-Phosphatpuffer+ ad 1 l H ₂ O, pH 7,4
0,25% Trypsin-EDTA-Solution	Sigma, St. Louis, USA

3.1.5. Kits

- a) Dako REAL Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse (Code K5005)
- b) EnVision G/2 Doublestain System, Rabbit/Mouse (DAB+/Permanent Red) (Code K5362)
- c) EnVision FLEX Mini Kit, High pH (Dako Autostainer Plus) (Code K8024)

3.1.6. Antikörper

3.1.6.1. Primäre Antikörper

Anti-Androgen-Rezeptor-V7 Antikörper von Abcam

Der hier von der Firma Abcam verwendete Antikörper gegen AR-V7 (Klonnummer: EPR15656, Bestellnummer: ab198394) ist ein monoklonaler Kaninchen Anti-Androgen-Rezeptor Antikörper vom IgG-Typ, der ausschließlich gegen menschliche AR-V7 Protein gerichtet ist. Er ist sowohl für die Gelelektrophorese, als auch für das hier verwendete immunhistochemische Verfahren zugelassen. Seine Proteingröße wird mit circa 80 kDa angegeben (19). Mit Hilfe dieses Antikörpers ist es möglich AR-V7 positive Zellen innerhalb humaner Prostatazellen zu identifizieren (19, 214, 215). Laut Herstellerangaben ist eine Verdünnung für den Primärantikörper von 1/250 und für den Sekundärantikörper von 1/500 ausreichend.

Anti-CK8/18 Antikörper

Für die immunzytochemische Identifizierung von Tumorzellen wurde ein Zytokeratin Antikörper (Monoclonal Rabbit Anti-Human Cytokeratin 8/18; DAKO) verwendet, der gegen Zytokeratin 8 und 18 bindet. Zytokeratine gehören zur Familie der Intermediärfilamente (216) und stellen Proteine dar, welche v.a. eine stabilitätstragende Rolle im Zytoskelett besitzen. CK8/18-Antikörper dient gegen Karzinome epithelialen, dem PCa entsprechend, und mesothelialen Ursprungs zu identifizieren (217, 218). CK18 ist ein Zytoprotein des sauren Typs (Klasse I) mit 45kDa und CK8 ist ein Zytoprotein des neutral-basischen Typ B (Klasse II) mit 54 kDa. Aus einer CK8/18-Antikörper Färbung resultiert ein zytoplasmatisches und/oder membranöses Färbemuster.

3.1.6.2. Sekundäre Antikörper

Der sekundäre Antikörper dient im Gegensatz zum primären Antikörper nicht der Erkennung spezifischer Oberflächenmoleküle von Proteinen, sondern der Erkennung des primären Antikörpers. Dabei ist er gekoppelt an verschiedenste Konjugate oder Marker, die hier unter enzymatischen Reaktionen Signale in Form von Farbreaktionen aussenden, welche wiederum detektiert werden können und somit Rückschluss auf den eigentlichen Primärantikörper liefern.

- Rabbit/Mouse (LINK) (EnVision G/2 Doublestain System, Rabbit/Mouse; DAB+/Permanent Red; Code K5362)
- EnVision FLEX/HRP (EnVision FLEX Mini Kit, High pH; Dako Autostainer Plus; Code K8024)
- Dako REAL Biotinylated Secondary Antibodies (Dako REAL Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse; Code K5005)

3.1.6.3. Software

Microsoft Excel	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Microsoft Word	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Prism v7.02	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
SPSS v19	IBM, Armonk, New York, USA

3.1.7. Isolation disseminierter mononukleärer Zellen mittels OncoQuick

OncoQuick (HEXAL Greiner bio-one) ist ein vereinfachtes Verfahren zur Gewinnung von CTC aus Vollblut oder alternativ aus Knochenmark. Im Gegensatz zu anderen Systemen orientiert sich OncoQuick ausschließlich anhand eines Dichtegradienten und ist unter mehreren Zentrifugationsschritten innerhalb von 45 min durchführbar. Das OncoQuick-Röhrchen besteht aus zwei Kompartimenten, welche durch eine poröse Trennmembran, die Filterscheibe, getrennt sind. Das obere Kompartiment kann bis zu 30 ml Vollblut fassen, während sich im unteren Kompartiment das Trennmedium befindet. Bereits durch die erste Zentrifugation (Abb.7) reichern sich auf Grund ihrer spezifischen Dichte v.a. Erythrozyten und Leukozyten im unteren Kompartiment an. Dem entgegengesetzt verlagert sich das Separationsmedium nach kranial, wobei auf Grund der spezifischen Dichte der CTCs eine Akkumulation zwischen Separationsmedium und Plasma innerhalb des oberen Kompartiments erfolgt. Die so genannte Interphase. Neben CTCs sind hier auch Thrombozyten aufzufinden. Diese Interphase gilt es zu pipettieren, mittels verschiedener Waschschriffe die CTCs zu isolieren und diese auf Objektträger zu übertragen.

3.1.8. Zellkultivierung der Prostatazelllinie 22Rv1

22Rv1-Zelllinie: Die PCa Zelllinie 22Rv1 ist eine humane PCa Zelle mit epithelalem Ursprung. Die Gewinnung der 22Rv1 Zellreihe basiert auf einem Xenotransplantat Modell, in welchem eine Vermehrung von parentalen CWR22-Zellen in Mäusen mit kastrationsbedingter Regression und anschließendem Rezidiv induziert wurde (219). Das Xenotransplantat CRW22 stammt dabei von einem Patienten mit primärem PCa mit Gleason 9 und ossärer Metastasierung (220). Die 22Rv1 Zelllinie bildet PSA und exprimiert den Androgenrezeptor, sowie die hier relevante Splicevariante AR-V7 (221). Weiterhin ist die Möglichkeit einer hormonellen Stimulation mit DHT zur Verbesserung des Zellwachstums mit einhergehender Androgenrezeptorzunahme beschrieben (219).

Ursprung	Zelllinie	Medium	Zusätze	Stimulation	Splitten	Zelltyp
human prostate carcinoma	22RV1	RPMI mit L-Glutamine	+10% FCS +Penicillin/ Streptomycin +25 mm Hepes	Testosteron	2-3/Wo. mit 1:3 bis 1:6	epithelial

3.1.9. Material und Reagenzien: Westernblot-Analyse

Blotting-Apparatur Trans Blot Turbo	BioRad, USA
Gelelektrophoresekammer Mini Protean Tetra System	BioRad, USA
Mini-Kammersystem	Nr. 67 S/19567, BioRad, USA
Polyclonal Goat anti Rabbit–HRP	P0448 v. Dako, Carpinteria, USA
Fertig-Blot-Kits	BioRad/PVDF, USA
rabbit-anti-mouse-HRP	Dako P0260, Carpinteria, USA
Roti-Block	Roth, Karlsruhe
β-Aktin	A5441, Sigma, St. Louis, USA
ECL-Lösung	PerkinElmer NEL104001EA
5 % Magermilch in TBST, Block-Lösung	Sigma-Aldrich St. Louis, USA
TBS pH 7,5 Tris Buffered Saline	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

3.2. Methodik

3.2.1. Studienprotokoll, Ethikvotum und Einschlusskriterien

Das Studienprotokoll wurde der Ethikkommission am 06.05.2014 vorgelegt und genehmigt. Allen Richtlinien und Grundlagen der zentralen Ethikkommission wurde, unter Prüfung stellvertretend durch die örtliche Ethikkommission der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz Folge geleistet (Genehmigungskennnummer: 837.251.14 (9490-F)). Von allen Patienten liegt eine Einwilligungserklärung zur Erhebung und Speicherung klinischer und metabolischer Daten, sowie zur venösen Blutentnahme vor. Eine Pseudonymisierung der Patientendaten wurde durchgeführt. Die Rekrutierung der Patienten erfolgte vom 14.08.2014 bis zum 14.10.2015 im Rahmen der wöchentlichen Tumorsprechstunde der Urologie im „Universitären Centrum für Tumorerkrankungen“ (UCT) der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Die Progredienz des PCa wurde anhand radiologischer und/ oder biochemischer Untersuchungen, sowie klinischem Befund festgemacht. So erfolgten neben den routinemäßig durchgeführten PSA- und Testosteronkontrollen, radiologische

Kontrolluntersuchungen gemäß der S3-Leitlinie Prostatakarzinom 2014. Es wurde immer eine Blutentnahme (2 x 10 ml Citrat-Blut) vor Beginn der neuen Therapie durchgeführt. Hierauf erfolgte weiterhin eine Entnahme nach circa 3 Monaten und nach circa 6 Monaten. Das Blut wurde zeitnah im urologischen Labor der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz aufbereitet.

3.2.2. Erfassung und Bewertung klinischer Daten

Die den Patienten korrespondierenden individuellen klinischen Daten wurden der klinischen Datenbank (SAP) der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz entnommen. Sämtliche Laborwerte mit Beginn der neuen Therapie bis zur Beendigung der Studie bzw. unter Umständen bis zum Tode wurden dem Laborprogramm (Lauris). Die in regelmäßigen Abständen stattfindenden radiologischen Kontrolluntersuchungen bzw. bei Komplikationen durchgeführte bildgebende Diagnostik waren ebenso zugänglich (Sectra). Die Bewertung der biochemischen Parameter und der radiologischen Beurteilung erfolgte folgendermaßen:

Biochemischer Progress oder Remission: Eine partielle biochemische Remission wurde als solche gewertet, wenn ein PSA-Abfall um $\geq 50\%$ ohne Berücksichtigung des zeitlichen Intervalls erfolgt ist. Ein biochemischer Progress wurde sodann dokumentiert, wenn nach Erreichung des PSA-Nadirs ein PSA-Anstieg ersichtlich war.

Radiologischer Progress oder Remission: Ein radiologischer Progress wurde als solcher gewertet, wenn in den bildgebenden Verfahren eine Zunahme des Tumolvolumens oder neue Metastasen durch den Radiologen festgelegt wurde. Eine stabile bildmorphologische Situation im Sinne einer „*stable disease*“ wurde als Therapieansprechen gewertet.

3.2.3. CTC-Isolation

Die Anreicherung der CTCs erfolgte mittels OncoQuick-Röhrchen mit Übertragung in 50 ml PP-Röhrchen und abschließend auf die Objektträger. Der Bearbeitungsbeginn fand direkt nach der Blutentnahme statt und sollte generell eine Bearbeitungsdauer

2-3 h nicht überschreiten. Die kontinuierliche Kühlung der Proben von 2 - 8 °C war gewährleistet.

3.2.3.1. Aufbereitung des Citrat-Blutes via OncoQuick

Die 2 x 10 ml Citrat-Monovette wurden zusammen mit dem OncoQuick-Röhrchen 15 min auf Eis gestellt (Abb.9). War etwas vom blauen Trennmedium des OncoQuick oberhalb der Trennmembran wurde das OncoQuick-Röhrchen bei 500 rpm (Zentrifuge MegaFuge 1.0R) für eine Minute zentrifugiert (Abb.9). Die Zentrifuge (MegaFuge 1.0R Heraeus) wurde danach auf 4 °C vorgekühlt. Nach 15 min wurde das Citrat-Blut mittels 10 ml Pipettierhilfe (Accu-Jet Pro) direkt aus der Citrat-Monovette in das OncoQuick-Röhrchen übertragen. Die Pipette wurde vorher stets mit Waschpuffer befeuchtet, um Scherkräfte zwischen CTCs und Pipettenspitze zu reduzieren. Die Überschichtung erfolgte behutsam, damit das Blut nur oberhalb der Trennmembran aufzufinden war. Die erste Zentrifugation wurde bei 3000 rpm (Zentrifuge MegaFuge 1.0R) für 20 min ohne Bremse bei 4 °C durchgeführt.

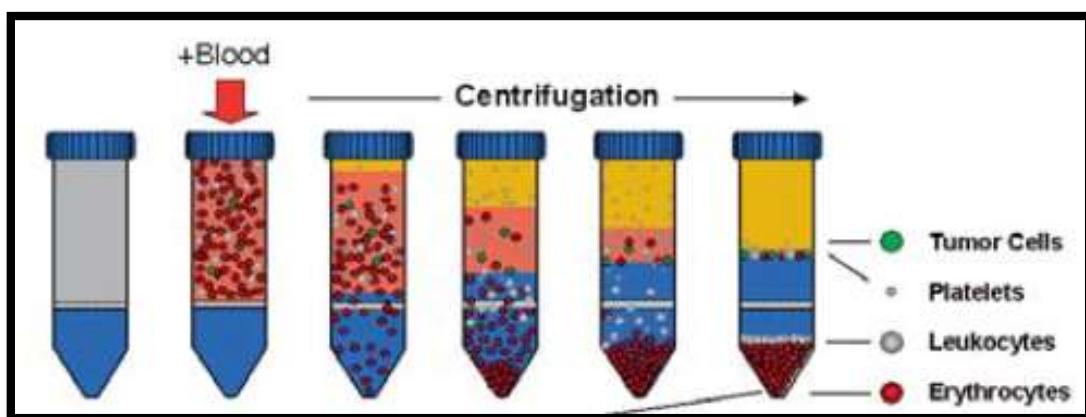


Abbildung 9 (mit freundlicher Genehmigung von © Greiner Bio-One GmbH): Schematische Darstellung der Dichtezentrifugation. Initial zeigt sich ein zweiphasiges Medium, welches durch eine Trennmembran getrennt ist. Nach Zentrifugation des Blutes stellen sich die plasmatischen Anteile wie Erythrozyten und Leukozyten unterhalb der Trennmembran und die gesuchten CTCs oberhalb der Trennmembran, oft zu einem Zellpellet akkumuliert, dar.

Die Phasen oberhalb der Trennmembran enthielten die CTCs und wurden händisch in ein neues 50 ml PP-Röhrchen überführt. Da sich häufig während der Zentrifugation ein sichtbares Zellkonglomerat an der Innenwand des OncoQuick-Röhrchens gebildet hatte, wurde dieses mit 5-10 ml Waschpuffer mittels Pipettierhilfe

(5 - 10 ml) abgelöst und ebenfalls in das neue PP-Röhrchen überführt. Anschließend wurde das PP-Röhrchen auf sein Endvolumen von 50 ml mit Waschpuffer aufgefüllt, fünfmal über Kopf geschwenkt und daraufhin bei 1400 rpm (Zentrifuge MegaFuge 1.0R) für 10 min mit Bremse bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand des 50 ml PP-Röhrchens wurde nun mittels Absaughilfe (Vacuboy) unter einer Werkbank bis auf 5 ml abgesaugt, um es wiederum mit Waschpuffer bis auf sein Endvolumen von 50 ml zu füllen. Das Zellpellet am Röhrchengrund wurde vorsichtig resuspendiert und das PP-Röhrchen fünfmal über Kopf geschwenkt. Eine weitere Zentrifugation bei 1100 rpm (Zentrifuge MegaFuge 1.0R) für 10 min mit Bremse bei 4 °C folgte. Der Überstand wurde diesmal so weit wie möglich mit der Absaughilfe abgesaugt, ohne dabei das Zellpellet am Grund zu gefährden. Unter Zugabe von 10 ml Erythrozytenlyse mittels Pipettierhilfe wurde das PP-Röhrchen für 5 min auf Eis gestellt mit dem Ziel die noch vorhandenen Erythrozytenrückstände zu fragmentieren. Nach diesen 5 min wurde das PP-Röhrchen umgehend mit PBS auf das Endvolumen von 50 ml befüllt, fünfmal über Kopf geschwenkt und bei 1100 rpm (Zentrifuge MegaFuge 1.0R) für 10 min mit Bremse bei 4 °C zentrifugiert. Abschließend wurde, sofern nach Sichtkontrolle keine weitere Erythrozytenlyse erforderlich war, der Überstand unter der Werkbank weitest möglich abgesaugt und das Zellpellet unter Zugabe von 1 ml PBS resuspendiert. Die absolute Zellzahl der entstandenen Zellsuspension musste nun eruiert werden.

3.2.3.2. Bestimmung der Zellzahl via Neubauer-Zählkammer

Die maximale Zellzahl, die ein Zytospin pro Reservoir auf den Objektträger übertragen kann, war auf 50.000 Zellen limitiert. Deshalb musste die Zellzahl der Zellsuspension für eine reproduzierbare Auswertung via Neubauer-Zählkammern vorher quantitativ erfasst werden. Hierfür wurden 10 µl der Zellsuspension zwischen Deckglas und Neubauer-Zählkammer pipettiert. Nun wurden unter dem Mikroskop bei 200-facher Vergrößerung (MikroskopAxioskop 40) die Zellen in den vier eingeschliffenen Großquadraten ausgezählt. Zur Ermittlung der Konzentration (c) aus Gesamtzellanzahl/ Volumen wurde nun der Mittelwert der vier Großquadrate mit 10^4 multipliziert, was aus dem Volumen $V = 0,1 \text{ mm}^3 = 10^{-4}$ der Neubauer-Zählkammer

resultierte. Auszählung mittels folgender Gleichung: $c = \text{Gesamtzellanzahl} / 4 \times 10^4$ Zellen / ml Zellsuspension.

3.2.3.3. Übertragung auf Objektträger via Zytospin

Pro Reservoir eines Zytospins war es möglich 50.000 Zellen auf einen Objektträger zu übertragen. Resultierend aus der Bestimmung der Gesamtanzahl durch die Neubauer-Zählkammern wurde diese durch 50.000 dividiert und man erhielt die Anzahl der zu fertigenden Objektträger. Die Zellsuspension wurde abhängig von der Gesamtanzahl pro 50.000 Zellen mit 1 ml PBS weiter verdünnt und nochmals mittels Pipette und/oder Vortexer sehr vorsichtig resuspendiert. Bei der Präparation der Zytospin-Schlitten war darauf zu achten, dass die Dichtungsgummis der Reservoirs mit den Objektträgern gut abschlossen. Es wurden Single-Reservoir und Triple-Reservoir Zytospins verwendet. Jeweils 1 ml der Zellsuspension wurde in jedes Reservoir gefüllt, um sie hierauf in der Zentrifuge (Hettich, Zytospin-Zentrifuge 1200) bei 60 % (entsprechen ca. 3600 rpm) für 5 min auf die Objektträger zu zentrifugieren. Danach wurde der Medium-Überstand verworfen und die Objektträger für mindestens 24 h fixiert im Zytospin-Schlitten getrocknet. Nach vollständiger Trocknung wurden die Objektträger in Aluminiumfolie verpackt und bis zur immunhistochemischen Färbung bei -20 °C deponiert.

3.2.4. Methodik der immunhistochemischen Doppelfärbung

Korrekterweise würde man unseren Versuchsaufbau als immunzytologische Färbung deklarieren, da die hier verwendeten Ausgangspräparate keine Gewebeschnitte, sondern zytologisches Material darstellen. Tatsächlich werden allerdings beide Begrifflichkeiten im wissenschaftlichen Alltag redundant verwendet. Sowohl die immunhistochemische, als auch die immunzytologische Färbung dient dabei der Detektion eines bestimmten Proteins innerhalb einer Zelle bzw. eines Zellverbandes durch Antikörperbindungen. Das Prinzip beruht darauf, dass ein Antikörper nur eine bestimmte Struktur i.d.R. ein Protein spezifisch, als sein Antigen komplementär bindet. Antikörper entsprechen dabei *in vivo* gebildeten Abwehrstoffe, die vor allem durch B-Zellen bzw. Plasmazellen als Teil eines kompetenten Immunsystems reaktiv

auf das Eindringen von Erregern, wobei ein spezifisches Epitop eines Antigens als maßgebende Identifikationsstruktur dient, exprimiert werden. In unserer Arbeit wurde die indirekte immunhistochemische Methode durchgeführt, wobei ein sekundärer konjugierter Antikörper gegen den primären Antikörper gerichtet wird, welcher wiederum sichtbar gemacht werden kann. Der primäre Antikörper wird dabei durch einen biotinylierten sekundären Antikörper nach selbigem Prinzip identifiziert und geht hiernach eine Bindung mit einer Enzym-gekoppelten Einheit ein. Hierbei wurde in unserer Studie zum einen bei der AK-CK8/18-Färbung eine Bindung mit Meerettichperoxidase (HRP) und im Zuge der AK-AR-V7-Färbung eine Bindung mit alkalischer Phosphatase-gekoppeltem Streptavidin hergestellt. Diesen Bindungskaskaden ist schlussendlich eine spezifische Färbung nachgeschaltet. Durch Zugabe eines Chromogens erfolgt dabei eine Oxidation durch die proteingekoppelten Peroxidase bzw. eine Dephosphorylierung der alkalischen Phosphatase mit Entfaltung einer persistierenden Färbung. In unserem Falle eine braune Färbung durch den Antikörper CK8/18, als klassischer Nachweis für eine Tumorzelle und eine rote Färbung durch den Antikörper AR-V7, als Nachweis der gesuchten Splicevariante. Um die mikroskopische Auswertung zu erleichtern wurde nach der Doppelfärbung eine Gegenfärbung mit Hämalaun durchgeführt. Abschließend war die mikroskopische Begutachtung mit qualitativer und semiquantitativer Beurteilung möglich.

Die große Schwierigkeit war es die oben genannte Doppelfärbung zu etablieren, um die aufwendig isolierten CTCs zu identifizieren und gleichzeitig zu eruieren ob diese Proteinstrukturen der Splicevariante AR-V7 enthielten. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sollte unter konsequenter Mitführung einer Positiv-, sowie einer Negativkontrolle gewährleistet werden. Hierfür wurden mit Testosteron stimulierte Zellen der Zelllinie 22Rv1 verwendet. Die Stimulation provozierte eine erhöhte Androgenrezeptordichte, welche wiederum das Färbeergebnis intensivierte.

3.2.4.1. Vorbereitung und Vorbehandlung der Objektträger

Die bei -20 °C gelagerten Objektträger wurden in 15er Blocks zusammen mit zwei Kontrollobjektträgern mit 22Rv1-Zellen für die Doppelfärbung passiv auf Raumtemperatur gebracht. Die geringe Anzahl von 17 Objektträgern pro

Färbedurchgang war gewählt worden, um die diversen Färbe- und Inkubationsschritte möglichst präzise durchführen zu können.

Nachdem die Objektträger aufgetaut waren, wurden sie für 3 Minuten in PBS rehydriert. Es folgte die Nachfixierung in 0,04 % v/v Glutaraldehyd-Lösung. Hierfür wurden 2 ml 4 % w/v Glutaraldehyd in 198 ml PBS gelöst. Die Nachfixierung dient der Stabilisation der Zellmorphologie und macht damit die Zellstrukturen widerstandsfähiger für die anstehende Behandlung bzw. immunhistochemische Färbung. Die Aldehydgruppen (-CHO) der Glutaraldehyde gehen Verbindungen mit den zahlreichen Stickstoffgruppen der Proteine ein. Dabei kommt es zur Ausbildung sog. Cross-links, sprich Vernetzungen, die die Zellstabilität heraufsetzen (222, 223). Um etwaige Reste des Glutaraldehyds zu entfernen, folgt zweimaliges Spülen mit PBS. Der Überstand des PBS auf den Objektträgern wurde auf ein Tuch abgelassen und die Objektträger in eine feuchte Kammer gelegt. Da das nachfolgende Färbeprinzip u.a. auf einer oxidativen Aktivierung von Chromogenen durch eine spezifisch gekoppelte Peroxidase beruht, musste die physiologisch im Gewebe vorkommende endogene Peroxidase mit einer Peroxidase Blocking Solution für 10 Minuten geblockt werden. Die endogene Peroxidase ist hierbei Bestandteil vieler Zellen, wie zum Beispiel Erythrozyten, Granulozyten und Neurone (224). Unter Zugabe des Chromogen würde, da dieses nicht zwischen endogener und antikörpergekoppelter Peroxidase differenziert, eine falsch-positive Färbung hervorrufen. Anschließend folgte wiederum zweimaliges Spülen mit PBS. Um die Durchgängigkeit der Zellmembranen der CTC für die Antikörper zu erhöhen, wurde vor Beginn der eigentlichen Doppelfärbung ein Permeabilisierungsschritt zwischen geschaltet. Hierbei wurden die Objektträger für 5 Minuten in 2 % TritonX-100/DSMO-Lösung inkubiert. Dafür waren 4 ml TritonX-100/DSMO-Stammlösung im Verhältnis 1:9 in 196 ml PBS in einer Küvette bereitgestellt. Das TritonX-100 entfernt dabei als nichtionisches Reagenz Membranlipide und erhöht damit die Penetration der Zellmembran bzw. deren Permeabilität (225). Der stärkste Effekt des amphiphilen DMSO (Dimethylsulfoxid) zur Permeabilitätssteigerung ist seine Fähigkeit hydrophile Poren in die Lipiddoppelschicht einzubauen (226). Nach zweimaligem Spülen mit PBS wurden die Objektträger in einem Ständer für 5 Minuten mit Waschpuffer platziert.

Für die nachfolgenden Färbeschritte wurden die Objektträger jeweils zusammen mit einem sogenannten Coverslide unter Zugabe eines Tropfens Waschpuffer auf die Schnittfläche des Objektträgers und Kompression des Objektträgers mit den Deckgläschen vertikal in ein spezielles Färbegestell mit Abtropfkammer (Racks) eingespannt. Der Deckgläschen baut oberhalb der Schnittfläche des Präparates ein minimales Lumen auf und sorgt dafür, dass die in die Kammer oberhalb des Lumens applizierten Lösungen gleichmäßig über das komplette Präparat verteilt werden können. Zur Prüfung der korrekten Zusammenführung von Objektträger und Deckgläschen wurde einmalig mit Waschpuffer gespült. Lief das Waschpuffer zu schnell durch das Lumen, war eine adäquate Inkubationszeit nicht gewährleistet und der Sitz des Objektträgers musste folglich korrigiert werden. Mit korrektem Sitz aller Objektträger war nun die Vorbereitung für die eigentliche Färbung abgeschlossen.

3.2.4.2. Immunhistochemische Färbung mit Anti-CK8/18-Antikörper

Jedem der Patientenpräparate und der Positivkontrolle mit 22Rv1 Zelllinien wurde der primäre AK-CK8/18 (ready to use) jeweils mit 100 µl zugeführt und im abgedecktem Färbegestell, um Kontaminationen zu vermeiden, für 60 Minuten inkubiert. Dem dreimaligen Spülen mit Waschpuffer, folgte die Inkubation mit EnVision Flex Duallink/HRP für 30 Minuten. Der aus dem Färbekasten verwendete EnVision Flex Duallink/HRP verknüpfte die sekundäre Antikörperbindung und die normalerweise nachgeschaltete Peroxidasekopplung, hier eine Meerrettichperoxidase, in einem Schritt. Nach weiterem dreimaligem spülen mit Waschpuffer folgte die Auftragung von 100 µl Chromogen DAB (Diaminobenzidin) für 15 Minuten auf alle Objektträger, wobei unter Berücksichtigung der Toxizität des Chromogens DAB mit höchster Sorgfalt gearbeitet werden musste. Aus dem Färbekasten EnVision-Flex-Kit wurde hierfür im Vorfeld eine Lösung aus 2 Tropfen Chromogen DAB (Flakon 4) und 2000 µl Substrat-Puffer (Flakon 3) bereitgestellt. Die zum gesuchten Protein gekoppelte Peroxidase oxidiert schließlich das Chromogen DAB zu einem braunen Farbstoff. Bereits während der Inkubation war teilweise eine leichte bräunliche Einfärbung mit bloßem Auge sichtbar. Im Anschluss wurden die Objektträger zügig aus dem Färbegestell (Racks) befreit, um

sie in einem speziellen Objektträgerschlitten mit A.d. zu platzieren. Das Bad in A.d. wurde einmalig gewechselt und anschließend gegen Waschpuffer ausgetauscht.

Für die zweite Färbung wurden die Objektträger einzeln wieder nach bereits dargestelltem Prinzip in die Deckgläschen eingespannt. Abschließend ist ein dreiminütiger Proteinblock mit Doublestain Block (Flakon 5 des Doppelfärbekastens) zwischen erster und zweiter Antikörperauftragung bei Doppelfärbungen notwendig. Dieser Schritt dient der Vermeidung von Kreuzreaktion, indem inaktive Primärantikörper- und Verbindungsantikörper der ersten Färbung entfernt werden, ohne die eigentliche Färbung zu beeinflussen.

3.2.4.3. Immunhistochemische Färbung mit Anti-AR-V7-Antikörper

Die Deckgläschen waren nun initial wieder regulär nach bereits dargestelltem Prinzip im Färbegestell eingespannt. Es folgt die zweite primäre Antikörper-Inkubation mit Auftragung von 100 µl des monoklonalen Kaninchen IgG Antikörper AR-V7 zur Identifizierung der gesuchten Splicevariante für 60 Minuten. Hierfür musste eine Küvette mit einer Antikörperverdünnung (Antibody Diluent) im Verhältnis von 1:40 (50µl Antikörper und 1950 µl Antikörperverdünner) vorbereitet sein. Die Negativkontrolle wurde dabei nicht berücksichtigt. Nach dreimaligem Spülen mit Waschpuffer wurden alle Objektträger mit 100 µl biotinyliertem sekundärem Antikörper Kaninchen Maus-Link/AP (Dako REAL Detection System, biotinylierte Ziege-Anti-Maus-& Ziege-Anti-Kaninchen) für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde wiederum mit Waschpuffer gespült und die Kopplung der sekundären Antikörper mit der Enzym-Einheit, hier via Zugabe von 100 µl Streptavidin/Alkalische Phosphatase (DAKO REAL Detection System) für 15 Minuten, eingeleitet. Nach dreimaligem Spülen folgte final die rote Färbung der Androgenrezeptor Splicevariante. Hierfür musste eine toxische, kanzerogene Mischung aus mehreren Ingredienzien des Färbekastens „Dako REAL Detection System“ zubereitet werden, die maximal 30 Minuten haltbar war und dunkel (Flakon mit Alufolie umwickeln) aufbewahrt werden musste. Dem Trägermedium von 2000 µl AP-Substrate Buffer für die Farbstoffe wurden dabei jeweils 80 µl Chromogen Red 1 (Flakon C), Chromogen Red 2 (Flakon D) und Chromogen Red 3 (Flakon E) nacheinander beigelegt. Nach jeder Chromogen-Zugabe musste die entstandene

Substrat-Arbeitslösung gründlich gemischt werden. Zusätzlich wurde der Substrat-Arbeitslösung 15 µl Levamisole zugefügt, um einer unerwünschten unspezifischen Färbung durch endogene alkalische Phosphatasen entgegenzuwirken. Anschließend wurden alle Objektträger mit 100 µl für 8 Minuten mit der Substrat-Arbeitslösung inkubiert. Alle Objektträger wurden nun den Deckgläschen entnommen und in eine Küvette gestellt. Nach mehrmaligem Spülen der Küvette mit A.d. war die Doppelfärbung abgeschlossen und die Objektträger bereit für die Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

3.2.4.4. Gegenfärbung und Versiegelung der Präparate

Für die Gegenfärbung musste das Hämalaun gefiltert und für die Versiegelung der Präparate das Glycergel im Brutschrank auf ca. 60 °C erhitzt worden sein. Die Objektträger wurden für 5 Minuten in unverdünnten Hämalaun gefärbt und anschließend für 10 Minuten in Leitungswasser gebläut. Das Hämalaun färbt vornehmlich saure, sprich basophile Zellstrukturen, wie beispielsweise Zellkerne, Kollagen, Elastin und Mitochondrien, wobei sich die Zellkerne blauschwarz und alle übrigen Strukturen blau präsentieren. Die Gegenfärbung ermöglichte dabei eine bessere mikroskopische Differenzierung der CTC. Letztmalig wurde die Küvette mit A.d. aufgefüllt. Die Objektträger wurden anschließend einzeln mit einer Pinzette entnommen und unter Zugabe des erwärmten Glycergels mit einem Deckblatt eingedeckt. Es folgte die Trocknung für 24 Stunden und danach die schlussendliche Versiegelung der Deckglasränder mit handelsüblichem Nagellack. Aufbewahrt bis zur mikroskopischen Beurteilung wurden die Objektträger in speziellen Objektträgermappen bei Raumtemperatur.

3.2.4.5. Immunhistochemische Positivkontrolle und „no primary antibody control“

Der Nachweis einer spezifischen Färbung durch beide Antikörper wurde durch das konsequente Mitführen einer Positivkontrolle und einer Negativkontrolle bei jedem Färbeprotokoll gewährleistet. Die Objektträger hierfür waren mit Zellen der Zelllinie 22Rv1, versehen. Die Positivkontrolle wurde äquivalent wie die Patientenpräparate

behandelt, wohingegen die primären Antikörperauftragungen, sowohl von AK-CK8/18, als auch von AK-AR-V7 auf die Negativkontrolle entfielen. Sämtliche übrigen Schritte wurden bei der Negativkontrolle identisch durchgeführt. *Per definitionem* wurde hier somit keine klassische Negativkontrolle durchgeführt, da keine zweite AR-V7-negative Prostatazelllinie mitgefärbt wurde. Jedoch können durch diese sog. „*no primary antibody control*“ unter Auslassen des Primärantikörperauftrages auf die Prostatazelllinien, hier 22Rv1, mögliche unspezifische Färbungen der Sekundärantikörper detektiert werden.

3.2.4.6. Mikroskopische Auswertung der Präparate

Die mikroskopische Auswertung der auf die Objektträger übertragenen Präparate erfolgte am Mikroskop „Axioskop 40“, welches mit der Mikroskopkamera „AxioCam MRc5“ gekoppelt war und eine direkte Übertragung, sowie eine Bearbeitung mittels Mikroskopie-Software „AxioVision Rel. 4.8“ der Präparatbilder auf einem Arbeitscomputer erlaubte. Jedes Präparat wurde initial mit einer 100 bzw. 200-fachen Vergrößerung komplett durchgefächert und via Mikroskopkamera auf den Arbeitscomputer übertragen.

3.2.5. Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit SPSS v19 (IBM) und Prism v7.02 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Die klinischen Ergebnisse wurden getrennt in zwei Gruppen bzgl. einer CTC/AR-V7 Positivität vs. CTC/AR-V7 Negativität analysiert. Mittels Fischer's exact Test wurde die Abhängigkeit beider Gruppen analysiert und dargestellt, sowie mittels Student's t-test wurde das PSA-Ansprechen beurteilt. Die Ergebnisse bis zum Auftreten eines Ereignisses (Time-to-event), hier entsprechend biochemisches und/oder radiologisches Rezidiv wurden mittels Kaplan-Meier-Diagrammen graphisch und statistisch unterlegt. Ein p-Wert ≤ 0.05 wurde als signifikant berücksichtigt.

3.2.6. AR-V7 Antikörper-Testung im Westernblot

Der Westernblot dient im allgemeinen dem Nachweis von zuvor desintegrierten Proteinen aus einem Proteinextrakt. Zunächst müssen dabei die Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Transfermembran transferiert werden, was allgemein hin als „Blotten“ bezeichnet wird und durch einen Stromfluss ermöglicht wird. Der Stromfluss gewährleistet eine Isolation der negativ geladenen Proteine aus dem Gel heraus in Richtung Anode, wo sie an die Transfermembran binden. Durch Antikörperfärbung können die zu analysierenden Proteine sodann nachgewiesen werden. Zuerst wird mit einem Primärantikörper und anschließend mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Auf Grund der Kopplung des Sekundärantikörpers an eine Peroxidase können dann die Proteine abgebildet werden.

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Chargen des AR-V7 Antikörpers, wobei mittels der ersteren (AR-V7 „alt“) sich initial keine adäquate immunhistochemische Darstellung in einer Probefärbung an 22Rv1-Zellen demonstrierte, ein Westernblot mit Gellauf am 14.04.2015 zur AR-V7-AK-Testung der beiden Chargen an 22RV1-Zelllinien durchgeführt. Am 07.04.2015 führten wir zuvor eine Fällung zur Proteinbestimmung mit 2 x 175µl Proteinlysate in Aceton durch. Diese wurde mit jeweils viermaligen Auftrag a 10µl in 2 x Ladepuffer aufgenommen. Dies entsprach eine Aufkonzentrierung der Probe auf das 4,4-fache. Die Westernblot-Elektrophorese wurde mit dem Mini-Kammersystem von BioRad (Nr. 67 S/19567) durchgeführt. Verwendet wurden hierbei Fertig-Blot-Kits von BioRad/PVDF im Transblot Turbo Transfer System. Nachfolgend der Proteinauftrag in Abb. 5:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Längenstand Magic Mark	22R V1	22R V1	22R V1	22R V1	Längenstand vorgefärbt	Längenstand vorgefärbt	Längenstand vorgefärbt	22R V1	22R V1	22RV 1	Tasche defekt.	22RV 1	Längenstand Magic Mark	
6µl	18µl	15µl	10µl	5µl	6µl	6µl	6µl	18µl	15µl	10µl		5µl	6µl	

Abb. 8: Der Proteinauftrag (2 x 175µl Proteinlysate) des AR-V7-AK für das 10%-ige Acrylamid-Gel an 22Rv1-Zelllinien.

Die Proteine wurden vorher 10 Min. auf 100°C erhitzt, auf Eis abgekühlt, gevortext und anzentrifugiert. Die Gellaufzeit betrug 2 Stunden bei 80 Volt. Die Blots wurden mit 7 Minuten angesetzt (Programm „Turbo“). Das Gel 1 wurde kurz in TBST gelöst und an den Längenstandard angepasst. Die Blockierung erfolgte mit 5 % Magermilch in TBST (Block-Lösung) über 2 h bei Raumtemperatur hinweg. Die Primär-Antikörper AR-V7 wurden in einem Verhältnis von 1:1500 die alte Charge und die neue Charge von 1:500 in je 7,5 ml Block-Lösung im 50 ml Röhrchen auf dem Taumel-Rollenmischer über eine Nacht bei 4°C inkubiert. Hiernach wurden sie für 3 x 10 Minuten in TBST gewaschen. Der Sekundär-AK wurde im Verhältnis von 1:1000 in Magermilch/TBST für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei erfolgte die Verwendung von Polyclonal Goat anti Rabbit-HRP (P0448 v. Dako) mit je 20 ml in Schälchen auf dem Taumler und hiernach 3 x 10 Minuten waschen in TBST. Die Detektion erfolgte in ECL-Lösung (PerkinElmer NEL104001EA) mit Inkubation von 5 ml pro Original-Membran (unzerschnitten) direkt vor Detektion für 1 Minute mit einer Detektionszeit von 0,5, 10 und 20 Minuten. Eine Woche nach der Originalfärbung wurden die Membranen ungestrippt mit β -Aktin nachgefärbt. Die Membranen waren dabei in PBS bei 4°C zwischengelagert geworden. Eine Blockierung erfolgte für 2 h in Roti-Block auf dem Rollenmischer bei 4°C über Nacht mit β -Aktin im Verhältnis 1:5000 (Sigma, Maus) bei 4°C (10 μ l in 50 ml, je 12,5 ml/Röhrchen). Sodann 3 x 10 Minuten in Roti-Block und 1 h mit rabbit-anti-mouse-HRP (Dako P0260) 1:1000 in Roti-Block (80 μ l in 80 ml, je 20 ml/Röhrchen) waschen. Wiederrum 3 x 10 Minuten waschen in Roti-Block. Die Detektion erfolgte mit ECL-Lösung (PerkinElmer NEL104001EA) mit 5 ml pro Original-Membran (unzerschnitten), welche direkt vor der Detektion inkubiert wurde mit einer Detektionszeit von 1 Minute.

3.3. Zellkultivierung

Das Arbeiten mit Zellen wurde in der Regel unter der sterilen Werkbank durchgeführt und durch die LTAs XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX und XXXXXXXXX angeleitet bzw. überprüft. Die Aufbewahrung des Mediums, des PBS und des Hepes-Puffer erfolgte im Kühlschrank. Die 22Rv1-Zelllinie wurde bei 37°C in einem CO²-Inkubator mit 5 %

CO₂-Gehalt und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Sämtliche Lösungen wurden vor deren Verwendung im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Ansetzen des gebrauchsfertigen Mediums:

500ml Medium RPMI 1640

+ 5 ml Antibiotikum- Antimykotikum (Penicillin/ Streptomycin)

+ 10 % FCS (50 ml)

+ 25 mM Hepes (12,5 ml)

+ Testosteron

Zum Auftauen der Zellen wurde das Medium (s.o.) vorgewärmt und die Zellen möglichst rasch auf eine Temperatur von 37°C aufgewärmt. Das Medium wurde in der Zellkulturflasche vorgelegt und die Zellen zum Medium hinzugegeben. Die Zellkulturflasche wurde verschlossen sodann im Brutschrank bei 37°C und 5%-igen CO₂-Gehalt bereitgestellt.

Die Zellen mussten circa zweimal bis dreimal pro Woche versorgt werden und in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:6 gesplittet werden. Zum Splitten der Zellen wurde das Medium abgesaugt. Zum Lösen der Zellen vom Untergrund der Zellkulturflasche wurde mit Trypsin/EDTA für wenige Minuten im CO₂-Inkubator inkubiert. Damit das FCS rausgewaschen wurde, welches die Wirkung von Trypsin blockiert, wurden die Kulturschalen zuvor zweimal mit PBS gespült. Das Trypsin-EDTA wurde auf die Kulturschale gegeben. Die Kulturflasche wurde einige Minuten (max. 10 min) unter der Werkbank stehen gelassen. Hiernach wurde unter dem Mikroskop kontrolliert, ob eine Ablösung der Zellen stattgefunden hat, was unter manuellen Schwenken der Kulturschalen und Klopfen unterstützt werden konnte. Der Ablösungsprozess wurde sodann mit Medium plus FCS gestoppt. Die Zellen wurden schließlich mit frischem Vollmedium vom Flaschenboden gespült. Die trypsinisierten Zellkulturen konnten nun für weitere Versuche mittels Neubauer Zählkammer ausgezählt, weiter kultiviert oder zur Konservierung eingefroren werden. Zum Einfrieren wurden die Zellen im selbigen Medium, in dem sie kultiviert wurden, plus 5 %-igen DMSO eingefroren. Die Zellsuspension wurde dabei in einem 15 ml-Röhrchen für 10 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert, das Medium abgesaugt und das Zellsediment in das entsprechende Medium mit 5 %-igen Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert. Das DMSO dient

dabei der Reduktion von Zellschäden die durch Ausbildung von Wasserkristallen entstehen können. Diese Suspension wurde danach in Kryoröhrchen aliquotiert und über Nacht in einem dafür vorgesehenen „Freezing- Behälter“ bei – 80°C mit dem Einfriermedium langsam eingefroren. Kühlt man die Zellen hierbei zu rasch runter besteht die Gefahr, dass sie zerstört werden. Am nächsten Tag wurden die Zellen zur dauerhaften Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte durch Inkubation der Kryoröhrchen bei 37°C im Wasserbad. Am Folgetag wurde sodann ein Mediumwechsel durchgeführt, der bereits denaturierte Zellen und Rückstände des DMSO entfernt.

4. Ergebnisse

4.1. Patientenkollektiv, Performance-Status und initiale Ausprägung des Prostatakarzinoms

Die Arbeit umfasst 30 männliche Patienten mit einem Durchschnittsalter von 70 Jahren bei Therapiebeginn (range 50 - 85 Jahre). Von den 30 Patienten waren 2 Patienten nach Therapieversagen und Therapiewechsel zweimal einbezogen worden. Die 30 Patienten verteilen auf vier Therapiegruppen: Abi (n = 1), Caba (n = 4), Doce (n = 12) und Enza (n = 13). Hierbei ist in der großen Therapiegruppe um Enzalutamid gesondert zu beachten, dass hier 6 der 13 Patienten zuvor eine Chemotherapie erhalten hatten. Medianes Alter in der Enzalutamid-Gruppe beträgt 73 Jahren und in der Docetaxel-Gruppe 69 Jahre. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass 2 der 12 Patienten unter Doce bei mCSPC nach dem CHAARTED Protokoll therapiert wurden.

Der Allgemeinzustand der Patienten wurde prätherapeutisch mittels Karnofsky-Index ermittelt (range 50 - 100 %). Außer bei zwei Patienten lag von jedem eine histopathologische Einordnung des PCa im Sinne des Gleason-Scores vor. Dabei zeigte sich ein Gleason-Score von > 8 über alle Therapiegruppen hinweg.

4.1.1. Vortherapie in kurativer Intention (Radiatio oder rPx)

Die prozentuale Verteilung zeigt bei 33 % eine operative Vortherapie (rPx), bei 10 % eine alleinige Radiatio der Prostataloge, bei 47 % keine der beiden Vortherapien und

bei 10 % waren sowohl eine rPx, als auch eine lokale Bestrahlung der Prostataloge erfolgt.

4.1.2. Intervall bis Diagnose eines CRPC

Das Zeitintervall von Beginn der Tumorerkrankung bis Erstdiagnose eines CRPC bzw. die Dauer von Beginn der antiandrogenen Therapie bis Konversion zu einem CRPC verhielten sich wie in Abb.10 abgebildet. Für die Berechnung wurden 3 Patienten ausgeschlossen. Die mediane Dauer von der Prostatakarzinomerstdiagnose bis zum Stadium des CRPC betrug damit über alle Therapiegruppen hinweg 45,2 Monate (Caba: 32 Monate, Doce: 25 Monate, Abi: 78 Monate, Enza post Chemotherapie: 50 Monate, Enza prä Chemotherapie: 70 Monate, Enza gesamt: 61 Monate).

Betrachtet man das Intervall von Beginn der ADT bis Diagnose eines CRPC so zeigte sich hier eine mediane Therapiedauer mit ADT im kastrationssensiblen Stadium von 37,9 Monaten (Caba: 31 Monate, Doce: 20 Monate, Abi: 77 Monate, Enza post Chemotherapie: 44 Monate, Enza prä Chemotherapie: 56 Monate, Enza gesamt: 50 Monate) (Abb.10).

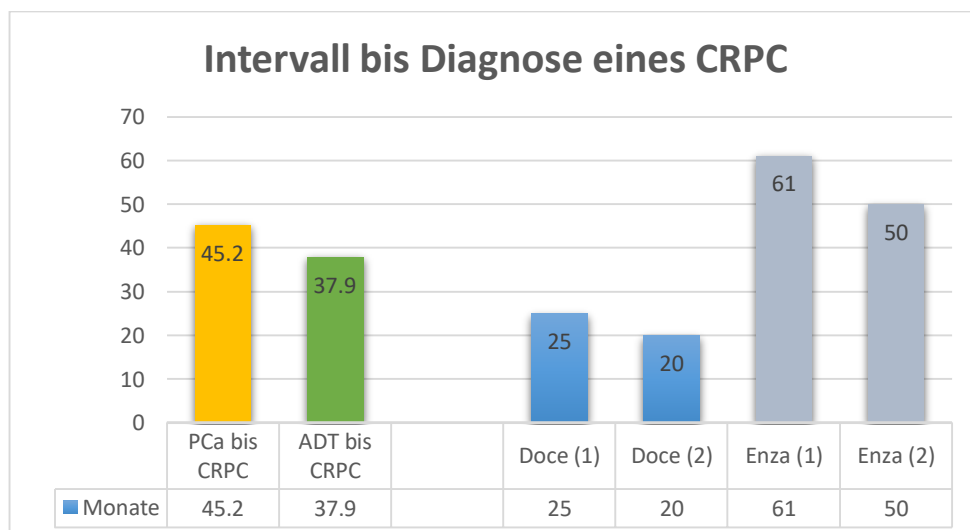


Abb. 10: Mediane Dauer von 45,2 Monaten von Diagnose eines PCa bis zur Diagnose eines CRPCs bei einer Therapiedauer mit antiandrogener Therapie im kastrationssensiblen Stadium von 37,9 Monaten über alle Therapiegruppen hinweg. Ziffer (1) steht für das Intervall von ED PCa bis ED eines CRPC bzw. Ziffer (2) steht für das Intervall der ADT Therapie bis Therapieversagen in den jeweiligen Therapiearmen Enza und Doce.

4.2. Spezifische Merkmale der Therapiegruppen

4.2.1. Die Patientenkohorte Abirateron

Ein Therapiewechsel auf eine 1st-line Therapie Abi wurde in unserer Studie bei einem Patienten durchgeführt. Dieser hatte ein Gleason 7 PCa nach rPx mit primärer Diagnose im Mai 2008 und eine ADT über 77 Monate hinweg. Eine Metastasierung lag zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme ossär und lymphogen vor.

4.2.2. Die Patientenkohorte Enzalutamid

Die Therapiegruppe um Enzalutamid umfasste 13 Patienten von welchen 6 Patienten bereits mit einer Chemotherapie vortherapiert waren. Hier waren alle mit Doce und ein Patient zusätzlich bereits mit Caba therapiert worden. Betrachtet man die komplette Enzalutamid-Gruppe waren bereits 8 Patienten (= 61 %) mit Abi therapiert worden. Zudem durchliefen drei der dreizehn Patienten eine Ketoconazol-Therapie. Der Gleason-Score lag im Mittel bei > 8 bei einem Karnofsky-Index von > 70 %. Ein Metastisierungsmuster zeigte sich dabei ossär bei 83 %, lymphogen 66,7 % und viszeral bei 25 % der Patienten. Das Therapieversagen der ADT trat im Mittel nach 50 Monaten ein.

4.2.3. Die Patientenkohorte Docetaxel

Eine Applikation mit Doce erfuhren in unserer Studie 12 Patienten, wovon 4 eine dosisreduzierte Variante mit 50 mg/m² und den restlichen 8 die maximale Dosierung von 75 mg/m² zugeführt wurde. Zwei der Patienten zeigten kein Stadium eines CRPC, sondern befanden sich im Stadium des primär metastasierten CSPC. Der Gleason-Score betrug > 8 bei einem mittleren Performancestatus (>70 % nach Karnofsky). 92 % der Patienten waren bei Therapiebeginn bereits ossär, 58 % lymphogen und ein Patient (8 %) viszeral metastasiert. Betrachtet man nur die Patienten im CPRC waren hier 70 % (7 von 10) mit Abi und einer dieser sieben Patienten zusätzlich mit Enzalutamid therapiert worden. Das Therapieversagen der ADT trat im Mittel nach 20 Monaten ein.

4.2.4. Die Patientenkohorte Cabazitaxel

Eine Applikation von Caba mit einer Dosierung von 20 kg/m² bzw. 25 kg/m² wurde hier bei jeweils 2 Patienten durchgeführt. Insgesamt zeigte sich bei der Chemotherapiegruppe um Caba, welche ausschließlich Doce-Versagern vorbehalten war, mit dem Einschluss von 4 Patienten ein Gleason-Score von > 8 bei einem Karnofsky-Index von > 70 %. Alle Patienten waren bereits ossär, die Hälfte lymphogen und einer viszeral metastasiert. Das Therapieversagen der ADT und somit die Konversion zum CRPC trat hier im Mittel nach 31 Monaten ein.

4.2.5. Prätherapeutisches Metastasierungsmuster der Patientenkohorte

In unserer Kohorte zeigte sich eine Metastasierung mit 26 ossären, 18 nodalen und 5 viszeralen Filiae (Abb. 11).

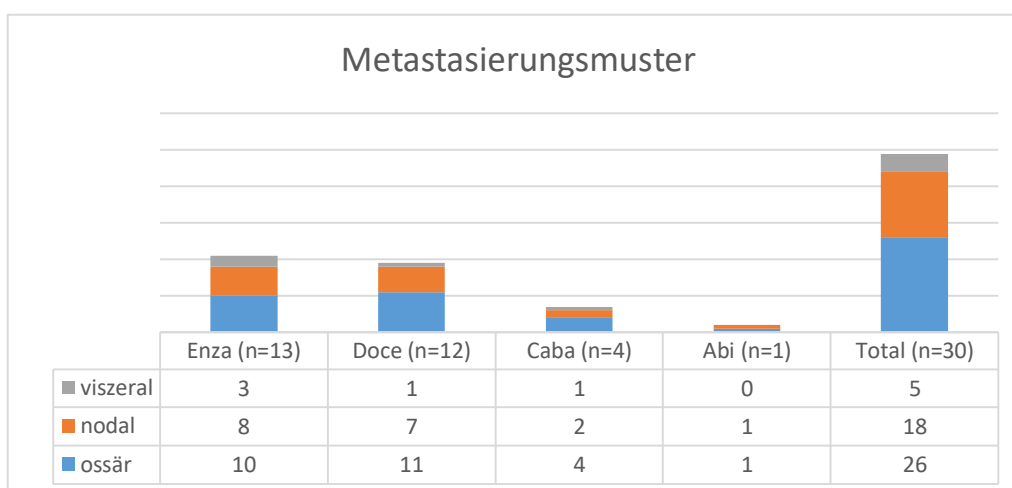


Abb. 11: Tumorlast der gesamten Kohorte und der Therapiegruppen

4.3. Biochemischer und radiologischer Verlauf unter Therapie bei CRPC

Im Rahmen der routinemäßigen Vorstellung im UCT wurden nach Initiierung des neuen Therapieregimes neben der Evaluation der klinischen Situation mit Beurteilung u.a. des Allgemeinzustandes, der Schmerzsymptomatik, Fatigue, neurologische Auffälligkeiten, etc. zur Quantifizierung des Therapieerfolges die laborchemische Verlaufskontrolle an Hand des PSA-Wertes und der bildgebenden

Diagnostik durchgeführt. Bei 22 der 30 Patienten wurde zudem prätherapeutisch erneut eine laborchemische Testosteronbestimmung durchgeführt. Der Testosteronwert war in unserer Studie bei allen 22 Patienten suffizient supprimiert (range 1 bis 27 ng/dl).

4.3.1. Betrachtung des PSA-Nadir und der PSA-Remission/Rezidiv unter Therapie

In Abhängigkeit vom prätherapeutischen Ausgangswert bis zum Erreichen des PSA-Nadirs unter neuem Therapieregime wurde ein gutes PSA-Ansprechen bei einem Abfall um $\geq 50\%$ als eine partielle PSA-Remission definiert. Zudem wurde das Intervall bis zum PSA-Nadir, als auch bis zum PSA-Progress festgehalten (Abb.12).

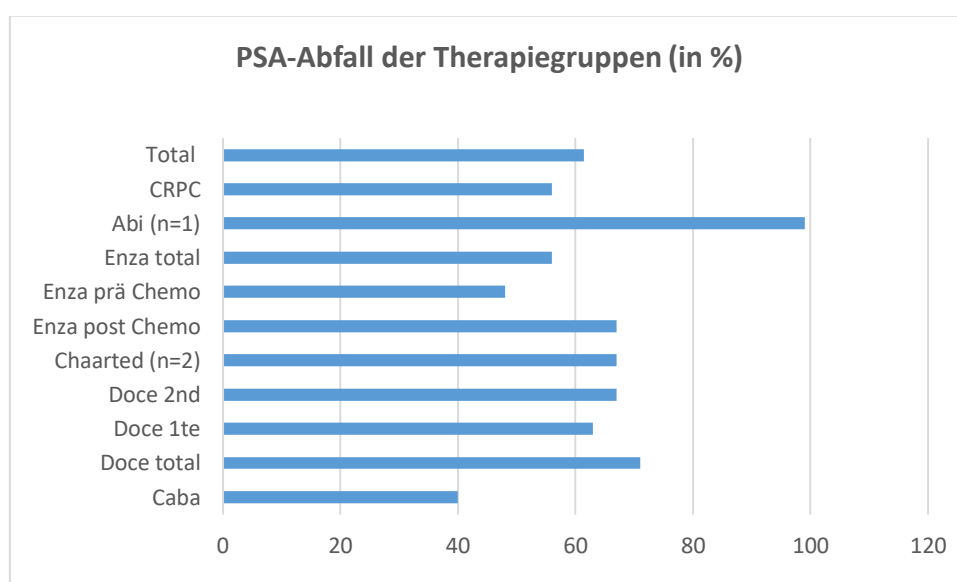


Abb. 12: Prozentualer Abfall des PSAs auf den Nadir nach Therapiebeginn bezogen auf die jeweiligen Therapiegruppen.

4.3.1.1. Betrachtung der PSA-Remission und des PSA-Rezidiv in Abhängigkeit der Therapiegruppen

Biochemischer Verlauf in der Therapiegruppe um Cabazitaxel (Abb.13)

Bei Betrachtung des biochemischen Verlaufs wurde nach der o.g. Definition ein regelrechtes PSA-Ansprechen im Sinne einer partiellen PSA-Remission nur bei einem der vier Patienten beobachtet. Dieser Patient profitierte jedoch mit einem biochemischen Rezidiv am 361 d nach Initiierung der taxanbasierten Chemotherapie. Bei hohem Ausgangswert des PSA mit >4500 ng/ml war ein Abfall dessen um 86 % bis auf 632 ng/ml ersichtlich (Abb.13). Insgesamt wies diese Gruppe, deren Patienten alle bereits Doce erhalten hatten, einen prozentualen PSA-Abfall unter Caba mit 40 % (range 3,4 % - 86 %) des prätherapeutischen Ausgangswertes bei einem zeitlichen Intervall ohne biochemisches Rezidiv von durchschnittlich 145 d (range 70 – 361 d) auf.

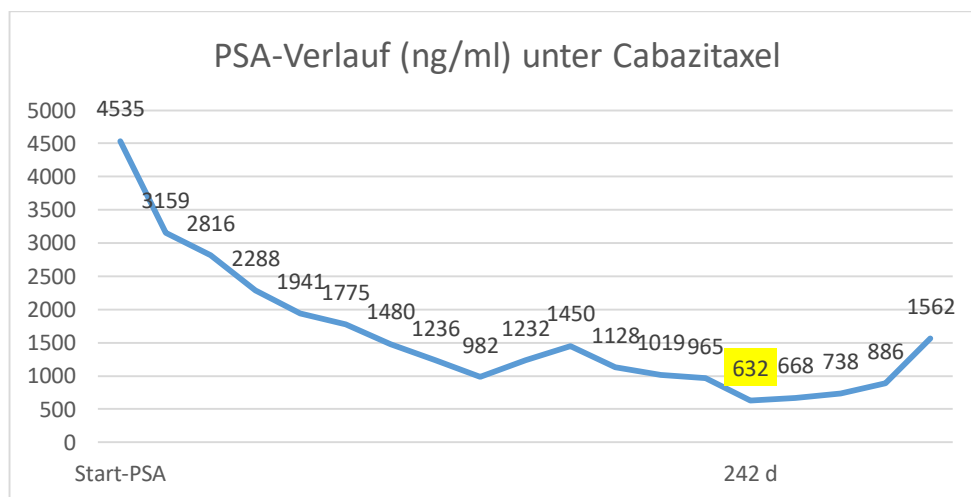


Abb. 13: PSA-Verlauf bei einem Patienten mit gutem Ansprechen auf Caba bei ossär metastasierten PCa nach Vortherapien mit Doce und Enza. Der PSA-Nadir (gelb) wurde nach 242 d bei einem prozentualen Abfall des PSA-Wertes von insgesamt 86 % erreicht.

Biochemischer Verlauf in der Therapiegruppe um Docetaxel (Abb.14)

Eine partielle biochemische Remission unter Doce bei einer Dosierung von entweder 50 oder 75 kg/m² weekly oder alle drei Wochen war hier bei 9 der 12 Patienten zu sehen. Nur einer der Patienten hatte zuvor eine taxanbasierte Therapie erhalten. Insgesamt zeigte sich mit einem durchschnittlichen prozentualen PSA-Abfall von 70 % (range 35 - 91 %) über alle Patienten hinweg ein starkes Ansprechen auf die Suppression der PSA-Expression. Der PSA-Nadir stellte sich dabei frühestens am 70 d, spätestens am 188 d und durchschnittlich am 119,5 d nach Therapiebeginn ein.

Ein biochemischer Progress zeigte sich im Mittel nach 315 d. Schließt man die beiden Patienten mit mCSPC reduzierte sich das Intervall bis zum biochemischen Rezidiv auf 224 d, um trotzdem bzgl. der Wirkdauer hinsichtlich einer adäquaten PSA-Suppression Caba (145 d) überlegen zu sein. Die beiden Patienten mit mCSPC hatten trotz unterschiedlichen initialen PSA-Ansprechens mit einem PSA-Nadir von 40 % bzw. 94 % ein beinahe identes biochemisches progressionsfreies Intervall von 763 d bzw. 772 d.

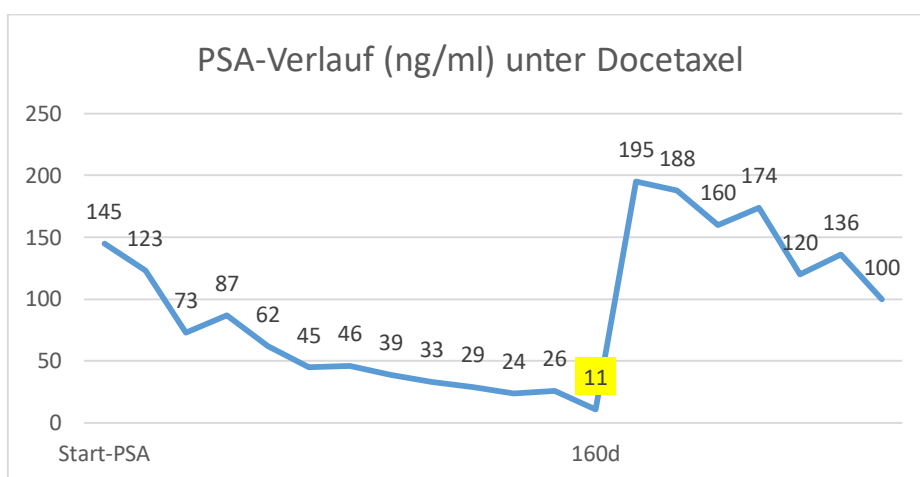


Abb. 14: PSA-Verlauf bei einem Patienten mit gutem Ansprechen auf Doce bei ossär und lymphogen metastasierten PCa nach Vortherapien mit Abi und Enza. Der PSA-Nadir (gelb) wurde nach 160 d bei einem prozentualen Abfall des PSA-Wertes von 91,5 % erreicht. Hiernach stellte sich ein biochemisches Rezidiv mit raschem PSA-Anstieg ein, welcher der Beginn mit Docetaxel-Rechallenge folgt.

Biochemischer Verlauf in der Therapiegruppe um Enzalutamid (Abb.15)

Bei der Differenzierung der partiellen Remission zwischen den Patienten die mit Enzalutamid vor bzw. nach Chemotherapie behandelt wurden zeigte sich in der post-chemotherapeutischen Gruppe exklusive eines Patienten der einen Progress des PSA-Wertes von 3,1 % aufwies, ein Abfall des PSA-Wertes um insgesamt 67 % (range 0 % - 99 %), wobei vier der sechs Patienten eine partielle biochemische Remission erreichten. Der PSA-Nadir trat dabei nach 129 d und ein biochemischer Progress nach 286,5 d ein.

In der Chemotherapie-naiven Gruppe, zeigten drei der sieben Patienten eine partielle PSA-Remission, wobei ein Patient einen PSA-Anstieg unter Enzalutamid um 27 % des Ausgangs-PSA-Wertes aufwies. Im Mittel war dabei ein PSA-Abfall von 48 % (range 16,7 % bis 98 %) ersichtlich. Der PSA-Nadir wurde im Median mit 108 d und das biochemische Rezidiv mit 198 d erfasst.

Legt man beide Gruppen zusammen zeigten unabhängig von einer taxanbasierten Vortherapie 7 der 13 Patienten eine partielle biochemische Remission und 2 der Patienten unter Enzalutamid ein direkten PSA-Progress. Der prozentuale PSA-Abfall wurde mit 56 %, das Erreichen des PSA-Nadirs mit 117,5 d und ein biochemisches Rezidiv mit 242 d erfasst.

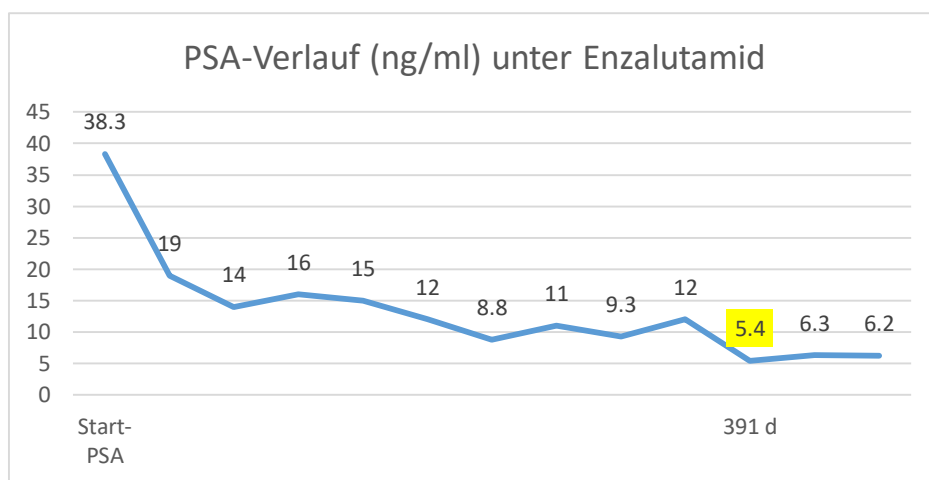


Abb. 15: PSA-Verlauf bei einem Patienten mit gutem Ansprechen auf Enzalutamid bei lymphogen metastasierten PCa nach Vortherapien mit Doce und Abi. Der PSA-Nadir (gelb) wurde nach 391 d bei einem prozentualen Abfall des PSA-Wertes von 86 % erreicht.

Biochemischer Verlauf in der Therapiegruppe um Abirateron (Abb.16)

Hier zeigte sich bei dem Patienten unter 1st-line Therapie Abi das PSA-Nadir am 406 d mit einem prozentualen PSA-Abfall von 99 % und einem biochemischen Rezidiv nach 913 d.

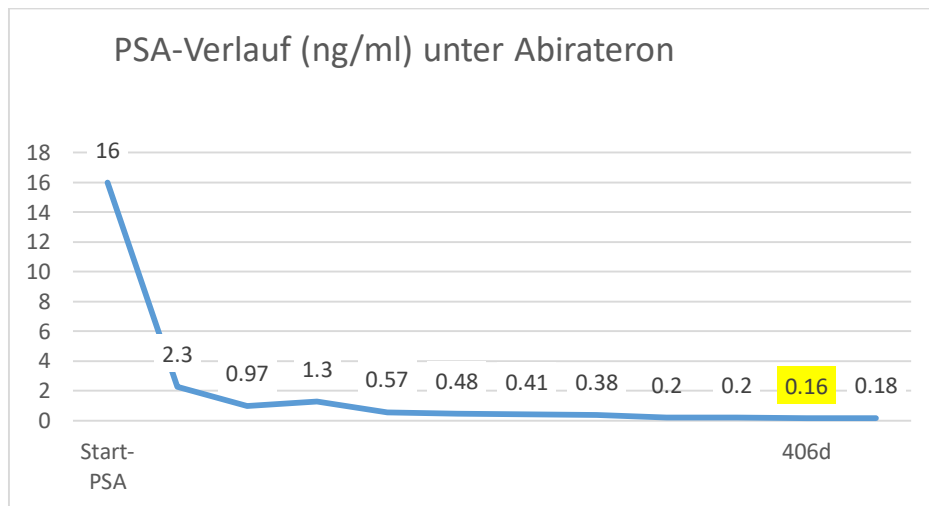


Abb. 16: PSA-Verlauf bei einem Patienten mit gutem Ansprechen auf Abi bei ossär und lymphogen metastasierten PCa ohne Vortherapien. Der PSA-Nadir (gelb) wurde nach 406 d bei einem prozentualen Abfall des PSA-Wertes von 99 % erreicht.

4.3.2. Bildmorphologische Kontrolle des Therapieerfolges

Bei 3 der 30 Patienten war keine suffiziente Aussage bzgl. des bildmorphologischen Verlaufs möglich. Zudem zeigte sich bei einem Patienten mit lymphogen metastasierten PCa unter Enzalutamid in der bildmorphologischen Überwachung kein Anhalt einer Progression über den Studienverlauf hinweg, sodass für die Berechnung der radiologischen Progressionsfreiheit das Erreichen des PSA-Nadirs als Zeichen der bis dahin verifizierten Rezidivfreiheit angenommen wurde. Ein radiologisches Rezidiv trat über alle Therapiegruppen hinweg im Mittel nach 283 d ein (Abb. 17).

4.3.2.1. Radiologisches Follow-up bezogen auf die jeweiligen Therapiegruppen

Radiologischer Verlauf unter Cabazitaxel (Abb.17)

Alle vier Patienten unterliefen einer routinemäßigen radiologischen Bildkontrolle in welcher eine bildmorphologische Progression nach 141,5 d (range 129 - 156 d) im Median diagnostiziert wurde.

Radiologischer Verlauf unter Docetaxel (Abb.17)

Hier zeigte sich bei 10 von 12 Patienten ein radiologischer Progress im Mittel nach 237,5 d exklusive der beiden Patienten im Stadium des mCSPC. Hier zeigt sich bei 1 von 2 Patienten mit mCSPC ein radiologischer Progress nach 750 d.

Radiologischer Verlauf unter Enzalutamid (Abb.17)

3 der 13 Patienten wurden bei der Berechnung der mittleren radiologischen Progressionsfreiheit ausgeschlossen. Resultierend daraus ergeben sich für die Patienten mit taxanbasierter Vortherapie eine radiologische Progression nach 226 d bzw. in der Chemotherapie-naiven Gruppe nach 215 d. Führt man die beiden Subgruppen zusammen wurde ein radiologischer Progress unter Enzalutamid nach 225 d dokumentiert.

Radiologischer Verlauf unter Abirateron (Abb.17)

Der Patient zeigt ein radiologisches Rezidiv nach 1232 d.

4.3.3. Vergleich des biochemischen und radiologischen Ansprechens unter Therapie

Beim Vergleich des radiologischen und biochemischen Progresses wurden die 30 Patienten in zwölf Subgruppen unterteilt (Abb.17). Der Aufschlüsselung der bekannten Subgruppen um Caba, Doce, Enza (post bzw. prä Chemotherapie) und Abi wurde noch eine weitere Differenzierung hinzugefügt. Hierbei wurde innerhalb der Patienten unter Doce, zwischen Therapie-naiven sprich 1st-line Therapie und 2nd-line Therapie unterschieden. Weiterhin erfolgte die gesonderte Begutachtung der Patienten im Stadium des mCSPC, sowie die Gesamtbeurteilung aller Studienpatienten im Stadium CRPC, aller Patienten die sich einer 1st-line Therapie, sowie die Patienten die sich mindestens einer der 2nd-line Therapie unterzogen und abschließend aller Patienten unabhängig der applizierten Therapieregime.

Gegenüberstellung des PSA-Nadirs (Abb.17):

Bei der Betrachtung des zeitlichen Intervalls bis zum Erreichen des PSA-Nadirs unabhängig vom Erreichen einer biochemischen partiellen Remission zeigt sich eine mediane Dauer von 129 d über alle Therapiegruppen hinweg (range 104 – 406 d). Beim Vergleich beider Chemotherapiegruppen ist dabei keine Differenz zur

erkennen. Innerhalb der beiden Subgruppen von Doce zeigt sich hingegen ein rascheres Abfallen (104 zu 158 d) des PSAs in der Therapie-naiven Gruppe (Doce 1st-line; n=3), welche Doce in der 1st-line erhalten hatten. Ident hierzu ist ein rasches Absinken auf den PSA-Nadir nach 109 d bei beiden Patienten mit primär metastasierten CSPC zu verbuchen. Die Patienten um Enza weisen ebenso einen zügigeren Abfall in den Chemotherapie-naiven Gruppen mit 108 d zu 129 d auf. Bei dem Patienten unter Abi stellte sich das PSA-Nadir nach 406 d ein und weist damit neben einem Therapie-naiven Patienten (isoliert lymphogene Metastasierung) der Enzalutamid-Gruppe mit Erreichung des PSA-Nadirs nach 510 d die längste Periode auf. Stellt man die Dauer bis zum PSA-Nadir aller Patienten mit CRPC den Patienten gegenüber welche bereits eine oder mehrere Therapieformen im Stadium des CRPC bekommen hatten, zeigt sich ein rascherer Abfall des PSAs auf den Nadir bei den vortherapierten Patienten (107,5 d zu 131 d). Das Erreichen des PSA-Nadirs in den Gruppen Caba, Doce und Enza war mit 122, 121 und 117,5 d trotz multipler Vortherapien fast identisch.

Gegenüberstellung des biochemischen Progresses (Abb.17):

Hier zeigt sich eine Progressionsfreiheit über alle Gruppen hinweg bei 274 d (range 145 – 913 d). Das früheste Rezidiv stellte sich bei den Patienten mit Caba nach 145 ein. Die Gruppe um Doce zeigt hingegen ein zeitigeres Rezidiv mit 174 d zu 246 d in der Therapie-naiven Gruppe im Vergleich zu vortherapierten Docetaxel-Gruppe. Ebenso wurde bei der Gruppe um Enza mit einem Vorteil für die vortherapierte Gruppe mit 286,5 d zu 198 d. Die längste biochemische Rezidivfreiheit wurde bei den Patienten mit primär metastasierten CSPC mit 767,5 d und bei dem Patienten unter Abi mit 913 d dokumentiert.

Auffällig ist ein minimaler Vorteil hinsichtlich der biochemischen Rezidivfreiheit in der Gruppe um Enza mit 242 d zu 224 d gegenüber Doce, wobei beide Therapieregime gegenüber Caba mit 145 d deutlich überlegen sind. Abschließend zeigt sich lediglich eine Diskrepanz zwischen allen Patienten in der 1st-line und den Patienten unter 2nd- oder 3rd-line Therapie mit 335 d zu 220 d.

Gegenüberstellung des radiologischen Progresses (Abb.17):

Bei Begutachtung der Dauer bis zum Auftreten eines radiologischen Progresses ist über alle Therapiegruppen die Sicherung eines radiologischen Rezidivs nach 283 d

erfasst worden (range 141,5 – 1232 d), wobei das früheste Rezidiv auch hier in der Subgruppe um Caba dokumentiert wurde. Das längste Intervall zeigte sich bei dem Patienten unter Abi mit 1232 d, wobei bei der Einzelfallbetrachtung ein Patient der Therapie-naiven Subgruppe mit rein lymphogener Metastasierung unter Enza bis zum Abschluss der Studie kein radiologisches Rezidiv, wie auch biochemisches Rezidiv aufwies. Die Patienten der Subgruppen um Enza und Doce, sowie deren Untergliederung bildeten dabei keine wesentlichen Diskrepanzen ab (Doce: 237, 232, 248d; Enza: 225, 226, 215d). Bei einem der beiden Patienten mit primär metastasierten CSPC wurde das radiologische Rezidiv nach 750 d ermittelt. Abschließend ist Festzuhalten, dass der radiologische Progress bei allen Patienten mit Vortherapien mit 215 d zu 431 d früher Eintritt im Vergleich mit den Patienten der 1st-line Therapie.

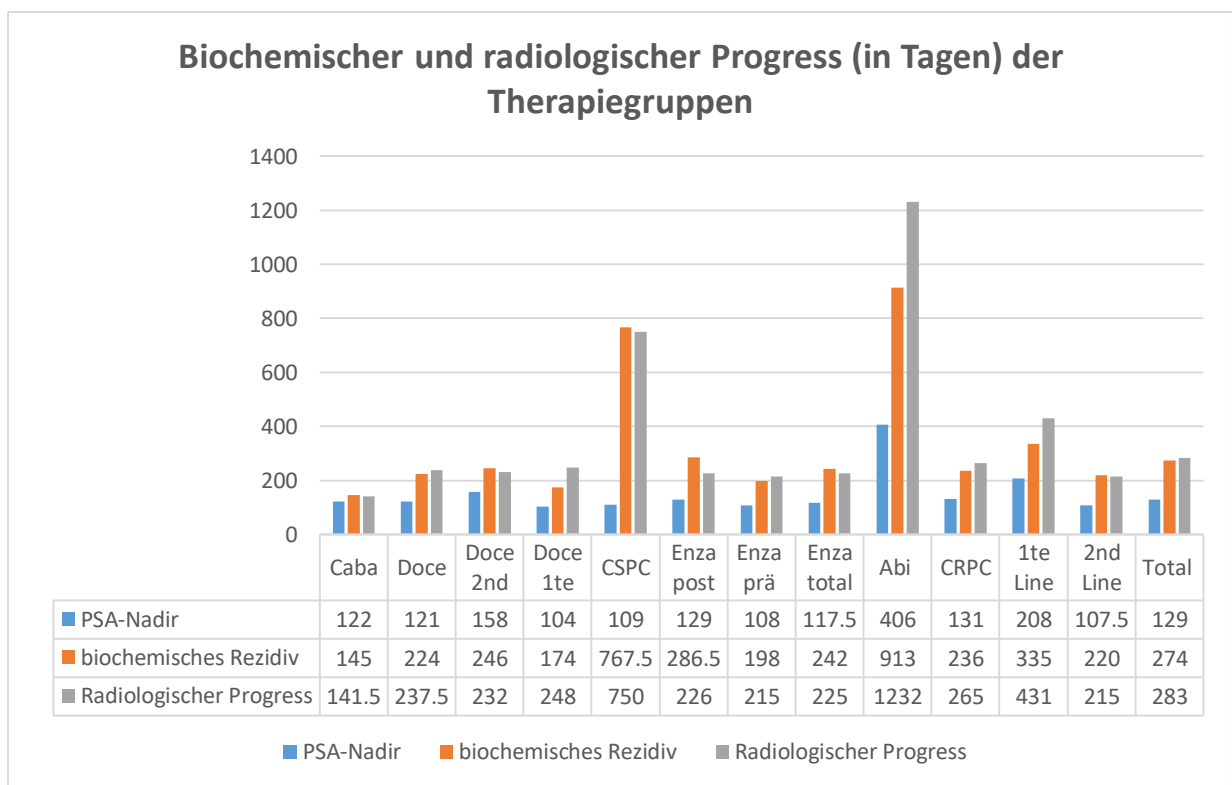


Abb. 17: Übersicht über die zeitlichen Intervalle (in Tagen) im Median nach Initiierung einer Therapie bis zum Erreichen des PSA-Nadirs bzw. bis zum biochemischen und radiologischen Progress (Caba; Doce; Doce 2nd=Doce nach First-Line- Therapie; Doce 1te=Doce als First-Line-Therapie; CSPC=metastasiertes kastrationssensibles PCa nach Chaarted-Protokoll (n=2); Enza post=Enzalutamid nach Chemotherapie; Enza prä=Enzalutamid vor Chemotherapie; Enza total=Enza prä + Enza post; Abi= Abirateron; CRPC=nur Patienten mit CRPC; 1te Line= 1st-line Therapie im Stadium CRPC; 2nd- Line=nur Patienten mit mindestens einer Vortherapien im Stadium CRPC; Total= alle Subgruppen).

4.4. Follow-up

Um eine geraume Vorstellung über die Überlebensrate zu erlangen, erfolgten die Beurteilung am 01.07.2018 und die letzte Kontrolle am 01.02.2019. Hierbei zeigt sich, dass über 26 Patienten Informationen bzgl. des Todes (Ja/Nein) ohne Kenntnis des genauen Todeszeitpunktes vorliegen. Schlussendlich verstarben während des Studienverlaufs vom 14.08.2014 bis zum 01.07.2018 (1417 d) 15 von 26 Patienten. Betrachtet man isoliert die Patienten mit CRPC (n = 9) zeigt sich eine mediane Überlebensdauer seit Diagnose des CRPC mit Abschluss der Dokumentation am 01.07.2018 von 1631 d (range 1157 – 2038 d) und eine mediane Überlebensdauer nach Beginn der jeweiligen Therapie in unserer Studie mit 1248 d (range 1138 – 1349 d) bei 37,5 % der Patienten. Bei 62,5 % der Patienten mit CRPC trat bis zum 01.07.2018 der Tod ein. Bei abschließender Betrachtung zum Zeitpunkt 01.02.2019 waren bereits 20 der 26 erfassten Patienten (= 76,9 %) verstorben.

4.5. Auswertung und Interpretation der immunhistochemischen Färbung

4.5.1. Antikörperverifizierung

Die Austestung des neu etablierten Antikörpers AR-V7 vor Färbung der Patientenproben und Verifizierung einer suffizienten AK-Reaktion wurde mittels Westernblot durchgeführt. In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Chargen des AR-V7 Antikörpers, wobei mittels der ersteren (AR-V7 „alt“) sich initial keine adäquate immunhistochemische Darstellung in einer Probefärbung an 22Rv1-Zellen demonstrierte, ein Westernblot zur AR-V7-AK-Testung der beiden Chargen an 22RV1-Zelllinien durchgeführt. Das Ergebnis zeigte eine Bandenhöhe bei 80 kDa mit abnehmender Intensität (Abb.18). Alle Banden waren sowohl bei der alten AK-Charge durch die höhere AK-Verdünnung schwächer. Das Ergebnis der β -Aktin Nachfärbung zeigte eine intensive, reproduzierbare Färbung, ohne Hintergrund mit gleichmäßiger Abbildung der Banden.

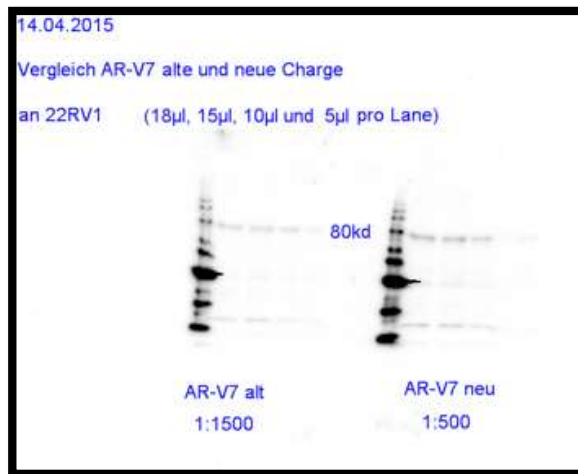


Abb. 18: Westernblot-Analyse zweier AR-V7 (alte Charge vs. Neue Charge) Antikörper in unterschiedlichen Verdünnungen (1:1500 und 1:500) an 22Rv1-Zellen mit Bandenhöhe bei 80 kDa.

4.5.2. Schematische Darstellung der Positiv-/Negativkontrollen der Zelllinie 22Rv1

Unter Stimulation mit DHT der 22Rv1-Zelllinie entwickelten wir ein Färbeschema, welches sodann für die Patientenproben angewendet werden konnte. Insgesamt zeigte sich hier bei Färbung der Zelllinie 22Rv1 eine kräftige und damit reproduzierbare rot bzw. braune Färbung, als Zeichen einer AR-V7- bzw. CK 8/18-Positivität (Abb.19). Die Positivkontrollen dienten zudem der Identifizierung von angefärbten CTCs der jeweiligen Färbereihe.

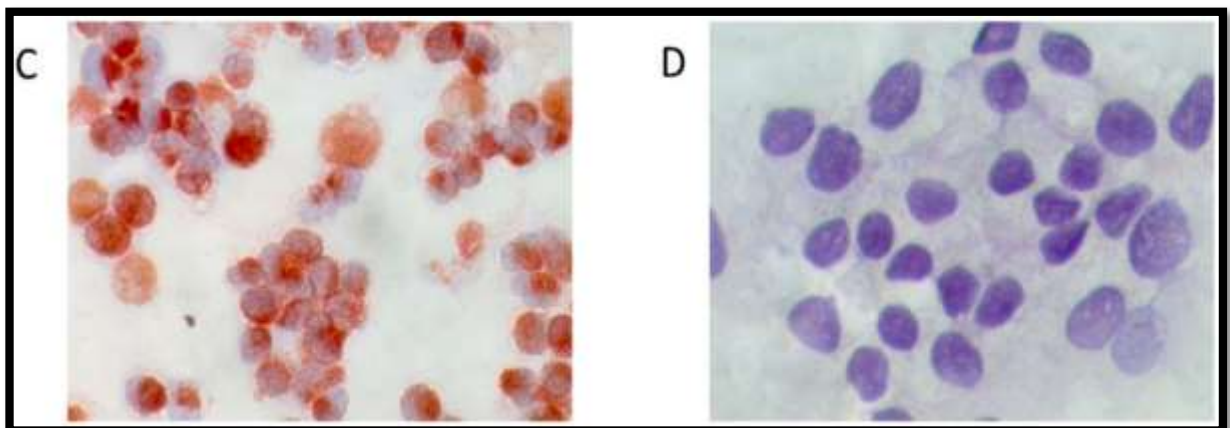


Abbildung 19: Positiv- und Negativkontrollen der 22Rv1-Zelllinien nach AR-V7/CK 8/18-AK-Färbung; C = Positivkontrolle mit Nachweis einer rot (AR-V7) und braunen (CK8/18) Färbung; D = keine AK-Reaktion bei fehlendem primär AK-Auftrag.

4.5.3. Evaluation der Blutentnahmen und Isolation der zirkulierenden Tumorzellen (CTC)

Die Blutentnahmen des Patientenkollektivs, die für eine CTC-Isolation notwendig waren, erfolgten mit Entnahme von 2 x 10ml Citrat-Blut vom 14.08.2014 bis zum 14.10.2015. Dabei wurden insgesamt 75 Blutproben entnommen. Dabei erfolgte bei 20 Patienten jeweils eine Blutprobe vor Therapiebeginn und zwei während der Therapie. Bei 5 Patienten lagen zum Ende der Arbeit 2 Blutproben und bei 4 Patienten lag ausschließlich die Blutprobe vor Therapiebeginn vor.

4.5.4. Objektträgergewinnung und immunhistochemische Färbung

In unserer Studie wurden die Zellen nach Isolation mittels OncoQuick und immunhistochemischer Färbung bewertet und von Hand ausgelesen. Dabei ergab sich in den angefärbten Blutentnahmen (n = 58) eine totale Anzahl an CTCs mit mindestens einer CK8/18 Positivität von ~ 1132 CTCs (range 1 – 136 Zellen/BE) (Tab.6). 27 Proben wurden ohne positive immunhistochemische Reaktion der gefundenen Zellverbände als negativ für CK8/18 bewertet. Dabei waren bei 12 Blutproben gar keine Zellen zu finden. Hieraus resultierte eine durchschnittliche Detektionsrate von 19,5 CTC pro Blutentnahme. Stellte man die beiden Therapiegruppen der Chemotherapie (BE n = 35) vs. Antiandrogene (BE n = 23) gegenüber so zeigte sich eine Detektionsrate von 16,6 CTCs (Taxane) vs. 19,0 CTCs (Antiandrogene) pro Blutentnahme (Tab.6). Durch die immunhistochemische Analyse wurden abschließend in 31 von 58 Blutproben CTCs detektiert was einer prozentualen Detektionsrate von 53,44 % im Median entsprach.

Tab.6: Blutentnahme-Serien mit Bezug auf die jeweiligen Patienten untergliedert in die Therapiegruppen mit farblicher Darstellung eines CK 8/18- oder AR-V7-Expression (rot oder beige = keine CTC Positivität; gelb = positiv für AR-V7 bzw. CK8/18; weiß = nicht gefärbte Patientenproben). Die Zahlen in den Feldern geben die Anzahl der gefundenen Zellen auf den Objektträgern an.

Pat-Nr.	Serie 1	Serie2	Serie 3	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Tumorzellen
	CTC -1	CTC- 2	CTC- 3	AR V7-1	ARV7 -2	ARV7-3	
CABAZITAXELGRUPPE							
Nr.1	22	9	0	22	9	0	31
Nr.2	4	8	136	4	8	136	144
Nr.3	1	4	6	1	4	6	6
Nr.4	x			x			
DOCETAXELGRUPPE							

Nr.5	0	8	8	0	8	8	8
Nr.6	1	78	7	1	78	7	79
Nr.7	1	0	x	1	0	x	0
Nr.8	2	89	x	2	89	x	89
Nr.9	52	55	2	52	55	2	107
Nr.10	2	24	20	2	24	20	24
Nr.11	30	0		30	0		30
Nr.12	64	0	x	64	0	x	64
Nr.13	3	x	x	3	x	x	
Nr.14	123	x		123	x		
CHAARTED-Docetaxel bei mCSPC							
Nr.15	0	25		0	25		25
Nr.16	29	0		29	0		29
ENZA-POST-CHEMO							
Nr.17	22	65		22	65		87
Nr.18	0	0	0	0	0	0	0
Nr.19	0	36	x	0	36	x	36
Nr.20	120	8	x	120	8	x	120
Nr.21	70			70			70
Nr.22	136	x	x	136	x	x	0
ENZA-PRÄ-CHEMO							
Nr.23	27	24	x	27	24	x	27
Nr.24	34	4	x	34	4	x	0
Nr.25	9	0		9	0		9
Nr.26	35	x	x	35	x	x	35
Nr.27	18			18			0
Nr.28	3	x	x	3	x	x	0
Nr.29	x			x			
ABIRATERONE							
Nr.30	20	4	88	20	4	88	112

4.5.4.1. Beurteilung der CTC mit Detektion der CK8/18- und AR-V7-Expression

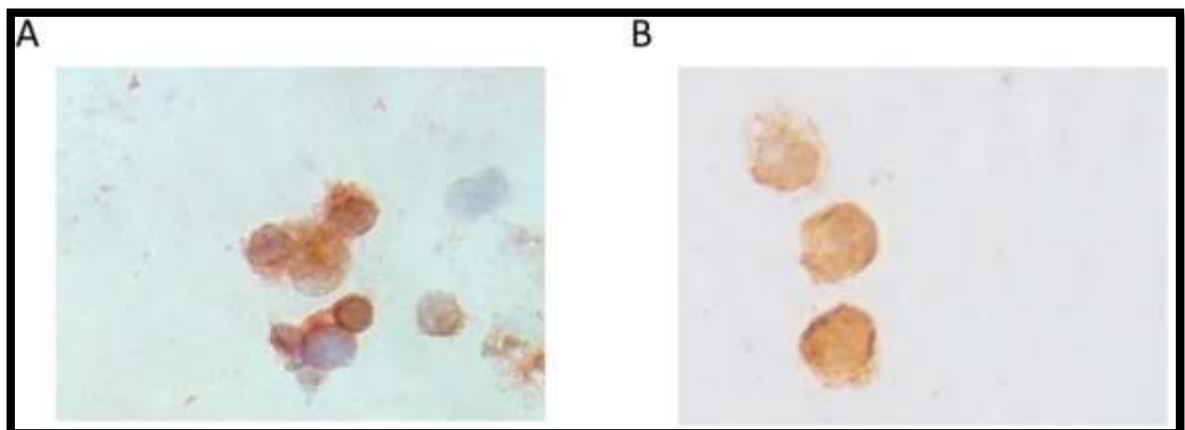


Abb. 20: CTCs der Patientenproben nach AR-V7/CK 8/18-AK-Färbung; A = positive CTC mit Nachweis einer rot (AR-V7) und braunen (CK8/18) Färbung; B = positive CTC mit Nachweis einer isolierten braunen (CK8/18) Färbung.

Die visuelle Analyse der Objektträger ergab nach mehrmaliger Durchsicht folgende Resultate. Die reinen CTCs stellten sich als CK8/18-positive Zellen braun (Abb.20, 22) und CK8/18+/AR-V7-positive als Zeichen des Nachweises des Androgenrezeptors AR-V7 stellten sich rot und braun dar (Abb.20, 21).



Abb. 21: Exemplarische CTCs von Patientenproben nach AR-V7/CK 8/18-AK-Färbung mit reproduzierbarem Nachweis einer rot (AR-V7) und braunen (CK8/18) Färbung.



Abb. 22: Exemplarische CTC von Patientenproben nach AR-V7/CK 8/18-AK-Färbung mit reproduzierbarem Nachweis einer braunen (CK8/18) Färbung.

Insgesamt wurden 28 der 30 Blutentnahmen vor Therapiebeginn auf Objektträger angefärbt. Hierbei zeigte sich bei 13 Patienten der Nachweis von CK 8/18, wovon bei 12 Patienten zudem der Nachweis einer AR-V7-Expression gesichtet wurde. Für die zweite Blutentnahme-Serie standen noch 21 auswertbare Objektträger zur Verfügung, wobei bei 11 Patienten ein CK 8/18- und bei 10 ein AR-V7-Nachweis gelang. In der dritten Blutentnahme-Serie unter Therapie standen nur noch 9 Patienten zur Verfügung. Hier zeigte sich ein immunhistochemischer Nachweis einer CK 8/18- und AR-V7-Expression der CTCs in 3 Blutproben.

4.6. Der AR-V7 Status in CTCs als Prognosefaktor und Entscheidungskriterium der Tumorthherapie beim CRPC

Basiskriterien der Beurteilung des Biomarkers AR-V7 in CTCs waren das biochemische und das radiologische Rezidiv in Korrelation mit dem jeweiligen AR-V7 Status. Schlussendlich wurden hierfür 26 Patienten der Gesamtkohorte eingeschlossen.

4.6.1. Prädiktiver Wert von AR-V7 positiven CTCs bei Patienten unter Behandlung mit Antiandrogenen oder taxanbasierter Chemotherapie

Bezogen auf alle Therapiegruppen detektierten wir bei 26 Patienten (6 pre-Chemo Enza, 6 post-Chemo Enza, 1 pre-Chemo Abi, 10 Doce, 3 second-line Caba) in 46,2 % der Patienten CTCs, wovon 91,7 % eine AR-V7 Positivität darboten (Tab.3).

Tab. 3: Kummulative Eigenschaften der Gesamtkohorte der Patienten mit CRPC.

Patientenanzahl	26
medianes Alter, Jahre	74,3 ± 9
Vorthherapie mit Abirateron o. Enzalutamid (%)	57,7
Vorbehandlung mit Docetaxel (%)	38,5
ossäre Metastasen (%)	84,6
nodale Metastasen (%)	65,4
viszerale Metastasen (%)	19,2
Nachweis CTCs (%)	46,2
AR-V7 positive CTCs (%)	91,7

Der Fischer's exact Test zeigte eine signifikante Korrelation ($p < 0,001$) zwischen dem Auffinden von CTC und einer damit einhergehenden AR-V7 Positivität. Hierbei differenzierten wir die Proben in eine CTC/AR-V7 negative und CTC/AR-V7 positive Gruppe (Fig.1).

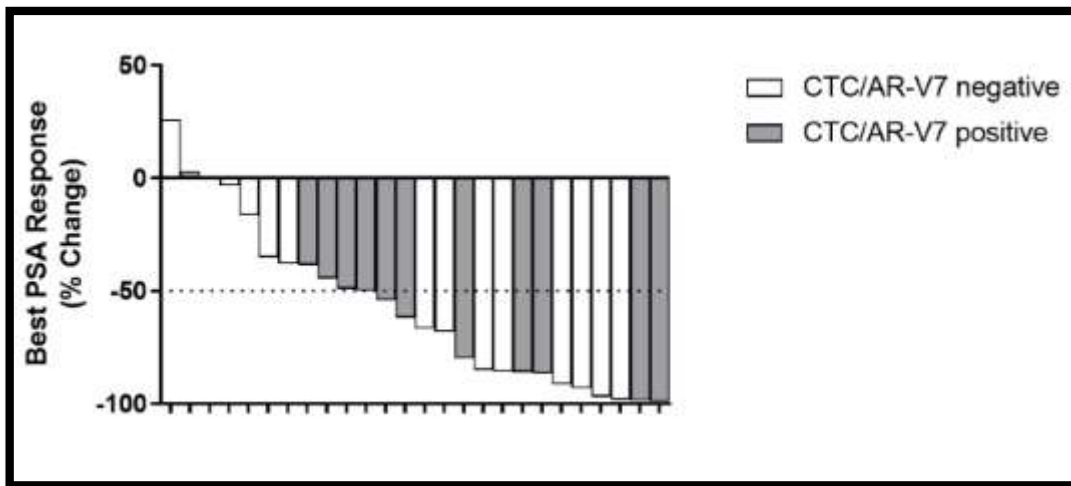


Figure 1: Waterfall-Plot der Gesamtkohorte mit Analyse des PSA-Ansprechens in Korrelation zur CTC/AR-V7 Positivität.

Die Antikörper-Spezifität wurde verifiziert durch das Mitführen einer 22Rv1-Zelllinie mit und ohne Antikörper gegen CK8/18 und AR-V7 im Sinne einer Negativ- und Positivkontrolle. Insgesamt zeigte sich über alle Therapiegruppen hinweg (n = 26) ein PSA-Ansprechen (Abfall $\geq 50\%$) auf die jeweilige Therapie in 57,14 % (8 von 14) bei CTC/AR-V7 negativen Patienten und 66,67 % (8 von 12) in CTC/AR-V7 positiven Patienten. Insgesamt wies die statistische Aufarbeitung der Proben keinen signifikanten Unterschied bzgl. des PSA-Abfalls unter Therapie zwischen der CTC/AR-V7 negativen und CTC/AR-V7 positiven Gruppe aus. Die durchschnittliche PSA-Reduktion zeigte sich dabei in beiden Gruppen mit 53,7 % (CTC/AR-V7 negativ) und 62,11 % (CTC/AR-V7 positiv) vergleichbar.

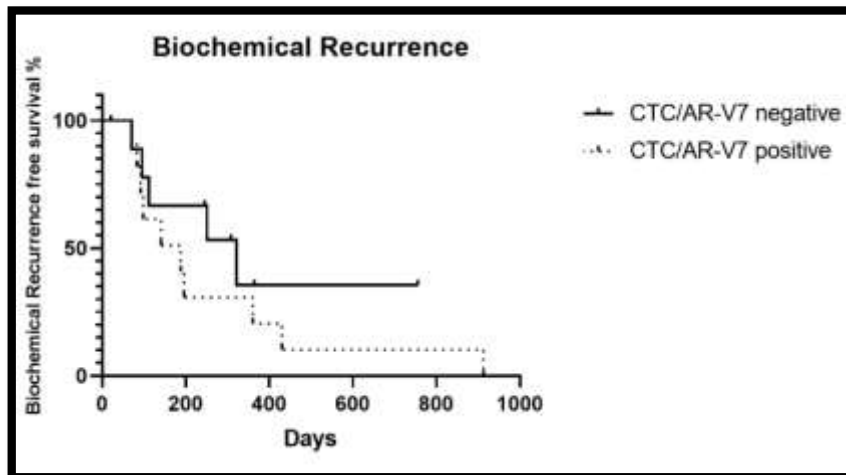


Figure 2: Kaplan-Meier-Schätzer zur Analyse eines biochemischen Rezidivs bezogen auf die Gesamtkohorte in Abhängigkeit der CTC/AR-V7 Positivität.

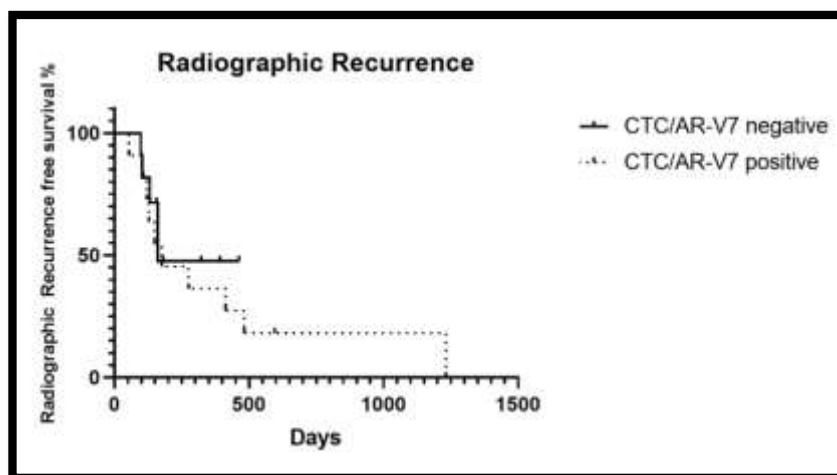


Figure 3: Kaplan-Meier-Schätzer zur Analyse eines radiologischen Rezidivs bezogen auf die Gesamtkohorte in Abhängigkeit der CTC/AR-V7 Positivität.

Weiterhin legte der Vergleich zwischen der CTC/AR-V7 negativen und CTC/AR-V7 positiven Gruppe bezogen auf das progressionsfreie Überleben (PFS) in Abhängigkeit zum biochemischen Rezidivs (Fig. 2) und radiologischen Rezidivs (Fig. 3) bei statistischer Ableitung via Kaplan Mayer Analyse keinen Unterschied in Abhängigkeit der Detektion von CTC/AR-V7 negativen und CTC/AR-V7 positiven Zellen offen.

4.6.2. Prädiktiver Wert von AR-V7 positiven CTCs bei Patienten unter Behandlung mit Antiandrogenen (Abirateron u. Enzalutamid)

Um eine Aussage bzgl. des prädiktiven Wertes des AR-V7 Status bezogen nur auf Patienten unter sekundärer antiandrogener Hormonmodulation treffen zu können, wurde diese Gruppe gesondert analysiert. Die charakteristische Ausgangslage dieser Gruppe ist in Tab. 4 zusammengefasst:

Tab. 4: Kummulative Eigenschaften der antiandrogenen Therapiegruppe (Enza und Abi).

	Alle	Enzalutamid post-Chemo	Enzalutamid pre-Chemo	Abirateron
Patientenanzahl	13	6	6	1
medianes Alter, Jahre	76,2 ± 7,9	75,0 ± 8,3	79,2 ± 6,9	66,0 ± 0
Vortherapie mit Abirateron o. Enzalutamid (%)	53,8	50	66,7	0
Vorbehandlung mit Docetaxel (%)	46,2	100	0	0
ossäre Metastasen (%)	76,9	83,3	66,7	100
nodale Metastasen (%)	69,2	23,1	38,5	100
viszerale Metastasen (%)	23,1	7,7	15,4	0
Nachweis CTCs (%)	53,8	50	50	100
AR-V7 positive CTCs (%)	85,7	66,7	100	100

In dieser Subgruppe waren 53,8 % der Patienten CTC-positiv, von welchen wiederum 57,14 % eine AR-V7 positive Färbung aufzeigten. Auch hier wurden die Subgruppe in eine CTC/AR-V7 positive und CTC/AR-V7 negative Population untergliedert (Tab.4).

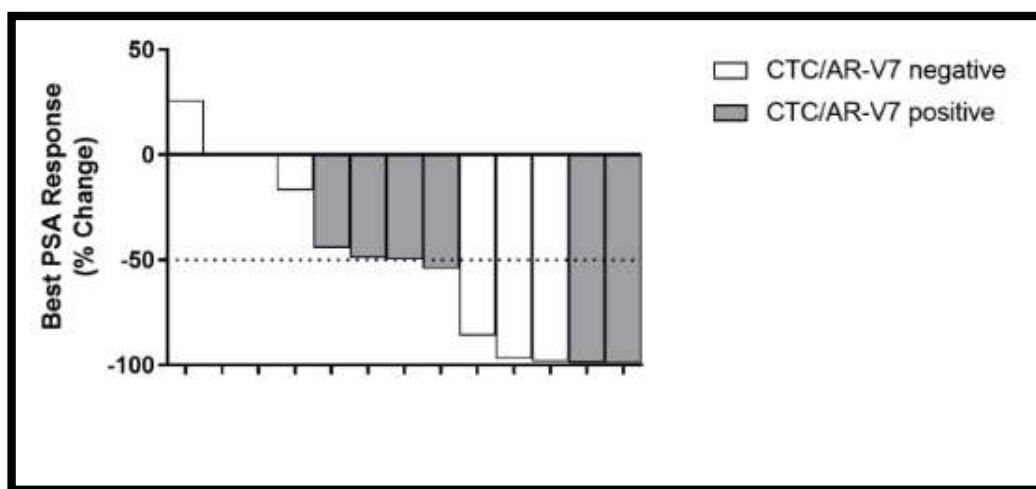


Figure 4: Waterfall-Plot der antiandrogenen Therapiegruppe mit Analyse des PSA-Ansprechens in Korrelation zur CTC/AR-V7 Positivität.

In dieser Kohorte (n = 13) wurde ein PSA-Ansprechen auf die jeweilige antiandrogene Therapie in 50,0 % (3 von 6) der Fälle bei den CTC/AR-V7 negativen Patienten und ein PSA-Ansprechen von 57,14 % (4 von 7) bei den CTC/AR-V7 positiven Patienten erfasst (Fig. 4).

Die ebenfalls durchgeführte statistische Probenanalyse ergab keinen signifikanten Unterschied bezüglich der PSA-Abfalles unter antiandrogener Therapie zwischen der CTC/AR-V7 negativen und CTC/AR-V7 positiven Subgruppe (Fig. 4). Die durchschnittliche PSA-Reduktion unter antiandrogener Therapie belief sich dabei auf 45,3 % in der CTC/AR-V7 negativen und 56,47 % in der CT/AR-V7 positiven Gruppe.

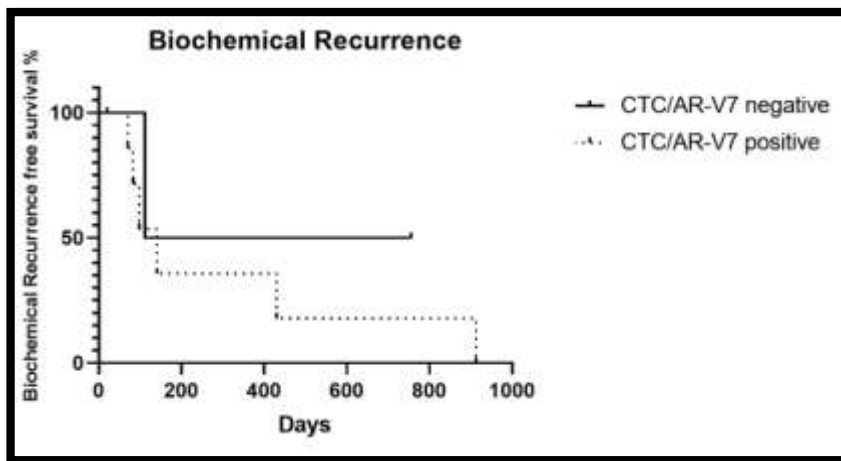


Figure 5: Kaplan-Meier-Schätzer zur Analyse eines biochemischen Rezidivs bezogen auf die antiandrogene Therapiegruppe in Abhängigkeit der CTC/AR-V7 Positivität.

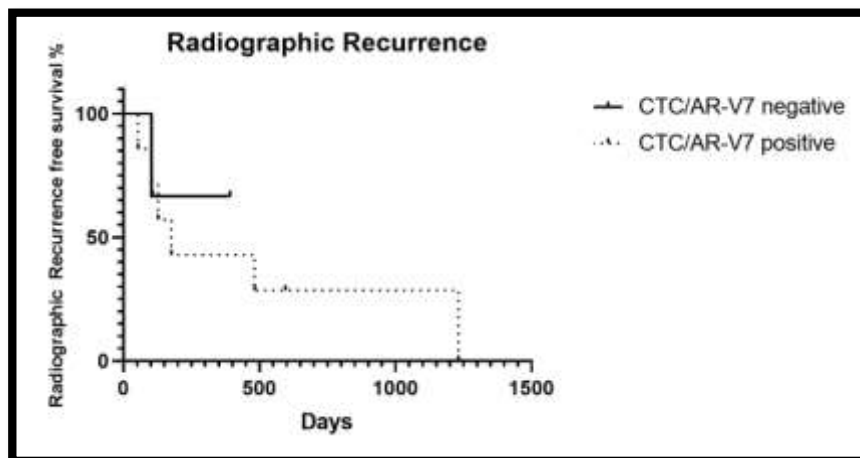


Figure 6: Kaplan-Meier-Schätzer zur Analyse eines radiologischen Rezidivs bezogen auf die antiandrogene Therapiegruppe in Abhängigkeit der CTC/AR-V7 Positivität.

Um abschließend eine Aussage bzgl. des PFS in Korrelation zum biochemischen (Fig. 5) und radiologischen Rezidiv (Fig. 6) unter antiandrogener Therapie in Abhängigkeit des AR-V7 Status treffen zu können, wurden auch hier die CTC/AR-V7 positive und negative Gruppe miteinander gegenübergestellt. Die Kaplan Mayer Analyse (Fig. 5, 6) offenbarte dabei keinen signifikanten Unterschied im rezidivfreien Überleben unabhängig von der Detektion CTC/AR-V7 positiver oder negativer Tumorzellen.

4.6.3. Prädiktiver Wert von AR-V7 positiven CTCs bei Patienten unter Behandlung mit taxanbasierter Chemotherapie (Docetaxel u. Cabazitaxel)

Um eine Aussage bzgl. des prädiktiven Wertes von AR-V7 bezogen auf Patienten unter taxanbasierter Chemotherapie treffen zu können, wurde diese Gruppe konkordant zur Subgruppe der antiandrogenen Therapie gesondert analysiert. Die charakteristische Ausgangslage dieser taxanbasierten Subgruppe ist in Tab. 5 zusammengefasst:

Tab. 5: Kummulative Eigenschaften der taxanbasierten Therapiegruppe (Doce und Caba).

	Alle	Docetaxel	Cabazitaxel
Patientenanzahl	13	10	3
medianes Alter, Jahre	72 ± 10	74 ± 10	68 ± 9
Vortherapie mit Abirateron o. Enzalutamid (%)	69,2	70	33,3
Vorbehandlung mit Docetaxel (%)	30,8	10	100
ossäre Metastasen (%)	92,3	90	100
nodale Metastasen (%)	61,5	70	33,3
viszerale Metastasen (%)	15,4	10	33,3
Nachweis CTCs (%)	38,5	40	33,3
AR-V7 positive CTCs (%)	100	100	100

Hier waren 37,5 % der Patienten CTC positiv, wovon 100% eine AR-V7 positive Färbung aufwiesen (Tab.5). Auch hier erfolgte zur weiteren Analyse eine Separation in eine CTC/AR-V7 positive und CTC/AR-V7 negative Population. Die taxanbasierte Kohorte (n = 13) zeigte dabei ein PSA-Ansprechen in 62,5 % (5 von 8) bei CTC/AR-V7 negativen und in 80 % bei den CTC/AR-V7 (4 von 5) positiven (Fig.7).

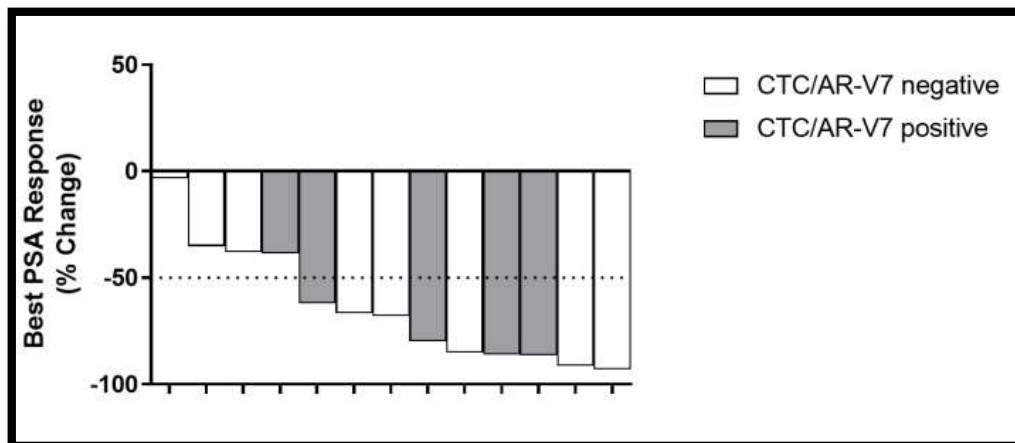


Figure 7: Waterfall-Plot der taxanbasierten Therapiegruppe (Doce und Caba) mit Analyse des PSA-Ansprechens in Korrelation zur CTC/AR-V7 Positivität.

In Übereinstimmung mit den bereits aufgezeigten Ergebnissen legte auch hier die statistische Analyse der Proben keinen Unterschied in der PSA-Reduktion unter taxanbasierter Therapie zwischen CTC/AR-V7 negativen und positiven dar. Die mediane PSA-Reduktion belief sich dabei auf 60,11 % in der CTC/AR-V7 negativen und 70,56 % in der CTC/AR-V7 positiven Gruppe.

Ebenso wurde das PFS basierend auf einem biochemischen (Fig. 8) oder radiologischen Rezidiv (Fig. 9) abgeleitet. Die Kaplan Mayer Analyse ergab dabei keinen signifikanten Unterschied im rezidivfreien Überleben.

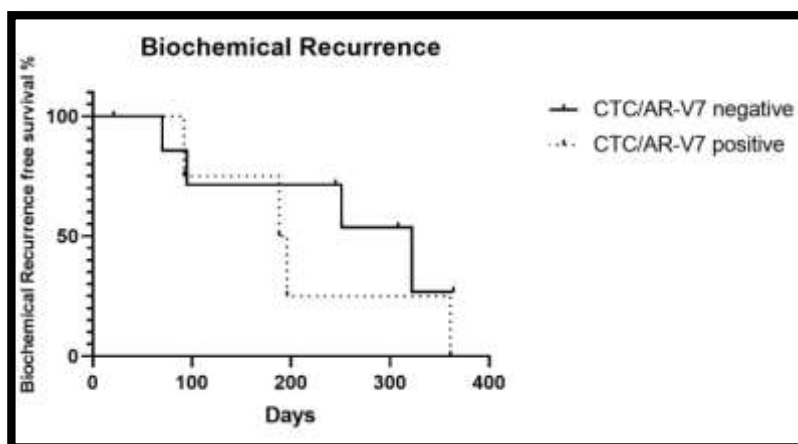


Figure 8: Kaplan-Meier-Schätzer zur Analyse eines biochemischen Rezidivs bezogen auf die taxanbasierte Therapiegruppe in Abhängigkeit der CTC/AR-V7 Positivität.

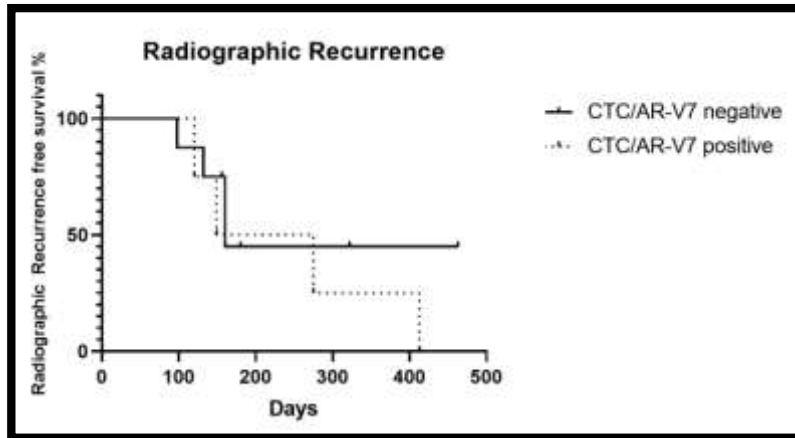


Figure 9: Kaplan-Meier-Schätzer zur Analyse eines radiologischen Rezidivs bezogen auf die taxanbasierte Therapiegruppe in Abhängigkeit der CTC/AR-V7 Positivität.

4.6.4. Beurteilung der Konversion der AR-V7 Positivität/Negativität unter Therapie als Prognosefaktor

Bei den meisten Patienten wurden Blutentnahme zur Detektion von CTCs bei Therapiebeginn und drei Monate nach Therapiebeginn durchgeführt. Bei 13 Patienten mit initialer CTC/AR-V7 positiver Ausgangssituation zeigte sich in 61,5 % (8 von 13) eine Konversion zu CTC/AR-V7 negativem Befund im Verlauf. Bei 38,5 % der Patienten sistierte der CTC/AR-V7 positive Ausgangsbefund. Die Konversion wurde dabei als Switch der Antikörper-Positivität/Negativität in Bezug auf die Ausgangssituation in der Erstentnahme vor Beginn der neuen Therapie definiert.

5. Diskussion

Die Androgenrezeptorachse spielt eine Schlüsselrolle in der Progression des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms. Entgegen der früheren Vermutung bleibt auch im Stadium des CRPC die Androgen-Rezeptor-Achse weiterhin der übergeordnete Energieträger des PCa. Die Ursachen hierfür werden insbesondere auf die de novo Androgen-Synthese, Co-Regulatoren des AR, AR-Mutationen und die Androgen-Rezeptor-Splicevariante AR-V7 (70, 174, 227) zurückgeführt. Zusätzlich ist auch von einer para-adrenergen Androgenrezeptor-Stimulation dem „*Non-Genomic Rapid Signaling*“ auszugehen (183, 184, 187). In der letzten Dekade wurden eine Vielzahl neuartiger medikamentöser Therapien entwickelt, die primär die AR-Testosteron-Achse ansteuern, wobei hier insbesondere der CYP17-Inhibitor Abi und das Zweitgenerations-Antiandrogen Enza in der täglichen Routine verwendet werden (129, 228). Allerdings weisen etwa 20 % der Patienten bereits in der 1st-line Therapie eine primäre Resistenz auf (206). Darüber hinaus wurde eine potenzielle Kreuzreaktion zwischen Abi und Enza beschrieben, welche eine mögliche sequenzielle Abfolge beider Therapieregime in Frage stellt (207, 208). Zudem gibt es Hinweise, dass eine alternierende Therapieabfolge zwischen Taxanen und neuartigen hormonellen Substanzen der Vorzug gegeben werden sollte (212, 213). Taxane jedoch sind weitaus toxischer einzustufen als die neuartigen hormonellen Substanzen und können Patienten bei schlechtem Allgemeinzustand nicht bedingungslos empfohlen werden (8). Somit sind neue Biomarker wünschenswert, die prätherapeutisch das Therapie-Ansprechen vorhersagen können. Auch wenn der PSA-Wert höchst spezifisch ist, kann er zur Therapieentscheidung im Stadium des CRPC nur bedingt herangezogen werden. Zellen die von einem soliden Tumor aus in die Blutbahn ausgesondert werden, um eine Metastasierung voranzutreiben werden als CTCs deklariert und wurden erstmals in den 90^{er} Jahren beschrieben (229). Mehrere Veröffentlichungen von *de Bono et al.* dokumentieren dabei eine mögliche Ableitung der Überlebensrate an Hand isolierter CTCs von Patienten mit CRPC unter taxanbasierter Chemotherapie (25). Basierend auf diesen Forschungsergebnissen wurde die Detektion von CTCs mittels CELLSEARCH® bereits 2008 von der FDA genehmigt. Nichtsdestotrotz diente bis dato die reine Quantifizierung der CTC-Zahl bei Patienten mit CRPC nur als prognostischer und nicht als prädiktiver Marker. In den letzten Jahren haben mehrere Studien dabei gezeigt, dass die weitere Zerlegung der isolierten CTCs in seine molekularen

Bestandteile die Aussagekraft verbessert (27-29, 197). Die Androgenrezeptor-Splicevariante AR-V7 hat dabei insbesondere im Rahmen weiterer molekularer Charakterisierung in der Verwendung als prädiktiver Indikator ein Therapieansprechen bei Patienten mit CRPC zu prognostizieren, großes Interesse erlangt. Basierend auf dem Protein- oder mRNA-Spiegel, haben einige Arbeitsgruppen zeigen können, dass der Nachweis von AR-V7 in CTCs das Potential beherbergt als prädiktiver Biomarker für jene Therapieentscheidungen in Stadium des CRPC zu fungieren (15, 18, 31). Der Biomarker AR-V7 als Prognosefaktor beim CRPC ist hierbei weiterhin Teil eines angehenden Diskurses. Übergeordnetes Ziel dieser Arbeit ist es die Fähigkeit des Biomarkers AR-V7 in CTCs beim mCRPC hinsichtlich seines prädiktiven Wertes zu validieren.

Die Patienten wurden unabhängig der applizierten Therapie, sowie nach Gruppierung in die Subpopulation ASRI (Enza u. Abi) und Chemotherapie (Doce u. Caba) analysiert. Dabei verteilt sich die Kohorte auf die einzelnen Subgruppen wie folgt: Abi (n=1), Enza (n=12), Doce (n=13), Caba (n=4). In vergleichbaren Studien konnten die Kollegen *Antonarakis et al.* (n = 99) und *Scher et al.* (n = 161) auf größere Populationen zurückgreifen (15, 18).

Das durchschnittliche Alter bei Therapiebeginn der Gesamtkohorte beträgt 70 Jahre (range 50 – 85 Jahre). Dies ist vergleichbar der Studie von *Scher et al.*, die in ihrer mCRPC Kohorte ein medianes Alter von 68 Jahren (range 45 - 91) aufweisen (15).

Bei 53,3 % der Patienten war initial eine kurative Therapie (rPx 33,3 %, Radiatio 10 %, beides 10 %) und bei 46,6 % keine kurative Therapie nach Primärdiagnose eines PCa durchgeführt worden. *Scher et al.* weisen hier eine Rate von rPx in 48 %, Radiatio in 28 %, Brachytherapie in 4 % und keine Vortherapie in 30 % der Fälle aus (15). Damit zeigt sich in unserer Kohorte eine geringere Anzahl kurativ intendierter Therapien, was für eine spätere Erstdiagnose der Tumorerkrankung und damit für eine schlechtere Prognose spricht.

Das Intervall von Beginn der ADT bis Diagnose eines CRPC, sprich die Dauer im kastrationssensiblen Stadium, wird in der Literatur unabhängig der Form der initialen Androgenblockade im Median mit 2- 3 Jahren (230, 231) angegeben. Die Dauer des Ansprechens auf die initiale ADT hat dabei prognostische Konsequenzen für eine sekundäre Hormonmodulation. So konnten *Loriot et al.* zeigen, dass im Falle eines Ansprechens auf die primäre ADT > 12 Monate eine PSA Remission bei sekundärer

Hormonmodulation in 41 % der Fälle und bei < 12 Monaten eine PSA Remission nur in 16 % der Fälle eintritt (232). Nur 5 - 10 % der Patienten überleben dabei > 10 Jahre nach Initiierung einer ADT (230). Bei uns zeigt sich konkordant dazu eine mediane Therapiedauer im kastrationssensiblen Stadium mit ADT von 38 Monaten, wobei nur bei 2 Patienten (= 6 %) ein Überleben > 10 Jahre nach Initiierung der ADT festgehalten ist. Die Konversion in ein CRPC stellt sich bei uns nach Primärdiagnose des PCa im Median nach 45 Monaten ein.

Die Kollegen *Pound et al.* konnten in einer großen retrospektiven Studie nach rPx mit einer Nachbeobachtungszeit von > 5 Jahren nachweisen, dass nach PSA-Rezidiv signifikant weniger Fernmetastasen auftreten, wenn u.a. der primäre Gleason-Score bei < 8 liegt (233). Ergänzend konnte hinsichtlich des Gesamtüberlebens unter Abi in der Erstlinientherapie beim CRPC eine positive Auswirkung bei einem Gleason Score < 8 (OS 35,3 Monate vs. 31,9 Monate) dargestellt werden (10). Da sich in unserer Studie ein medianer Gleason Score > 8 präsentiert, muss davon ausgegangen werden, dass es sich um eine insgesamt stärker belastete Kohorte mit erhöhten Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko handelt.

Insgesamt zeigt sich hierzu passend eine hohe metastatische Tumorlast vor Therapiebeginn über die gesamte Kohorte (ossär 33 %; nodal 10 %; ossär/nodal 40 %; ossär/viszeral 17 %) hinweg. Die Kollegen *Scher et al.* weisen dabei eine vergleichbare Metastasenlast beim mCRPC aus (ossäre 30 %; nodal 12 %; ossär/nodal 36 %; ossär/viszeral 22 %). Die für das PCa typische ossäre Metastasierung liegt damit bei *Scher et al.* und in unserer Studie bei ca. 90 % der Patienten vor (15). Die prognostisch ungünstigen viszeralen Metastasen waren hier bei 17 % der Patienten zu finden. Viszerale Metastasen gelten dabei als ein negativer Prognosefaktor und werden *per definitionem* nach der SWOG Studie als *high-volume* Erkrankung deklariert. Weitere Kriterien sind hier Metastasen der Rippen oder der Röhrenknochen (234). Interessanterweise haben in der *ECOG 3805 CHAARTED* Studie insbesondere *high-volume* Patienten am meisten von der Kombinationstherapie ADT plus Doce beim primär metastasierten CSPP profitiert (139).

Einige Arbeiten konnten zeigen, dass ein niedriger initialer PSA-Wert bei Diagnosestellung des CRPC sowohl mit einer verbesserten Prognose als auch mit einem verbesserten Ansprechen auf die folgende Therapie einhergeht (235).

Weiterhin ist in der Literatur im Rahmen der primären ADT beschrieben, dass ein niedriger PSA-Nadir und ebenso eine prolongierte Dauer bis zum Erreichen des PSA-Nadirs positive Auswirkungen auf das OS und das PFS bewirken (236). So konnten hier die Kollegen zeigen, dass ein PSA Nadir < 0,2 ng/ml vs. 0,2 – 4 ng/ml mit einem PFS von 38 Monaten vs. 13 Monaten einhergeht. Zusätzlich war eine Dauer von > 12 Monaten gegenüber < 6 -12 Monate ebenfalls prognostisch günstig (PFS 35 Monate vs. 13 Monate) (236). Dieses Phänomen kann man in unserer Kohorte bei dem Patienten unter 1st-line Therapie mit Abi beobachten, der seinen Nadir mit 0,16 ng/ml nach > 12 Monaten erreichte und bei welchem das radiologische Rezidiv erst nach 41 Monaten diagnostiziert wurde. Ergänzend hierzu legten *Hussain et al.* im Rahmen des pmCSPC nach Therapiebeginn dar, dass das OS besser ausfällt je niedriger der PSA-Nadir nach 7 Monaten ist (237) .

Diese Beobachtung können wir zwar nicht für die hier vorliegende Kohorte mit CRPC hinsichtlich der Endpunkte OS und PFS bestätigen, jedoch ist auch in unserer Studie auffällig, dass Patienten unter 1st-line Therapie im Stadium des CRPC ihren medianen PSA-Nadir mit durchschnittlich 208 d weitaus später als Patienten in der 2nd-line Therapie mit 107 d verbuchen. Diese Erkenntnisse unterstützen die Hypothese, dass jedwede Vortherapie einen negativen Einfluss auf die nachfolgende Therapie hat und/oder, dass sich ein langes zeitliches Intervall bis zum PSA-Nadir positiv auf das OS und PFS auswirken.

Ergänzend dazu konnte in einer retrospektiven Studie an mCRPC Patienten unter Doce demonstriert werden, dass ein zügiges Erreichen des PSA Nadirs mit < 16 Wochen mit einem schlechteren Therapieansprechen vergesellschaftet ist (238). Die Kollegen *Wu et al.* konnten diese Hypothese mit Nachweis eines besseren Chemotherapie-Ansprechens und verlängertem PFS im Rahmen des CRPC unter Doce bestätigen (238). Betrachtet man nun in unsere Studie isoliert die Gruppe um Docetaxel, so stellen sich paradoxerweise der PSA-Nadir in der Therapie-naiven Subgruppe 1st –line Doce nach 104 d und unter 2nd-line Doce erst nach 158 d ein. Konkordant allerdings zu dem bereits genannten negativen Prädiktor PSA-Nadir < 16 Wochen (= 112 d) von *Wu et al.* (238), zeigen sich bei uns unter 1st-line Doce (< 16 Wochen) bereits nach 174 d und in der 2nd-line (> 16 Wochen) ein biochemisches Rezidiv erst nach 246 d.

Die längsten Perioden bis zum PSA-Nadir konnten konsequenter Weise bei 1st-line Behandlung und niedriger Tumorlast im Rahmen der Therapie mit Abi (n = 1) nach 406 d und bei einem Therapie-naiven Patienten mit isolierter lymphogener Metastasierung unter Enzalutamid (510 d) beobachtet werden. Das Erreichen des PSA-Nadirs in den Gesamtgruppen Caba, Doce und Enza war mit 122 d, 121 d und 117,5 d trotz unterschiedlicher Belastung mit Vortherapien unerklärlicherweise fast identisch.

Die Kollegen *Armstrong et al.* konnten in der retrospektiven post hoc Analyse der PREVAIL Studie darlegen, dass ein verbessertes OS, sowie das rPFS und bPFS mit der Höhe der PSA-Abfalls innerhalb der ersten 3 Monate nach Therapiestart mit Enzalutamid assoziiert ist (239). Dabei kategorisierten die Kollegen die Kohorte nach PSA-Ansprechen nach 3 Monaten < 30 %, > 30 %, > 50 % und > 90 %. Zwar analysierten wir nicht den absoluten PSA-Abfall bis zum 3ten Monat, jedoch zeigt sich auch bei uns ein absoluter PSA-Abfall in der Gruppe um Enza von 56 %, ähnlich der Studie von *Poon et al.* (46 %) (240). Damit liegt hier bezogen auf die Gesamtpopulation, als auch auf die Subgruppen der Enza Patienten ein PSA-Ansprechen > 30 % bzw. > 50 % vor. Das radiologische PFS wird dabei von *Armstrong et al.* mit 13,8 Monate bzw. 13,9 Monate und das bPFS mit > 13,8 Monaten angegeben (239). In unserer Studie zeigt sich vermutlich basierend auf der kleinen Kohorte, der fehlenden Kategorisierung nach PSA-Abfall < 30 % > etc. und der Tatsache, dass hier im Gegensatz zur PREVAIL Studie auch Patienten nach Chemotherapie inkludiert wurden ein rPFS von nur 7,5 Monaten und ein bPFS von 6,6 Monaten. Jedoch können wir in der Einzelfallbetrachtung die guten Ergebnisse der Analyse von *Armstrong et al.* (239) für das PSA Ansprechen > 90 % (bPFS = 22,5 Monate; rPFS > 13,8 Monate) zumindest teilweise bestätigen. Hier zeigt sich bei einem Patienten unter Enzalutamid trotz Vorbelastung mit Doce und Abi bei lymphogener und ossärer Metastasierung ein PSA-Ansprechen von 86 % und einem bPFS von 25 Monaten, sowie einem rPFS von 13 Monaten (Abb.15). Bemerkenswert ist, dass bei Betrachtung der Studie von *Armstrong et al.* insbesondere zwischen dem PSA-Abfall von > 30 % bzw. > 50 % gegenüber > 90 % eine große Diskrepanz mit einem medianen bPFS von 13,8 und 13,9 Monaten gegenüber 22,5 Monaten herrscht (239).

Weiterhin zeigt sich bei der Analyse der Enza Subgruppen, Chemotherapie-naive und post Chemotherapie, ein totaler PSA-Abfall von 48 % vs. 67 %. Konträr hierzu konnten *Poon et al.* nach Chemotherapie oder Abi ein PSA-Ansprechen lediglich von 35 % darlegen (240). Dies könnte ein Indiz für eine Sensibilisierung der Prostatakarzinomzellen durch eine Chemotherapie vor erneuter Androgenblockade sein und die alternierende sequenzielle Gabe befürworten (208, 212), da in unsere Studie die Chemotherapie-naive Gruppe Enza in 70 % der Fälle mit Abi vortherapiert war.

Eine partielle biochemische Remission unter Therapie mit dem Chemotherapeutikum Doce trat der Literatur entsprechend wesentlich häufiger als unter Enza ein. So erreichten hier 75 % der Patienten eine partielle Remission mit einem medianen PSA-Abfall von 70 % (range 35 – 91 %), zudem zeigt sich hier bei allen Patienten im Gegensatz zur Enza Kohorte ein PSA-Ansprechen. In der Literatur ist dabei bereits beschrieben, dass insbesondere die 2nd-line Applikation von Enza nach Abi bzgl. einer PSA-Remission der 2nd-line Applikation mit Doce unterlegen ist. Bei 2nd-line Applikation von Enza war nur bei 11 - 34 % ein PSA-Abfall ersichtlich (210, 211), während Doce ein PSA-Abfall bei 50 % der Patienten im CRPC erwirkte (166).

Das initiale PSA-Ansprechen unter Doce hat dabei direkte Konsequenz für eine möglich Nachfolgende Rechallange Therapie mit Docetaxel. *Thomas et al.* konnten hier aufzeigen, dass Patienten von einer Rechallange am meisten profitieren, wenn das Behandlungsfreie-Intervall > 3 Monate nach Chemotherapie und die partielle PSA-Remission auch in der Rechallange gegeben ist (241). Hierfür exemplarisch zeigt sich (Abb.14) ein Patient mit einem totalen PSA-Abfall von 91,5 % unter 1st-line Gabe Doce mit rascher partieller Remission < 1 Monat bei einer Therapie-Pause von > 3 Monaten und erneuter partiellen Remission unter Rechallange Doce (241).

Unter Cabazitaxel zeigt sich mit 40 % das schwächste PSA-Ansprechen, was auf die multiplen Vortherapien und auf den insgesamt schlechten Performance Status zurückzuführen ist. Anzumerken ist jedoch, dass ein einzelner Patient (Abb.13) hier enorm von der Therapie mit Cabazitaxel nach Docetaxel-Applikation mit einem PSA-Abfall von 86 % (von > 4500 ng/ml auf 632 ng/ml) profitiert hat.

Weiterhin muss hier bei der Begutachtung des totalen PSA-Abfalls reüssiert werden, dass hier zwar eine Diskrepanz in den dominanten Gruppen um Doce und Enza mit

PSA-Ansprechen 70 % vs. 56 % ersichtlich ist, dieses sich jedoch nicht in der Betrachtung des biochemischen Rezidivs (224 d vs. 242 d) und des radiologischen Progresses (237 d und 225 d), die beinahe identisch ausfallen, widerspiegelt.

Abschließend zeigt sich im Vergleich aller Patienten unabhängig der Therapieform unter der 1st-line Therapie und > 2nd-line Therapie ein deutlicher Unterschied bzgl. des biochemischen Rezidives mit 335 d vs. 220 d und auch bzgl. des radiologischen Progresses mit 431 d vs. 215 d. Beides ist gut vereinbar mit der Tatsache einer voranschreitenden Erkrankung und ebenso mit den unter dem Behandlungsdruck zunehmend ausgebildeten Resistenzmechanismen der Prostatakarzinomzellen (70, 174).

Der radiologische Progress über die Gesamtkohorte mit CRPC tritt nach 265 d ein. In den dominanten Gruppen (n > 10) mit Enza und Doce zeigt sich ein beinahe identes rPFS von 225 d vs. 237 d. In der Literatur ist im Rahmen der großen Zulassungsstudie PREVAIL für ENZA in der 1st-line Applikation ein rPFS mit 20 Monaten angegeben (64). Da eine Untergliederung in 1st-line Enza-Applikation bei uns nicht erfolgt ist, sind hier die Ergebnisse der AFFIRM Studie mit einem rPFS von 8,3 Monaten unter Enzalutamid nach erfolgter Docetaxel-Therapie für uns vergleichbarer (7). Tatsächlich kann bei der Subgruppen Analyse gezeigt werden, dass in unserer Studie in der Subgruppe um Enza post Doce das rPFS konkordant der AFFIRM Studie mit 8,3 Monaten nach ca. 9,5 Monaten eintritt. *Tannock et al.* geben zur rPFS im Rahmen ihrer Docetaxel-Studie keine Auskunft. Weiterhin scheint das rPFS im Rahmen der Therapie mit Doce bis dato wenig beleuchtet worden zu sein (8). Die COU-AA-301 Studie mit Zulassung für Abi gibt ein rPFS nach 5,6 Monaten an (10). Dabei wurden nur Docetaxel-Versager therapiert, womit die Studie für unseren Patienten in der 1st-line Therapie unter Abi mit einem rPFS > 3 Jahren nicht repräsentativ ist.

Eine große Metaanalyse zur Effektivität durch Enza und Abi beim CRPC durch *Zheng et al.* konnte bzgl. des bPFS und rPFS Vorteile durch beide Medikamente bestätigen. Dabei zeigt sich zudem das Enza bzgl. der bPFS und des rPFS Abi überlegen zu sein scheint, ohne dabei Einfluss auf ein verlängertes OS zu nehmen (242).

Interessanterweise zeigt sich in den vortherapierten Subgruppen bei Enza post Chemotherapie und Doce in der 2nd-line Therapie, dass der radiologische Progress (226 d bzw. 232) vor dem biochemischen Progress (286 d bzw. 246) diagnostiziert wurde. Ein Phänomen, dass noch in den unbelasteten Subgruppen 1st-line Doce und Enza prä Chemotherapie gegenteilig war. Dies könnte darauf hinweisen, dass mit zunehmender Therapiedauer im Stadium des mCRPC die bildgebende Diagnostik der PSA-Diagnostik überlegen ist und folglich einen höheren Stellenwert beim Tumormanagement einnehmen könnte (23).

Die Beurteilung des OS war unter den hier durchgeführten Studienbedingungen erschwert. Ursächlich hierfür war u.a. ein oftmals unklarer genauer Todeszeitpunkt, etwaige Versorgung der Patienten durch niedergelassen Kollegen und fehlende Dokumentation. Schlussendlich verstarben während des Studienverlaufs 62,5 % bis zum ersten Stichtag am 01.07.2018 über einen Beobachtungszeitraum von 47,2 Monaten und weitere 6 Monate später zum zweiten Stichtag 83,3 % der CRPC Patienten.

Gesondert müssen final die zwei Patienten mit CSPC analysiert werden, die nach dem CHAARTD-Regime mit Doce plus ADT bei primär metastasierten CRPC behandelt wurden. Zwar zeigt sich hier eine partielle Remission in nur einem der beiden Fälle mit einem gepoolten PSA-Ansprechen von > 60 %, jedoch bestätigt das hier dokumentierte bPFS und rPFS mit > 25 Monaten die Effektivität der dualen Therapie. Die Kombinationstherapie von Docetaxel mit ADT legte dabei in den Studien ein vergleichbares progressionsfreies Überleben von 22,9 Monaten (GETUG), 20,2 Monaten (CHAARTED) und 27 Monaten (STAMPEDE) dar (134). Ergänzend hierzu zeigen sich noch bessere Daten bzgl. des PFS für eine Kombinationstherapie mit ADT plus Abi mit einem PFS von 33 Monaten in der LATITUDE Studie (134) und 43,9 Monaten in der STAMPEDE Studie (134).

Die suffiziente Detektion von CTCs ist einer der ersten Schritt dieser Arbeit, da nur ungefähr eine einzelne CTC unter Millionen von Blutzellen existiert (243). Die CTCs detektierten wir dabei mittels des Dichtezentrifugations-System OncoQuick, wobei unsere Detektionsrate von 54,44 % CTCs in 31 von 58 Proben im Vergleich hoch ausfällt. Die Kollegen *Balic et al.* stellten hier der Dichtezentrifugation OncoQuick das

CellSearch System gegenüber (244). Dabei zeigten sie, dass im Rahmen einer Tumorerkrankung mittels CellSearch ein doppelt so hoher Nachweis von CTCs im Serumblut gelingt. Mittels OncoQuick wurden dabei nur in 23 % und mittels CellSearch in 54 % der Patienten CTCs nachgewiesen (244). Die Kollegen *Banko et al.* gehen ebenfalls von einer Detektionsrate durch OncoQuick von 23 % aus (245). Zudem zeigt sich bei *Balic et al.* bei Betrachtung der medianen absoluten Detektionsrate Vorteile des CellSearch Systems gegenüber der Isolation mit OncoQuick (20 CTCs/7,5ml vs. 3 CTCs/7,5ml) (244). Konträr zu unseren Kollegen weisen wir hier ebenfalls eine erhöhte absolute Detektionsrate von ca. 19,5 CTCs/20ml aus (~ 1 CTC/ml) aus. Eine Begründung für die hohen absoluten und prozentualen Detektionsraten im Vergleich zu *Balic et al.* (244) sehen wir in der hohen Tumorlast und dem weit fortgeschrittenen Stadium unserer Patienten. Die Kollegen untersuchten vor allem metastasierte Patienten in frühen Stadien. Darüber hinaus erfolgten die Studien an unterschiedlichen Tumorentitäten und nicht isoliert am mCRPC. Hier indessen beschreiben *Scher et al.* unter Verwendung des CellSearch Systems im Rahmen des CRPC einen CTC-Count von > 5 CTC/7,5ml in 55 % der Patienten vor 1st-line Chemotherapie (246). Weiterhin demonstrierten *Scher et al.* hier, dass unter Chemotherapie ein Rückgang des CTC-Counts 4, 8 und 12 Wochen nach Beginn der Chemotherapie zu verzeichnen ist (246). Interessanterweise zeigt sich in unserer Studie auch im Rahmen der taxanbasierten Subgruppe eine geringerer CTC-Count mit 16 CTC/20ml gegenüber der antiandrogenen Therapiegruppe mit 19 CTC/20ml. Dies könnte ein Hinweis auf eine stärkere Suppression disseminierter Tumorerkrankung durch die Chemotherapie sein. *De Bono et al.* demonstrieren weiterhin im Rahmen des CRPC bei 57 % ein CTC-Count > 5/7,5ml und bei 43 % eine CTC-Count < 5/7,5ml vor Therapiebeginn (25). Dabei konnten *de Bono et al.* zeigen, dass ein niedriger CTC-Count von < 5/7,5ml positiven Einfluss auf das OS (21,7 Monate vs. 11,5 Monate) nimmt (25).

Insgesamt resultiert aus allen Blutproben eine Gesamtdetektion von ~ 1132 Tumorzellen mit 1 - 136 CTCs/20ml. Die Kollegen *Scher et al.* belegten hierbei eine größere detektierbare Spannweite von AR-V7-positiver CTCs mit 0.74/ml bis 105/ml (15). Im Median wiesen *Scher et al.* dabei eine Detektionsrate von 2.4/ml CTC/BE (15), wir hingegen von ~1/ml (mediane Detektionsrate 19,5/20ml) auf. Die teils hohen Detektionsraten in unserer Studie lassen sich dabei durch andere nicht-

immunohistochemische Versuchsaufbaue noch weiter verbessern. *Stott et al.* weisen bspw. einen CTC-Count von 95 CTC/ml im Median aus (247). Ebenso war es *Qin et al.* sogar möglich eine mediane Detektionsrate von 257/7.5 ml in 82 % ihren Patienten zur erreichen (248).

Gerade beim Prostatakarzinom sollte abschließend erwähnt werden, dass die Detektion von CTCs im Vergleich zu anderen Tumorentitäten erfolgreicher und somit diagnostisch wertvoller zu sein scheint. Die Kollegen *Wang et al.* demonstrierten eine Detektionsrate von 57 % beim Prostatakarzinom, wohingegen bei disseminierten Mammakarzinomen (37%), Ovarialkarzinomen (37 %), Kolonkarzinomen (30 %) und Lungenkarzinome (20 %) geringere CTC-Nachweise gelang (249).

Neben der Detektion CTCs ist im nächsten Schritt die Beurteilung des immunohistochemischen Verfahrens ein wesentlicher Punkt dieser Arbeit. Mittels Westernblot konnten wir dabei eine suffiziente Anitkörperreaktion des Anti-AR-V7 Antikörpers (Abcam, Klonnummer: EPR15656) an Hand 22Rv1-Zelllinien trotz unterschiedlicher Verdünnung (1:500 und 1:1500) und Chargen-Nummer verifizieren. Dabei zeigt sich eine passende Bandenhöhe von 80 kDa wie in der Literatur beschrieben (19).

Laut Herstellerangaben ist eine Verdünnung für den Primärantikörper von 1:250 vorgesehen. Die hier angewendete Verdünnung von 1:40 an 22Rv1-Zelllinien nach Stimulation mit Testosteron fällt somit weitaus geringer aus. In der Literatur hingegen zeigt sich konkordant dazu, dass auch *McKay et al.* (Verdünnung 1:200) (250) und *Li et al.* (Verdünnung 1:100) (251) mit wesentlich geringerem Antikörperauftrag ein suffizientes immunohistochemisches Ergebnis replizieren konnten.

Zur immunohistochemischen Analyse der Tumorzellen wurden letztendlich die Serum-Proben von 26 Patienten mit CRPC herangezogen. Die Diskrepanz zur Ausgangskohorte von 30 Patienten begründet sich dabei in der Exklusion von zwei Patienten im Stadium des CSPC und zweier nicht bearbeiteter Serumproben. Bei Betrachtung der immunohistochemischen Färbung zeigt sich insgesamt eine übereinstimmende strukturelle Morphologie im Abgleich mit den 22Rv1-Positivkontrollen. Die AR-V7-positiven CTCs weisen dabei ein braunes Kolorit, welche sich plexiform durch die CTC durchzog und ebenso eine rot

durchschimmernde Färbung auf: Braun entsprechend als Nachweis einer CK8/18-Positivität, rot entsprechend als Nachweis einer AR-V7-Positivität. Die AR-V7 negativen Zellen zeigen morphologisch die selbige morphologische Beschaffenheit ohne die rote Färbung.

Das Hauptaugenmerk bei der visuellen Beurteilung der CTCs lag neben dem Nachweis der braunen und/oder roten Färbung auf folgenden Kriterien: Diameter, Kern-Plasma-Relation und Morphologie.

Der durchschnittliche Diameter einer CTC, unabhängig seiner Entität, wird dabei bei *Park et al.* mit $7.97 \pm 1.81 \mu\text{m}$ bzw. bei *Coumans et al.* mit $10.7 \mu\text{m}$ angegeben (252, 253). Der Diameter einer kultivierten LnCAP-Zellreihe misst mit $13.38 \pm 2.54 \mu\text{m}$ (253) fast das Doppelte. Weiterhin wird postuliert, dass CTCs des PCa insgesamt einen geringeren Diameter besitzen als bspw. CTC des Brust- oder Kolonkarzinoms (252). In unserer Studie zeigt sich ein Diameter, welcher exemplarisch an mehrere Zellen abgeleitet wurde, im Median von $20,63 \mu\text{m}$ (range $15,15-27,78 \mu\text{m}$). Diese Diskrepanz ist vermutlich der hier angewendeten Methodik mit multiplen Wasch- und Zentrifugationsschritte geschuldet, wobei sich im Vergleich zu Brustkrebszellen die o.g. Größendifferenz als regelrecht erweist. Hier gaben die Kollegen *Meng et al.* einen Diameter von $29,8-33,9 \mu\text{m}$ an (254).

Eine Objektivierung der Kern-Plasma-Relation war hier nur bedingt möglich, kann aber prinzipiell unterstützend zur Evaluation einer möglichen Malignität herangezogen werden. Die Kern-Plasma-Relation (N/C-Ratio) ist dabei definiert als ein Verhältnis zwischen der Fläche des Nukleus zur Fläche des Zytoplasmas einer Zelle. Klassischerweise ist dieses bei malignen Zellen zu Gunsten des Nukleus verschoben. Dieses Phänomen wird zusätzlich auf Grund der geringen Größe von CTCs weiter verstärkt.

Scher et al. beschrieben einen vorwiegend nuklearen AR-V7-Nachweis in ihrem immunhistochemischen Aufbau (15), wohingegen wir dies übereinstimmend mit einigen Kollegen, die ebenfalls eine zytoplasmatische Färbung beobachteten, nicht bestätigen können (255-257). Damit ist eine Ableitung der N/C-Ratio hier nicht adäquat möglich. Die mediane N/C-Ratio kultivierter LNCaP, PC3, Du145 und C4-2 Prostatakarzinomzelllinien beträgt dabei ~ 1.12 , die mediane N/C-Ratio der CTCs aus Patienten mit Prostatakarzinom wird bereits mit ~ 1.43 angegeben (253). Die

Daten von *Park et al.* weisen hier allerdings eine enorme Heterogenität mit einer Spannweite der analysierten N/C-Ratio von ~ 0.9 bis ~ 2.7 auf (253). Die Vergleichbarkeit und Evaluation der N/C-Ratio mit anderen Studien ist somit nicht möglich, da wir zum einen 22-Rv1 Zellen verwendeten und die Kollegen die CTC-Detektion schonender mittels CellSearch System durchführten.

Abschließend zeigt sich das morphologische Grundgerüste der CTCs immer als rundliche Zelle. Häufig sind die CTCs, sowohl bei der Positivkontrolle, als auch bei den Patientenproben in akkumulierten Zellverbänden angeordnet. Ein klassischer Mechanismus der Scherkräfte in der Blutbahn auf die CTCs reduziert und somit die CTCs vor der intravasalen Lyse schützt (253).

In unserer Arbeit zeigt sich weiterhin eine wesentlich höhere AR-V7 Positivität mit 91,7 % der detektierten CTCs. Hier besteht eine signifikante Korrelation ($p < 0,001$) zwischen der Detektion von CTCs und einer AR-V7 Positivität. Die Kollegen *Scher et al.* demonstrierten hingegen eine AR-V7 Positivität von nur 18 % in hormonsensiblen Patienten und in der Subpopulation im Stadium des CRPCs von 31% (15, 253). Interessanterweise zeigte sich hingegen bei *Qu et al.*, die eine vergleichbare immunhistochemische Methodik anwendeten eine AR-V7 Positivität von bereits 58,7 % (173, 253). Vereinbar hiermit sind zudem die Resultate von *Sharp et al.*, die bei Patienten im Stadium des CRPC unter Verwendung des selbigen Antikörpers nach erfolgter 1st-line Therapie bereits eine AR-V7 Positivität von 75 % nachwiesen (253, 258). Dies wiederum bestärkt die hier detektierte hohe AR-V7 Positivität von 91,7 %, da hier nur 6 der 26 Patienten in der 1st-line therapiert wurden. Das Phänomen, dass multiple Vortherapien einen direkten proportionalen Einfluss auf den AR-V7-Status haben wurde bereits durch die Kollegen *Scher et al.* beschrieben (15) und durch die Arbeitsgruppe um *Steinestel et al.* bestärkt (198). *Steinestel et al.* nahmen hier sogar an, dass insbesondere durch die Vortherapien eine Differenzierung zur AR-V7 Positivität initiiert wird. Der zudem insgesamt schlechte Performance-Status, der hohe Gleason-Score (> 8) und die hohe Metastasenlast unserer Kohorte tragen vermutlich ebenso zu der hohen AR-V7 Positivität bei.

Abschließend muss eingeräumt werden, dass die AR-V7 Detektion basierend auf der hier insgesamt kleinen Kohorte (n = 26), wie auch in anderen Studien durch mögliche Kreuzreaktionen des AR-V7 Antikörpers verzerrt ist. Diese Kreuzreaktionen wurden

bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (15, 172, 253, 258) und sind weiterhin Teil einer andauernden wissenschaftlichen Debatte.

Das Ziel unseres Versuchaufbaues ist es den Biomarker AR-V7 in CTC als unabhängiger Prognosefaktor beim CRPC zu bewerten.

In einer der ersten Studien zu diesem Thema hatten hier *Antonarakis et al.* (16) eine Verbindung zwischen dem PFS und der Expression von AR-V7 mRNA in CTCs aufzeigen können (16, 18). Die Forschungsgruppe um besagten Kollegen demonstrierte, dass Patienten mit AR-V7 Positivität ein wesentlich geringeres PFS (3 Monate), als AR-V7-negative Patienten (8 – 14 Monate) erreichen. *Scher et al.* fügten dabei an, dass bei Nachweis einer nuklearen Expression von AR-V7 in CTCs im Stadium des mCRPC ein Überlebensvorteil für Patienten unter Doce gegenüber einer Therapie mit Antiandrogenen (Enza/Abi) zu erwarten ist (15). Weiterhin ergänzten sie, dass der prätherapeutische Nachweis von CTCs mit AR-V7 Positivität mit einer erhöhten Resistenzrate gegenüber einer neu-initiierten antiandrogenen Therapie einhergeht, was sich wiederum in einem schlechterem PSA-Ansprechen, kürzeren PFS und OS widerspiegeln würde (15).

In unserer Studie zeigt sich bezogen auf die Gesamtkohorte kein signifikanter Unterschied bzgl. des PSA-Ansprechens (57,14 % vs. 66,67 %) und der durchschnittlichen prozentualen PSA-Reduktion (53,7 % vs. 62,11 %) beim Vergleich der CTC/AR-V7- negativen und –positiven Patienten. Das radiologische und das biochemische PFS weisen zudem bei uns keine signifikanten Unterschiede auf.

In der Literatur sind hierzu insbesondere Studien durchgeführt worden, die eine Subgruppenanalyse zwischen dem AR-V7 Nachweis und den Therapien Taxanen vs. Antiandrogenen durchführten.

Scher et al. dokumentierten in der Subgruppe der Antiandrogene bei keinem der Patienten (37 %) mit biochemischen Ansprechen einen prätherapeutischen positiven AR-V7-Status (15). Dahingegen wiesen sie bei 20 % der Patienten die kein PSA-Ansprechen zeigten eine AR-V7 Positivität nach. Diese Erkenntnisse können wir nicht teilen. In unserer Studie wiesen AR-V7-positive und AR-V7-negative Patienten zu 57,14 % bzw. 50,0 % ein adäquates PSA-Ansprechen unter Antiandrogenen ohne signifikanten Unterschied auf. Die durchschnittliche PSA-Reduktion unter

Antiandrogener Therapie belief sich in unserer Studie auf 45,3 % (CTC/AR-V7 negativ) und 56,0 % (CTC/AR-V7 positiv).

Auch *Antonarakis et al.* unterstützen dabei die These von *Scher et al.*, dass kein PSA-Ansprechen unter antiandrogener Therapie bei AR-V7 Positivität zu erwarten ist. *Antonarakis et al.* demonstrierten hier ebenfalls unter Enzalutamid bei AR-V7 Positivität ein PSA-Ansprechen von 0 % vs. 53,0 % bei AR-V7-negativen Status (16). AR-V7-positive CTCs waren zudem assoziiert mit einem reduziertem medianen rPFS bei *Scher et al.* (2,3 Monate vs. 14,5 Monate; $p < 0,01$) und bei *Antonarakis et al.* (2,1 Monate vs. 6,1 Monate; $p < 0,01$) (15, 16). Das bPFS wird unter Enza mit 1,4 Monaten bei *Scher et al.* und 6,0 Monaten bei *Antonarakis et al.* bei AR-V7 positiven Patienten angegeben (15, 16).

Lag zudem bei eine AR-V7-Positivität vor, ging dies mit einem wesentlich verschlechtertem medianen OS (4,6 Monate vs. nicht erreicht; $p < 0,01$ bei *Scher et al.* bzw. 5,5 Monate vs. nicht erreicht; $p = 0,002$ bei *Antonarakis et al.*) einher (15, 16). Eine Beurteilung des OS in Abhängigkeit des AR-V7 Status ist durch uns auf Grund der genannten Ursachen nicht erfolgt.

In der Subgruppe um die Taxane demonstrierte *Scher et al.* einen positiven AR-V7 Status bei 27,0 % und innerhalb der AR-V7-positiven Patienten ein PSA-Ansprechen mit 35,3 % gegenüber 65,7 % ohne PSA-Ansprechen (15). Auch diese Erkenntnisse können wir durch unsere Analyse nicht bestätigen. Hier zeigt sich unter Chemotherapie ein höheres PSA-Ansprechen trotz AR-V7 Positivität in 80,0 % der Fälle. Konkordant zu den Kollegen *Scher et al.* weisen wir hier allerdings ebenso ein verbessertes PSA-Ansprechen in der taxanbasierten Gruppe gegenüber der antiandrogenen Gruppe bei AR-V7 Positivität (80,0 % vs. 57,14 %) auf.

Die mediane PSA-Reduktion mit 70,56 % in der CTC/AR-V7 positiven und 60,11 % in der CTC/AR-V7 negativen Gruppe unterstütz dabei die These, dass eine Chemotherapie weniger den o.g. Resistenzmechanismen ausgeliefert ist (21). Die Daten der Kollegen (21) bestätigen dabei die Beobachtung, dass eine stärkere mediane absolute PSA-Reduktion auch bei AR-V7 positiven Patienten durch eine taxanbasierte Therapie erfolgt (hier: 70,56 % vs. 56,0 %).

Die o.g. Erkenntnis, dass eine AR-V7 Positivität in CTCs eine prognostische Aussage für das OS besitzen, teilten die Kollegen *Scher et al.* ebenfalls bei der

Subgruppen-Analyse der Taxane (15). Hier zeigte sich zwar kein signifikanter Unterschied bzgl. des medianen rPFS (5,3 Monate vs. 6,6 Monate) und der medianen Therapiedauer (3,0 Monate vs. 3,7 Monate), jedoch war auch das mediane OS bei AR-V7-positiven Patienten deutlich verringert (8,9 Monate vs. 19,8 Monate; $p < 0,01$).

Damit attestieren *Scher et al.* Patienten mit prätherapeutisch positiven AR-V7-Status eine insgesamt schlechtere Prognose unter Antiandrogenen und Taxanen, wobei diese Patienten nicht-signifikant von einer taxanbasierten Therapie profitieren würden (medianes OS 4,6 Monate vs. 8,9 Monate) (15).

Schlussfolgernd müssen wir feststellen, dass in unserem immunhistochemischen Versuchsaufbau eine prognostische Aussagekraft des AR-V7 Status in CTCs beim mCPRC nicht gezeigt werden konnte.

6. Zusammenfassung

In unserer Arbeit untersuchten wir bei Patienten mit mCRPC die Fähigkeit über den immunhistochemischen Nachweis der Splicevariante AR-V7 auf CTCs ein Therapieversagen oder Therapieerfolg abzuleiten. Wir generierten dabei *de novo* ein immunhistochemisches Verfahren mit Nachweis von AR-V7/+CK8/18-positiven Proteinen in 22Rv1-Zellen und CTCs. Die Detektion der CTCs erfolgte durch Dichtezentrifugation aus Serumproben.

Selektive und sensitive Behandlungs-spezifische prädiktive Biomarker sind dabei beim fortgeschrittenen metastasierten PCa ein Engpass. Die molekulare Aufarbeitung von CTCs hat dabei großes Potential gezeigt einen Therapieerfolg oder –misserfolg vorauszusagen, wobei insbesondere die Expression der Androgen Rezeptor Splicevariante AR-V7 durch Prostatakarzinomzellen als möglicher Prädiktor in den Fokus gerückt ist. Der durch die Kollegen demonstrierte prädiktive Wert von AR-V7 in CTCs (15, 16, 18, 172) konnte durch uns nicht bestätigt werden. Darüber hinaus ergab die Beurteilung des CTC/AR-V7 Status im Gegensatz zu den Ergebnissen der Kollegen (14-16, 21) keine prädiktive Aussage bzgl. des PSA-Ansprechens, bPFS und rPFS. Beim Vergleich mit den o.g. Studien zeigen sich jedoch Diskrepanzen im immunhistochemischen Ansatz und im Rahmen der CTC-Detektion. *Bernemann et al.* griffen hierbei bereits die Problematik der unterschiedlichen methodischen Ansätze im Rahmen der CTC-Anreicherung und AR-V7 Detektion auf (203). Eine isolierte Bindung von AR-V7 an CTCs scheint dabei weiterhin eines der primären Probleme zu sein. Auf Grund dessen heben *Bernemann et al.* die Notwendigkeit eines Standardprotokolls zur Detektion der Splicevariante AR-V7 in CTCs hervor (203). *Hille et al.* haben dabei möglicherweise ein Standardprotokoll entwickelt, welches die geforderte Vergleichbarkeit der einzelnen wissenschaftlichen Erhebungen in Zukunft verbessern könnte (32). Weiterhin ist ein limitierender Faktor unserer Studie in der weitum kritisch diskutierten AR-V7 Expression durch nicht-maligner Zellen (v.a. hämatopoetische Zellen, peritumorales Gewebe, gutartige Drüsen) zu sehen (259). Zudem ist auf die Limitation durch die vergleichsweise kleine Patienten-Kohorte (n = 26) hinzuweisen. Die Kollegen um *Antonarakis et al.* (Enza: n = 31; Abi: n = 31; Taxan: n = 37) und *Scher et al.* (n = 131) konnten hingegen auf größere Populationen zurückgreifen (15, 18).

Abschließend muss reüssiert werden, dass der PSA weiterhin der federführende Biomarker beim Prostatakarzinom ist. Jedoch sind in den letzten Jahren einige Biomarker erforscht worden, die bereits im lokalisierten Stadium Therapieentscheidungen verbessern können (192, 193). Im fortgeschrittenen Stadium des CRPC ist zudem bereits beruhend auf Genomanalysen mittels „*Next Generation Sequencing*“ und Nachweis einer *BRACA-1/2*- oder *ATM-Mutation* vor Therapie mit Olaparib ein Biomarker etabliert worden (194). Die Etablierung weiterer Biomarker wird hier nach *de Bono et al.* in den nächsten 5 Jahren die Therapie des Prostatakarzinoms verbessern (260). *De Bono et al.* gehen zudem davon aus, dass insbesondere die molekulare Stratifizierung beim CRPC schon bald zur Standarddiagnostik gehören wird, wobei die Kollegen weiterhin die Notwendigkeit neuer analytischer Ansätze zur Validierung molekularer Biomarker betonen (260).

Biomarker sollten dabei die Entscheidungsfindung im medizinischen Alltag verbessern. Entgegen vieler Kollegen (14-16, 21) können wir den prädiktiven Wert des AR-V7 Status auf CTCs beim CRPC im Sinne einer „Liquid Biopsy“ nicht bestätigen. Damit bleibt der prädiktive Wert des AR-V7-Status in CTCs basierend auf unserem immunhistochemischen Versuchsaufbau weiterhin unklar und bedarf weiterer Analyse bevor ein klinischer Einsatz zu rechtfertigen ist. Dies deckt sich mit den Empfehlungen der „*Advanced Prostate Cancer Consensus Conference 2019*“ die zum gegenwärtigen Zeitpunkt ebenfalls keinen klinischen Einsatz des Biomarkers AR-V7 befürworten (146).

7. Literaturverzeichnis

1. Huggins C et al. Studies on Prostatic Cancer. I. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate [Internet], 1941[zitiert am 8.3.2020]; published by American Association for Cancer Research, Volume 1, Issue 4, pp. 293-297; Print ISSN: 0008-5472; URL: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/1/4/293.article-info>.
2. N. Mottet, R.C.N. van den Bergh, E. Briers, P. Cornford, M. De Santis, S. Fanti SG, et al. EAU Guidelines 2019 prostate cancer [Internet]; Chapter 6.5. Treatment: Castration-resistant PCa (CRPC), 2019 [zitiert 08.03.2020]; URL: <https://uroweb.org/guideline/prostate-cancer/>.
3. Taplin ME, Bubley GJ, Shuster TD, Frantz ME, Spooner AE, Ogata GK, et al. Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N Engl J Med.* 1995;332(21):1393-8.
4. Smith MR, Saad F, Chowdhury S, Oudard S, Hadaschik BA, Graff JN, et al. Apalutamide Treatment and Metastasis-free Survival in Prostate Cancer. *N Engl J Med.* 2018;378(15):1408-18.
5. Hussain M, Fizazi K, Saad F, Rathenborg P, Shore N, Ferreira U, et al. Enzalutamide in Men with Nonmetastatic, Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med.* 2018;378(26):2465-74.
6. Ryan CJ, Smith MR, Fizazi K, Saad F, Mulders PF, Sternberg CN, et al. Abiraterone acetate plus prednisone versus placebo plus prednisone in chemotherapy-naïve men with metastatic castration-resistant prostate cancer (COU-AA-302): final overall survival analysis of a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2015;16(2):152-60.
7. Scher HI, Fizazi K, Saad F, Taplin ME, Sternberg CN, Miller K, et al. Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *N Engl J Med.* 2012;367(13):1187-97.
8. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med.* 2004;351(15):1502-12.
9. Beer TM, Armstrong AJ, Rathkopf DE, Loriot Y, Sternberg CN, Higano CS, et al. Enzalutamide in metastatic prostate cancer before chemotherapy. *N Engl J Med.* 2014;371(5):424-33.
10. Fizazi K, Scher HI, Molina A, Logothetis CJ, Chi KN, Jones RJ, et al. Abiraterone acetate for treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer: final overall survival analysis of the COU-AA-301 randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2012;13(10):983-92.
11. de Bono JS, Oudard S, Ozguroglu M, Hansen S, Machiels JP, Kocak I, et al. Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *Lancet.* 2010;376(9747):1147-54.
12. Oudard S, Fizazi K, Sengelov L, Daugaard G, Saad F, Hansen S, et al. Cabazitaxel Versus Docetaxel As First-Line Therapy for Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: A Randomized Phase III Trial-FIRSTANA. *J Clin Oncol.* 2017;35(28):3189-97.
13. Hoskin P, Sartor O, O'Sullivan JM, Johannessen DC, Helle SI, Logue J, et al. Efficacy and safety of radium-223 dichloride in patients with castration-resistant prostate cancer and symptomatic bone metastases, with or without previous docetaxel use: a prespecified subgroup analysis from the randomised, double-blind, phase 3 ALSYMPCA trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(12):1397-406.
14. Pantel K, Hille C, Scher HI. Circulating Tumor Cells in Prostate Cancer: From Discovery to Clinical Utility. *Clin Chem.* 2019;65(1):87-99.
15. Scher HI, Lu D, Schreiber NA, Louw J, Graf RP, Vargas HA, et al. Association of AR-V7 on Circulating Tumor Cells as a Treatment-Specific Biomarker With Outcomes and Survival in Castration-Resistant Prostate Cancer. *JAMA Oncol.* 2016;2(11):1441-9.
16. Antonarakis ES, Lu C, Wang H, Lubner B, Nakazawa M, Roeser JC, et al. AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *N Engl J Med.* 2014;371(11):1028-38.
17. Tagawa ST, Antonarakis ES, Gjyzezi A, Galletti G, Kim S, Worroll D, et al. Expression of AR-V7 and ARv(567es) in Circulating Tumor Cells Correlates with Outcomes to Taxane Therapy in Men with Metastatic Prostate Cancer Treated in TAXYNERGY. *Clin Cancer Res.* 2019;25(6):1880-8.
18. Antonarakis ES, Lu C, Lubner B, Wang H, Chen Y, Zhu Y, et al. Clinical Significance of Androgen Receptor Splice Variant-7 mRNA Detection in Circulating Tumor Cells of Men With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Treated With First- and Second-Line Abiraterone and Enzalutamide. *J Clin Oncol.* 2017;35(19):2149-56.
19. Hu R, Dunn TA, Wei S, Isharwal S, Veltri RW, Humphreys E, et al. Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* 2009;69(1):16-22.
20. William K. Purves DS, Gordon H. Orians, H. Craig Heller. *Biologie 7te Auflage ; Kap.Chromosomen, Zellzyklus und Zellteilung; Seite 201-208. ; ISBN: 3827426502*

21. Antonarakis ES, Lu C, Luber B, Wang H, Chen Y, Nakazawa M, et al. Androgen Receptor Splice Variant 7 and Efficacy of Taxane Chemotherapy in Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *JAMA Oncol.* 2015;1(5):582-91.
22. Mikeska T, Craig JM. DNA methylation biomarkers: cancer and beyond. *Genes (Basel).* 2014;5(3):821-64.
23. Beltran H, Antonarakis ES, Morris MJ, Attard G. Emerging Molecular Biomarkers in Advanced Prostate Cancer: Translation to the Clinic. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2016;35:131-41.
24. Emmett L, Yin C, Crumbaker M, Hruby G, Kneebone A, Epstein R, et al. Rapid Modulation of PSMA Expression by Androgen Deprivation: Serial (68)Ga-PSMA-11 PET in Men with Hormone-Sensitive and Castrate-Resistant Prostate Cancer Commencing Androgen Blockade. *J Nucl Med.* 2019;60(7):950-4.
25. de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2008;14(19):6302-9.
26. Dorff TB, Fanti S, Farolfi A, Reiter RE, Sadun TY, Sartor O. The Evolving Role of Prostate-Specific Membrane Antigen-Based Diagnostics and Therapeutics in Prostate Cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2019;39:321-30.
27. Kummur S, Chen A, Ji J, Zhang Y, Reid JM, Ames M, et al. Phase I study of PARP inhibitor ABT-888 in combination with topotecan in adults with refractory solid tumors and lymphomas. *Cancer Res.* 2011;71(17):5626-34.
28. Cohen SJ, Alpaugh RK, Gross S, O'Hara SM, Smirnov DA, Terstappen LW, et al. Isolation and characterization of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Clinical colorectal cancer.* 2006;6(2):125-32.
29. Devriese LA, Voest EE, Beijnen JH, Schellens JH. Circulating tumor cells as pharmacodynamic biomarker in early clinical oncological trials. *Cancer treatment reviews.* 2011;37(8):579-89.
30. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
31. Schehr JL, Schultz ZD, Warrick JW, Guckenberger DJ, Pezzi HM, Sperger JM, et al. High Specificity in Circulating Tumor Cell Identification Is Required for Accurate Evaluation of Programmed Death-Ligand 1. *PLoS One.* 2016;11(7):e0159397.
32. Hille C, Gorges TM, Riethdorf S, Mazel M, Steuber T, Amsberg GV, et al. Detection of Androgen Receptor Variant 7 (ARV7) mRNA Levels in EpCAM-Enriched CTC Fractions for Monitoring Response to Androgen Targeting Therapies in Prostate Cancer. *Cells.* 2019;8(9).
33. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Pineros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer.* 2019;144(8):1941-53.
34. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015;136(5):E359-86.
35. Prostate Cancer: Statistics [Internet]; approved by the Cancer.Net Editorial Board, adapted from the American Cancer Society's (ACS) publication, *Cancer Facts & Figures 2020*, and the ACS website [zitiert am 08.03.2020] URL: <https://www.cancer.net/cancer-types/prostate-cancer/statistics>. 01/2020.
36. Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *European journal of cancer.* 2001;37 Suppl 8:S4-66.
37. Potosky AL, Miller BA, Albertsen PC, Kramer BS. The role of increasing detection in the rising incidence of prostate cancer. *Jama.* 1995;273(7):548-52.
38. Boyle P, Gandini S, Baglietto L, Severi G, Robertson C. Epidemiology of prostate cancer. *European urology.* 2001;39 Suppl 4:2-3.
39. Gronberg H. Prostate cancer epidemiology. *Lancet.* 2003;361(9360):859-64.
40. Mettlin CJ, Murphy GP, Ho R, Menck HR. The National Cancer Data Base report on longitudinal observations on prostate cancer. *Cancer.* 1996;77(10):2162-6.
41. Sakr WA, Haas GP, Cassin BF, Pontes JE, Crissman JD. The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients. *The Journal of urology.* 1993;150(2 Pt 1):379-85.
42. Hakenberg OW. *Facharztwissen Urologie Schmelz, Sparwasser, Weidner: Kapitel 23.0 Prostatakarzinom* ISBN 978-3-642-44941-3, 3te Auflage, 2014, Springer Verlag
43. Damber JE, Aus G. Prostate cancer. *Lancet.* 2008;371(9625):1710-21.
44. Demichelis F, Stanford JL. Genetic predisposition to prostate cancer: Update and future perspectives. *Urol Oncol.* 2015;33(2):75-84.
45. Ostrander EA, Kwon EM, Stanford JL. Genetic susceptibility to aggressive prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(10):1761-4.

46. Ostrander EA, Stanford JL. Genetics of prostate cancer: too many loci, too few genes. *Am J Hum Genet.* 2000;67(6):1367-75.
47. Hjelmborg JB, Scheike T, Holst K, Skytthe A, Penney KL, Graff RE, et al. The heritability of prostate cancer in the Nordic Twin Study of Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23(11):2303-10.
48. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *The New England journal of medicine.* 2000;343(2):78-85.
49. Al Olama AA, Kote-Jarai Z, Berndt SI, Conti DV, Schumacher F, Han Y, et al. A meta-analysis of 87,040 individuals identifies 23 new susceptibility loci for prostate cancer. *Nat Genet.* 2014;46(10):1103-9.
50. Lin DW, FitzGerald LM, Fu R, Kwon EM, Zheng SL, Kolb S, et al. Genetic variants in the LEPR, CRY1, RNASEL, IL4, and ARVCF genes are prognostic markers of prostate cancer-specific mortality. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20(9):1928-36.
51. Ewing CM, Ray AM, Lange EM, Zuhlke KA, Robbins CM, Tembe WD, et al. Germline mutations in HOXB13 and prostate-cancer risk. *The New England journal of medicine.* 2012;366(2):141-9.
52. Bartsch G, Horninger W, Klocker H, Pelzer A, Bektic J, Oberaigner W, et al. Tyrol Prostate Cancer Demonstration Project: early detection, treatment, outcome, incidence and mortality. *BJU international.* 2008;101(7):809-16.
53. Demichelis F, Setlur SR, Banerjee S, Chakravarty D, Chen JY, Chen CX, et al. Identification of functionally active, low frequency copy number variants at 15q21.3 and 12q21.31 associated with prostate cancer risk. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(17):6686-91.
54. Giovannucci E, Stampfer MJ, Krithivas K, Brown M, Dahl D, Brufsky A, et al. The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(7):3320-3.
55. Irvine RA, Yu MC, Ross RK, Coetzee GA. The CAG and GGC microsatellites of the androgen receptor gene are in linkage disequilibrium in men with prostate cancer. *Cancer Res.* 1995;55(9):1937-40.
56. Sun JH, Lee SA. Association between CAG repeat polymorphisms and the risk of prostate cancer: a meta-analysis by race, study design and the number of (CAG)_n repeat polymorphisms. *Int J Mol Med.* 2013;32(5):1195-203.
57. Howell MA. Factor analysis of international cancer mortality data and per capita food consumption. *British journal of cancer.* 1974;29(4):328-36.
58. Bianchini F, Kaaks R, Vainio H. Overweight, obesity, and cancer risk. *Lancet Oncol.* 2002;3(9):565-74.
59. Etminan M, Takkouche B, Caamano-Isorna F. The role of tomato products and lycopene in the prevention of prostate cancer: a meta-analysis of observational studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13(3):340-5.
60. Schroder FH. Progress in understanding androgen-independent prostate cancer (AIPC): a review of potential endocrine-mediated mechanisms. *European urology.* 2008;53(6):1129-37.
61. Attard G, Reid AH, Olmos D, de Bono JS. Antitumor activity with CYP17 blockade indicates that castration-resistant prostate cancer frequently remains hormone driven. *Cancer Res.* 2009;69(12):4937-40.
62. Massard C, Fizazi K. Targeting continued androgen receptor signaling in prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2011;17(12):3876-83.
63. Hussain M, Tangen CM, Berry DL, Higano CS, Crawford ED, Liu G, et al. Intermittent versus continuous androgen deprivation in prostate cancer. *N Engl J Med.* 2013;368(14):1314-25.
64. Beer TM, Armstrong AJ, Rathkopf D, Loriot Y, Sternberg CN, Higano CS, et al. Enzalutamide in Men with Chemotherapy-naive Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer: Extended Analysis of the Phase 3 PREVAIL Study. *Eur Urol.* 2017;71(2):151-4.
65. Lindzey J, Kumar MV, Grossman M, Young C, Tindall DJ. Molecular mechanisms of androgen action. *Vitam Horm.* 1994;49:383-432.
66. Eine Reise durch die Physiologie - Wie der Körper des Menschen funktioniert [Internet]; published by © H. Hinghofer-Szalkay [zitiert am 08.03.2020]; URL: <http://physiologie.cc/XIII.1.htm>.
67. Heidenreich A, Bastian PJ, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, van der Kwast T, et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer. *European urology.* 2014;65(2):467-79.
68. Klotz L, O'Callaghan C, Ding K, Toren P, Dearnaley D, Higano CS, et al. Nadir testosterone within first year of androgen-deprivation therapy (ADT) predicts for time to castration-resistant progression: a secondary analysis of the PR-7 trial of intermittent versus continuous ADT. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2015;33(10):1151-6.

69. Lu NZ, Wardell SE, Burnstein KL, Defranco D, Fuller PJ, Giguere V, et al. International Union of Pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors. *Pharmacol Rev.* 2006;58(4):782-97.
70. Koochekpour S. Androgen receptor signaling and mutations in prostate cancer. *Asian J Androl.* 2010;12(5):639-57.
71. Hughes IA, Werner R, Bunch T, Hiort O. Androgen insensitivity syndrome. *Semin Reprod Med.* 2012;30(5):432-42.
72. Gottlieb B, Beitel LK, Nadarajah A, Paliouras M, Trifiro M. The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. *Hum Mutat.* 2012;33(5):887-94.
73. Wilson CM, McPhaul MJ. A and B forms of the androgen receptor are expressed in a variety of human tissues. *Mol Cell Endocrinol.* 1996;120(1):51-7.
74. Gao T, McPhaul MJ. Functional activities of the A and B forms of the human androgen receptor in response to androgen receptor agonists and antagonists. *Mol Endocrinol.* 1998;12(5):654-63.
75. Zeng R, Liu Z, Sun Y, Xu C. Differential expression and function of AR isoforms in prostate cancer. *Oncol Rep.* 2012;27(2):492-8.
76. Shen HC, Balk SP. Development of androgen receptor antagonists with promising activity in castration-resistant prostate cancer. *Cancer Cell.* 2009;15(6):461-3.
77. Jenster G, van der Korput HA, Trapman J, Brinkmann AO. Identification of two transcription activation units in the N-terminal domain of the human androgen receptor. *The Journal of biological chemistry.* 1995;270(13):7341-6.
78. Alen P, Claessens F, Verhoeven G, Rombauts W, Peeters B. The androgen receptor amino-terminal domain plays a key role in p160 coactivator-stimulated gene transcription. *Mol Cell Biol.* 1999;19(9):6085-97.
79. Reid J, Kelly SM, Watt K, Price NC, McEwan IJ. Conformational analysis of the androgen receptor amino-terminal domain involved in transactivation. Influence of structure-stabilizing solutes and protein-protein interactions. *J Biol Chem.* 2002;277(22):20079-86.
80. Chamberlain NL, Whitacre DC, Miesfeld RL. Delineation of two distinct type 1 activation functions in the androgen receptor amino-terminal domain. *J Biol Chem.* 1996;271(43):26772-8.
81. Zhou ZX, Sar M, Simental JA, Lane MV, Wilson EM. A ligand-dependent bipartite nuclear targeting signal in the human androgen receptor. Requirement for the DNA-binding domain and modulation by NH₂-terminal and carboxyl-terminal sequences. *J Biol Chem.* 1994;269(18):13115-23.
82. Helsen C, Claessens F. Looking at nuclear receptors from a new angle. *Mol Cell Endocrinol.* 2014;382(1):97-106.
83. Schoenmakers E, Alen P, Verrijdt G, Peeters B, Verhoeven G, Rombauts W, et al. Differential DNA binding by the androgen and glucocorticoid receptors involves the second Zn-finger and a C-terminal extension of the DNA-binding domains. *Biochem J.* 1999;341 (Pt 3):515-21.
84. Haelens A, Tanner T, Denayer S, Callewaert L, Claessens F. The hinge region regulates DNA binding, nuclear translocation, and transactivation of the androgen receptor. *Cancer Res.* 2007;67(9):4514-23.
85. Clinckemalie L, Vanderschueren D, Boonen S, Claessens F. The hinge region in androgen receptor control. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;358(1):1-8.
86. Buchanan G, Greenberg NM, Scher HI, Harris JM, Marshall VR, Tilley WD. Collocation of androgen receptor gene mutations in prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2001;7(5):1273-81.
87. Tan MH, Li J, Xu HE, Melcher K, Yong EL. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin.* 2015;36(1):3-23.
88. Matias PM, Donner P, Coelho R, Thomaz M, Peixoto C, Macedo S, et al. Structural evidence for ligand specificity in the binding domain of the human androgen receptor. Implications for pathogenic gene mutations. *J Biol Chem.* 2000;275(34):26164-71.
89. Poujol N, Wurtz JM, Tahiri B, Lumbroso S, Nicolas JC, Moras D, et al. Specific recognition of androgens by their nuclear receptor. A structure-function study. *J Biol Chem.* 2000;275(31):24022-31.
90. Danielian PS, White R, Lees JA, Parker MG. Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J.* 1992;11(3):1025-33.
91. vom Baur E, Zechel C, Heery D, Heine MJ, Garnier JM, Vivat V, et al. Differential ligand-dependent interactions between the AF-2 activating domain of nuclear receptors and the putative transcriptional intermediary factors mSUG1 and TIF1. *EMBO J.* 1996;15(1):110-24.
92. Slagsvold T, Kraus I, Bentzen T, Palvimo J, Saatcioglu F. Mutational analysis of the androgen receptor AF-2 (activation function 2) core domain reveals functional and mechanistic differences of conserved residues compared with other nuclear receptors. *Mol Endocrinol.* 2000;14(10):1603-17.

93. Berrevoets CA, Doesburg P, Steketeer K, Trapman J, Brinkmann AO. Functional interactions of the AF-2 activation domain core region of the human androgen receptor with the amino-terminal domain and with the transcriptional coactivator TIF2 (transcriptional intermediary factor 2). *Mol Endocrinol*. 1998;12(8):1172-83.
94. Sar M, Lubahn DB, French FS, Wilson EM. Immunohistochemical localization of the androgen receptor in rat and human tissues. *Endocrinology*. 1990;127(6):3180-6.
95. Papadopoulou N, Papakonstanti EA, Kallergi G, Alevizopoulos K, Stournaras C. Membrane androgen receptor activation in prostate and breast tumor cells: molecular signaling and clinical impact. *IUBMB Life*. 2009;61(1):56-61.
96. Fang Y, Fliss AE, Robins DM, Caplan AJ. Hsp90 regulates androgen receptor hormone binding affinity in vivo. *J Biol Chem*. 1996;271(45):28697-702.
97. Lamoureux F, Thomas C, Yin MJ, Kuruma H, Fazli L, Gleave ME, et al. A novel HSP90 inhibitor delays castrate-resistant prostate cancer without altering serum PSA levels and inhibits osteoclastogenesis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(8):2301-13.
98. Lamoureux F, Thomas C, Yin MJ, Fazli L, Zoubeidi A, Gleave ME. Suppression of heat shock protein 27 using OGX-427 induces endoplasmic reticulum stress and potentiates heat shock protein 90 inhibitors to delay castrate-resistant prostate cancer. *European urology*. 2014;66(1):145-55.
99. Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, Zhang L, Boehm MF, Fritz LC, et al. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature*. 2003;425(6956):407-10.
100. Chiosis G, Huezio H, Rosen N, Mimnaugh E, Whitesell L, Neckers L. 17AAG: low target binding affinity and potent cell activity--finding an explanation. *Molecular cancer therapeutics*. 2003;2(2):123-9.
101. Tyagi RK, Lavrovsky Y, Ahn SC, Song CS, Chatterjee B, Roy AK. Dynamics of intracellular movement and nucleocytoplasmic recycling of the ligand-activated androgen receptor in living cells. *Mol Endocrinol*. 2000;14(8):1162-74.
102. Gorlich D, Kutay U. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1999;15:607-60.
103. Cutress ML, Whitaker HC, Mills IG, Stewart M, Neal DE. Structural basis for the nuclear import of the human androgen receptor. *J Cell Sci*. 2008;121(Pt 7):957-68.
104. Shafi AA, Yen AE, Weigel NL. Androgen receptors in hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer. *Pharmacology & therapeutics*. 2013;140(3):223-38.
105. Jin L, Garcia J, Chan E, de la Cruz C, Segal E, Merchant M, et al. Therapeutic Targeting of the CBP/p300 Bromodomain Blocks the Growth of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancer Res*. 2017;77(20):5564-75.
106. Laschak M, Bechtel M, Spindler KD, Hessenauer A. Inability of NCoR/SMRT to repress androgen receptor transcriptional activity in prostate cancer cell lines. *Int J Mol Med*. 2011;28(4):645-51.
107. Beato M, Chalepakis G, Schauer M, Slater EP. DNA regulatory elements for steroid hormones. *J Steroid Biochem*. 1989;32(5):737-47.
108. Beato M, Herrlich P, Schutz G. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell*. 1995;83(6):851-7.
109. Miller K. [Review on quality of life in CRPC patients]. *Aktuelle Urol*. 2017;48(3):219-24.
110. Langley RR, Fidler IJ. The seed and soil hypothesis revisited--the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *Int J Cancer*. 2011;128(11):2527-35.
111. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*. 2011;147(2):275-92.
112. Oppenheimer SB. Cellular basis of cancer metastasis: A review of fundamentals and new advances. *Acta Histochem*. 2006;108(5):327-34.
113. Alix-Panabieres C, Pantel K. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. *Cancer Discov*. 2016;6(5):479-91.
114. Pezaro CJ, Omlin A, Lorente D, Nava Rodrigues D, Ferraldeschi R, Bianchini D, et al. Visceral disease in castration-resistant prostate cancer. *European urology*. 2014;65(2):270-3.
115. Halabi S, Lin CY, Kelly WK, Fizazi KS, Moul JW, Kaplan EB, et al. Updated prognostic model for predicting overall survival in first-line chemotherapy for patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(7):671-7.
116. Batson. *Clin Orthop Relat Res*. 1995 Mar;(312):4-9. The function of the vertebral veins and their role in the spread of metastases. 1940
117. Nguyen DX, Bos PD, Massague J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(4):274-84.

118. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(8):563-72.
119. Keller ET, Zhang J, Cooper CR, Smith PC, McCauley LK, Pienta KJ, et al. Prostate carcinoma skeletal metastases: cross-talk between tumor and bone. *Cancer metastasis reviews*. 2001;20(3-4):333-49.
120. Nielsen OS, Munro AJ, Tannock IF. Bone metastases: pathophysiology and management policy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1991;9(3):509-24.
121. Macedo F, Ladeira K, Pinho F, Saraiva N, Bonito N, Pinto L, et al. Bone Metastases: An Overview. *Oncol Rev*. 2017;11(1):321.
122. Tfelt-Hansen J, Chattopadhyay N, Yano S, Kanuparthi D, Rooney P, Schwarz P, et al. Calcium-sensing receptor induces proliferation through p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase but not extracellularly regulated kinase in a model of humoral hypercalcemia of malignancy. *Endocrinology*. 2004;145(3):1211-7.
123. Heidenreich A, Pfister D. Pelvic lymphadenectomy in clinically localised prostate cancer: counting lymph nodes or dissecting primary landing zones of the prostate? *European urology*. 2014;66(3):447-9.
124. Gandaglia G, Karakiewicz PI, Briganti A, Passoni NM, Schiffmann J, Trudeau V, et al. Impact of the Site of Metastases on Survival in Patients with Metastatic Prostate Cancer. *European urology*. 2015;68(2):325-34.
125. Fang J, Xu Q. Differences of osteoblastic bone metastases and osteolytic bone metastases in clinical features and molecular characteristics. *Clin Transl Oncol*. 2015;17(3):173-9.
126. Scher HI, Morris MJ, Stadler WM, Higano C, Basch E, Fizazi K, et al. Trial Design and Objectives for Castration-Resistant Prostate Cancer: Updated Recommendations From the Prostate Cancer Clinical Trials Working Group 3. *J Clin Oncol*. 2016;34(12):1402-18.
127. Halabi S, Kelly WK, Ma H, Zhou H, Solomon NC, Fizazi K, et al. Meta-Analysis Evaluating the Impact of Site of Metastasis on Overall Survival in Men With Castration-Resistant Prostate Cancer. *J Clin Oncol*. 2016;34(14):1652-9.
128. Crawford ED, Stone NN, Yu EY, Koo PJ, Freedland SJ, Slovin SF, et al. Challenges and recommendations for early identification of metastatic disease in prostate cancer. *Urology*. 2014;83(3):664-9.
129. Cornford P, Bellmunt J, Bolla M, Briers E, De Santis M, Gross T, et al. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part II: Treatment of Relapsing, Metastatic, and Castration-Resistant Prostate Cancer. *European urology*. 2017;71(4):630-42.
130. Michel MS, Thüroff, J., Janetschek, G., Wirth, M.P. . *Die Urologie, Band 2 ; Wirth et al. Kap. Prostatakarzinom, Seite 1305ff.; ISBN: 978-3-642-39940-4.*
131. Burt BM, Humm JL, Kooby DA, Squire OD, Mastorides S, Larson SM, et al. Using positron emission tomography with [(18)F]FDG to predict tumor behavior in experimental colorectal cancer. *Neoplasia*. 2001;3(3):189-95.
132. Schreiter V, Reimann C, Geisel D, Schreiter NF. Nuclear Medicine Imaging of Prostate Cancer. *Rofo*. 2016;188(11):1037-44.
133. Weineisen M, Schottelius M, Simecek J, Baum RP, Yildiz A, Beykan S, et al. 68Ga- and 177Lu-Labeled PSMA I&T: Optimization of a PSMA-Targeted Theranostic Concept and First Proof-of-Concept Human Studies. *J Nucl Med*. 2015;56(8):1169-76.
134. S3-Leitlinie Prostatakarzinom [Internet]; Version 5.1, 2019; 7. Diagnostik und Therapie des rezidivierten oder metastasierten Prostatakarzinoms [zitiert am 08.03.2020], URL: https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Prostata_5_0/LL_Prostatakarzinom_Langversion_5.1.pdf , 05/20119.
135. Rahbar K, Ahmadzadehfar H, Kratochwil C, Haberkorn U, Schafers M, Essler M, et al. German Multicenter Study Investigating 177Lu-PSMA-617 Radioligand Therapy in Advanced Prostate Cancer Patients. *J Nucl Med*. 2017;58(1):85-90.
136. Rahbar K, Afshar-Oromieh A, Jadvar H, Ahmadzadehfar H. PSMA Theranostics: Current Status and Future Directions. *Mol Imaging*. 2018;17:1536012118776068.
137. Hofman MS, Violet J, Hicks RJ, Ferdinandus J, Thang SP, Akhurst T, et al. [(177)Lu]-PSMA-617 radionuclide treatment in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (LuPSMA trial): a single-centre, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2018;19(6):825-33.
138. Yu EY, Gulati R, Telesca D, Jiang P, Tam S, Russell KJ, et al. Duration of first off-treatment interval is prognostic for time to castration resistance and death in men with biochemical relapse of prostate cancer treated on a prospective trial of intermittent androgen deprivation. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(16):2668-73.

139. Sweeney CJ, Chen YH, Carducci M, Liu G, Jarrard DF, Eisenberger M, et al. Chemohormonal Therapy in Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer. *The New England journal of medicine*. 2015;373(8):737-46.
140. James ND, Sydes MR, Clarke NW, Mason MD, Dearnaley DP, Spears MR, et al. Addition of docetaxel, zoledronic acid, or both to first-line long-term hormone therapy in prostate cancer (STAMPEDE): survival results from an adaptive, multiarm, multistage, platform randomised controlled trial. *Lancet*. 2016;387(10024):1163-77.
141. James ND, de Bono JS, Spears MR, Clarke NW, Mason MD, Dearnaley DP, et al. Abiraterone for Prostate Cancer Not Previously Treated with Hormone Therapy. *The New England journal of medicine*. 2017.
142. Fizazi K, Tran N, Fein L, Matsubara N, Rodriguez-Antolin A, Alekseev BY, et al. Abiraterone plus Prednisone in Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer. *The New England journal of medicine*. 2017.
143. El-Amm J, Aragon-Ching JB. The Current Landscape of Treatment in Non-Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin Med Insights Oncol*. 2019;13:1179554919833927.
144. Terada N, Maughan BL, Akamatsu S, Kobayashi T, Yamasaki T, Inoue T, et al. Exploring the optimal sequence of abiraterone and enzalutamide in patients with chemotherapy-naïve castration-resistant prostate cancer: The Kyoto-Baltimore collaboration. *Int J Urol*. 2017;24(6):441-8.
145. Merseburger AS, Hammerer P, Rozet F, Roumeguere T, Caffo O, da Silva FC, et al. Androgen deprivation therapy in castrate-resistant prostate cancer: how important is GnRH agonist backbone therapy? *World J Urol*. 2015;33(8):1079-85.
146. Gillessen S, Attard G, Beer TM, Beltran H, Bjartell A, Bossi A, et al. Management of Patients with Advanced Prostate Cancer: Report of the Advanced Prostate Cancer Consensus Conference 2019. *Eur Urol*. 2020.
147. Fizazi K, Carducci M, Smith M, Damiao R, Brown J, Karsh L, et al. Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study. *Lancet*. 2011;377(9768):813-22.
148. Saad F, Gleason DM, Murray R, Tchekmedyian S, Venner P, Lacombe L, et al. A randomized, placebo-controlled trial of zoledronic acid in patients with hormone-refractory metastatic prostate carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 2002;94(19):1458-68.
149. Bilezikian JP, Grbic JT. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw: proceedings of an international conference. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1218:1-2.
150. Mateo J, Smith A, Ong M, de Bono JS. Novel drugs targeting the androgen receptor pathway in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2014;33(2-3):567-79.
151. Attard G, Reid AH, A'Hern R, Parker C, Oommen NB, Folklerd E, et al. Selective inhibition of CYP17 with abiraterone acetate is highly active in the treatment of castration-resistant prostate cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(23):3742-8.
152. Ryan CJ, Smith MR, de Bono JS, Molina A, Logothetis CJ, de Souza P, et al. Abiraterone in metastatic prostate cancer without previous chemotherapy. *The New England journal of medicine*. 2013;368(2):138-48.
153. Rathkopf DE, Smith MR, de Bono JS, Logothetis CJ, Shore ND, de Souza P, et al. Updated interim efficacy analysis and long-term safety of abiraterone acetate in metastatic castration-resistant prostate cancer patients without prior chemotherapy (COU-AA-302). *European urology*. 2014;66(5):815-25.
154. Logothetis CJ, Basch E, Molina A, Fizazi K, North SA, Chi KN, et al. Effect of abiraterone acetate and prednisone compared with placebo and prednisone on pain control and skeletal-related events in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: exploratory analysis of data from the COU-AA-301 randomised trial. *Lancet Oncol*. 2012;13(12):1210-7.
155. Tran C, Ouk S, Clegg NJ, Chen Y, Watson PA, Arora V, et al. Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science*. 2009;324(5928):787-90.
156. Larson SM, Morris M, Gunther I, Beattie B, Humm JL, Akhurst TA, et al. Tumor localization of 16beta-18F-fluoro-5alpha-dihydrotestosterone versus 18F-FDG in patients with progressive, metastatic prostate cancer. *J Nucl Med*. 2004;45(3):366-73.
157. Scher HI, Beer TM, Higano CS, Anand A, Taplin ME, Efsthathiou E, et al. Antitumour activity of MDV3100 in castration-resistant prostate cancer: a phase 1-2 study. *Lancet*. 2010;375(9724):1437-46.
158. Heidenreich A, Chowdhury S, Klotz L, Siemens DR, Villers A, Ivanescu C, et al. Impact of Enzalutamide Compared with Bicalutamide on Quality of Life in Men with Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer: Additional Analyses from the TERRAIN Randomised Clinical Trial. *European urology*. 2017;71(4):534-42.
159. Higano CS, Beer TM, Taplin ME, Efsthathiou E, Hirmand M, Forer D, et al. Long-term Safety and Antitumor Activity in the Phase 1-2 Study of Enzalutamide in Pre- and Post-docetaxel Castration-Resistant Prostate Cancer. *European urology*. 2015;68(5):795-801.

160. Tannock IF, Osoba D, Stockler MR, Ernst DS, Neville AJ, Moore MJ, et al. Chemotherapy with mitoxantrone plus prednisone or prednisone alone for symptomatic hormone-resistant prostate cancer: a Canadian randomized trial with palliative end points. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1996;14(6):1756-64.
161. Berry W, Dakhil S, Modiano M, Gregurich M, Asmar L. Phase III study of mitoxantrone plus low dose prednisone versus low dose prednisone alone in patients with asymptomatic hormone refractory prostate cancer. *The Journal of urology*. 2002;168(6):2439-43.
162. Yvon AM, Wadsworth P, Jordan MA. Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells. *Mol Biol Cell*. 1999;10(4):947-59.
163. Snyder JP, Nettles JH, Cornett B, Downing KH, Nogales E. The binding conformation of Taxol in beta-tubulin: a model based on electron crystallographic density. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(9):5312-6.
164. Schiff PB, Horwitz SB. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77(3):1561-5.
165. Parness J, Horwitz SB. Taxol binds to polymerized tubulin in vitro. *J Cell Biol*. 1981;91(2 Pt 1):479-87.
166. de Bono JS, Smith MR, Saad F, Rathkopf DE, Mulders PFA, Small EJ, et al. Subsequent Chemotherapy and Treatment Patterns After Abiraterone Acetate in Patients with Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer: Post Hoc Analysis of COU-AA-302. *Eur Urol*. 2017;71(4):656-64.
167. Hurwitz M. Chemotherapy in Prostate Cancer. *Curr Oncol Rep*. 2015;17(10):44.
168. Oudard S. TROPIC: Phase III trial of cabazitaxel for the treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer. *Future Oncol*. 2011;7(4):497-506.
169. Heidenreich A, Bracarda S, Mason M, Ozen H, Sengelov L, Van Oort I, et al. Safety of cabazitaxel in senior adults with metastatic castration-resistant prostate cancer: results of the European compassionate-use programme. *Eur J Cancer*. 2014;50(6):1090-9.
170. Gregory CW, He B, Wilson EM. The putative androgen receptor-A form results from in vitro proteolysis. *J Mol Endocrinol*. 2001;27(3):309-19.
171. Wadosky KM, Koochekpour S. Androgen receptor splice variants and prostate cancer: From bench to bedside. *Oncotarget*. 2017;8(11):18550-76.
172. Welti J, Rodrigues DN, Sharp A, Sun S, Lorente D, Riisnaes R, et al. Analytical Validation and Clinical Qualification of a New Immunohistochemical Assay for Androgen Receptor Splice Variant-7 Protein Expression in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Eur Urol*. 2016;70(4):599-608.
173. Qu Y, Dai B, Ye D, Kong Y, Chang K, Jia Z, et al. Constitutively active AR-V7 plays an essential role in the development and progression of castration-resistant prostate cancer. *Sci Rep*. 2015;5:7654.
174. Lamb AD, Massie CE, Neal DE. The transcriptional programme of the androgen receptor (AR) in prostate cancer. *BJU Int*. 2014;113(3):358-66.
175. Visakorpi T, Hyytinen E, Koivisto P, Tanner M, Keinänen R, Palmberg C, et al. In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet*. 1995;9(4):401-6.
176. Tan J, Sharief Y, Hamil KG, Gregory CW, Zang DY, Sar M, et al. Dehydroepiandrosterone activates mutant androgen receptors expressed in the androgen-dependent human prostate cancer xenograft CWR22 and LNCaP cells. *Mol Endocrinol*. 1997;11(4):450-9.
177. Duff J, McEwan IJ. Mutation of histidine 874 in the androgen receptor ligand-binding domain leads to promiscuous ligand activation and altered p160 coactivator interactions. *Mol Endocrinol*. 2005;19(12):2943-54.
178. Massie CE, Adryan B, Barbosa-Morais NL, Lynch AG, Tran MG, Neal DE, et al. New androgen receptor genomic targets show an interaction with the ETS1 transcription factor. *EMBO Rep*. 2007;8(9):871-8.
179. Risbridger GP, Davis ID, Birrell SN, Tilley WD. Breast and prostate cancer: more similar than different. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(3):205-12.
180. Price D, Stein B, Sieber P, Tutrone R, Bailen J, Goluboff E, et al. Toremifene for the prevention of prostate cancer in men with high grade prostatic intraepithelial neoplasia: results of a double-blind, placebo controlled, phase IIB clinical trial. *J Urol*. 2006;176(3):965-70; discussion 70-1.
181. Toivanen R, Frydenberg M, Murphy D, Pedersen J, Ryan A, Pook D, et al. A preclinical xenograft model identifies castration-tolerant cancer-repopulating cells in localized prostate tumors. *Sci Transl Med*. 2013;5(187):187ra71.
182. Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev*. 2000;52(4):513-56.
183. Nazareth LV, Weigel NL. Activation of the human androgen receptor through a protein kinase A signaling pathway. *J Biol Chem*. 1996;271(33):19900-7.
184. Ikonen T, Palvimo JJ, Kallio PJ, Reinikainen P, Janne OA. Stimulation of androgen-regulated transactivation by modulators of protein phosphorylation. *Endocrinology*. 1994;135(4):1359-66.

185. Zarif JC, Lamb LE, Schulz VV, Nollet EA, Miranti CK. Androgen receptor non-nuclear regulation of prostate cancer cell invasion mediated by Src and matriptase. *Oncotarget*. 2015;6(9):6862-76.
186. Peterziel H, Mink S, Schonert A, Becker M, Klocker H, Cato AC. Rapid signalling by androgen receptor in prostate cancer cells. *Oncogene*. 1999;18(46):6322-9.
187. Lange CA, Gioeli D, Hammes SR, Marker PC. Integration of rapid signaling events with steroid hormone receptor action in breast and prostate cancer. *Annu Rev Physiol*. 2007;69:171-99.
188. Heinlein CA, Chang C. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol Endocrinol*. 2002;16(10):2181-7.
189. Wehling M. Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu Rev Physiol*. 1997;59:365-93.
190. Revelli A, Massobrio M, Tesarik J. Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues. *Endocr Rev*. 1998;19(1):3-17.
191. Zhu ML, Kyprianou N. Androgen receptor and growth factor signaling cross-talk in prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer*. 2008;15(4):841-9.
192. Press B, Schulster M, Bjurlin MA. Differentiating Molecular Risk Assessments for Prostate Cancer. *Rev Urol*. 2018;20(1):12-8.
193. Hatakeyama S, Yoneyama T, Tobisawa Y, Ohyama C. Recent progress and perspectives on prostate cancer biomarkers. *Int J Clin Oncol*. 2017;22(2):214-21.
194. Mateo J, Carreira S, Sandhu S, Miranda S, Mossop H, Perez-Lopez R, et al. DNA-Repair Defects and Olaparib in Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(18):1697-708.
195. Rescigno P, Lorente D, Dolling D, Ferraldeschi R, Rodrigues DN, Riisnaes R, et al. Docetaxel Treatment in PTEN- and ERG-aberrant Metastatic Prostate Cancers. *Eur Urol Oncol*. 2018;1(1):71-7.
196. Reig O, Marin-Aguilera M, Carrera G, Jimenez N, Pare L, Garcia-Recio S, et al. TMPRSS2-ERG in Blood and Docetaxel Resistance in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Eur Urol*. 2016;70(5):709-13.
197. Miyamoto DT, Lee RJ, Stott SL, Ting DT, Wittner BS, Ulman M, et al. Androgen receptor signaling in circulating tumor cells as a marker of hormonally responsive prostate cancer. *Cancer discovery*. 2012;2(11):995-1003.
198. Steinestel J, Luedeke M, Arndt A, Schnoeller TJ, Lennerz JK, Wurm C, et al. Detecting predictive androgen receptor modifications in circulating prostate cancer cells. *Oncotarget*. 2015.
199. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2004;351(8):781-91.
200. Rodriguez-Lee M, Kuhn P, Webb DR. Advancing cancer patient care by integrating circulating tumor cell technology to understand the spatial and temporal dynamics of cancer. *Drug development research*. 2014;75(6):384-92.
201. Conteduca V, Jayaram A, Romero-Laorden N, Wetterskog D, Salvi S, Gurioli G, et al. Plasma Androgen Receptor and Docetaxel for Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Eur Urol*. 2019;75(3):368-73.
202. Evans MJ, Smith-Jones PM, Wongvipat J, Navarro V, Kim S, Bander NH, et al. Noninvasive measurement of androgen receptor signaling with a positron-emitting radiopharmaceutical that targets prostate-specific membrane antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(23):9578-82.
203. Bernemann C, Steinestel J, Boegemann M, Schrader AJ. Novel AR-V7 detection in whole blood samples in patients with prostate cancer: not as simple as it seems. *World J Urol*. 2017;35(10):1625-7.
204. Liu X, Ledet E, Li D, Dotiwala A, Steinberger A, Feibus A, et al. A Whole Blood Assay for AR-V7 and AR(v567es) in Patients with Prostate Cancer. *J Urol*. 2016;196(6):1758-63.
205. Todenhofer T, Azad A, Stewart C, Gao J, Eigl BJ, Gleave ME, et al. AR-V7 Transcripts in Whole Blood RNA of Patients with Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer Correlate with Response to Abiraterone Acetate. *J Urol*. 2017;197(1):135-42.
206. Karantanos T, Corn PG, Thompson TC. Prostate cancer progression after androgen deprivation therapy: mechanisms of castrate resistance and novel therapeutic approaches. *Oncogene*. 2013;32(49):5501-11.
207. Francini E, Petrioli R, Roviello G. No clear evidence of a clinical benefit of a sequential therapy regimen with abiraterone acetate and enzalutamide. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2014;14(10):1135-40.
208. Khalaf DJ, Annala M, Taavitsainen S, Finch DL, Oja C, Vergidis J, et al. Optimal sequencing of enzalutamide and abiraterone acetate plus prednisone in metastatic castration-resistant prostate cancer: a multicentre, randomised, open-label, phase 2, crossover trial. *Lancet Oncol*. 2019;20(12):1730-9.
209. Maughan BL, Lubner B, Nadal R, Antonarakis ES. Comparing Sequencing of Abiraterone and Enzalutamide in Men With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: A Retrospective Study. *Prostate*. 2017;77(1):33-40.

210. Azad AA, Eigel BJ, Murray RN, Kollmannsberger C, Chi KN. Efficacy of enzalutamide following abiraterone acetate in chemotherapy-naive metastatic castration-resistant prostate cancer patients. *Eur Urol*. 2015;67(1):23-9.
211. Zhang T, Dhawan MS, Healy P, George DJ, Harrison MR, Oldan J, et al. Exploring the Clinical Benefit of Docetaxel or Enzalutamide After Disease Progression During Abiraterone Acetate and Prednisone Treatment in Men With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin Genitourin Cancer*. 2015;13(4):392-9.
212. de Wit R, de Bono J, Sternberg CN, Fizazi K, Tombal B, Wulfing C, et al. Cabazitaxel versus Abiraterone or Enzalutamide in Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2019;381(26):2506-18.
213. Lombard AP, Liu L, Cucchiara V, Liu C, Armstrong CM, Zhao R, et al. Intra versus Inter Cross-resistance Determines Treatment Sequence between Taxane and AR-Targeting Therapies in Advanced Prostate Cancer. *Mol Cancer Ther*. 2018;17(10):2197-205.
214. Thadani-Mulero M, Portella L, Sun S, Sung M, Matov A, Vessella RL, et al. Androgen receptor splice variants determine taxane sensitivity in prostate cancer. *Cancer Res*. 2014;74(8):2270-82.
215. Zhang X, Morrissey C, Sun S, Ketchandji M, Nelson PS, True LD, et al. Androgen receptor variants occur frequently in castration resistant prostate cancer metastases. *PLoS One*. 2011;6(11):e27970.
216. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*. 1982;31(1):11-24.
217. Lane EB, Alexander CM. Use of keratin antibodies in tumor diagnosis. *Semin Cancer Biol*. 1990;1(3):165-79.
218. Upasani OS, Vaidya MM, Bhisey AN. Database on monoclonal antibodies to cytokeratins. *Oral Oncol*. 2004;40(3):236-56.
219. Sramkoski RM, Pretlow TG, 2nd, Giaconia JM, Pretlow TP, Schwartz S, Sy MS, et al. A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 1999;35(7):403-9.
220. Wainstein MA, He F, Robinson D, Kung HJ, Schwartz S, Giaconia JM, et al. CWR22: androgen-dependent xenograft model derived from a primary human prostatic carcinoma. *Cancer Res*. 1994;54(23):6049-52.
221. Lu J, Van der Steen T, Tindall DJ. Are androgen receptor variants a substitute for the full-length receptor? *Nat Rev Urol*. 2015;12(3):137-44.
222. Sabatini DD, Bensch K, Barrnett RJ. Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J Cell Biol*. 1963;17:19-58.
223. Kmiec Z. J.A. Kiernan. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. 5th edition, Scion Publishing, 2015, 571 pp. *Folia Histochem Cytobiol*. 2016;54(1):58-9.
224. Bussolati G, Radulescu RT. Blocking endogenous peroxidases in immunohistochemistry: a mandatory, yet also subtle measure. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2011;19(5):484.
225. Weruaga E, Alonso JR, Porteros A, Crespo C, Arevalo R, Brinon JG, et al. Nonspecific labeling of myelin with secondary antisera and high concentrations of Triton X-100. *J Histochem Cytochem*. 1998;46(1):109-18.
226. de Menorval MA, Mir LM, Fernandez ML, Reigada R. Effects of dimethyl sulfoxide in cholesterol-containing lipid membranes: a comparative study of experiments in silico and with cells. *PLoS One*. 2012;7(7):e41733.
227. Wang K, Ruan H, Xu T, Liu L, Liu D, Yang H, et al. Recent advances on the progressive mechanism and therapy in castration-resistant prostate cancer. *Onco Targets Ther*. 2018;11:3167-78.
228. Mottet N, Bellmunt J, Bolla M, Briers E, Cumberbatch MG, De Santis M, et al. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *European urology*. 2017;71(4):618-29.
229. Schlimok G, Riethmuller G. Detection, characterization and tumorigenicity of disseminated tumor cells in human bone marrow. *Semin Cancer Biol*. 1990;1(3):207-15.
230. Harris WP, Mostaghel EA, Nelson PS, Montgomery B. Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. *Nat Clin Pract Urol*. 2009;6(2):76-85.
231. Chandrasekar T, Yang JC, Gao AC, Evans CP. Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Transl Androl Urol*. 2015;4(3):365-80.
232. Loriot Y, Massard C, Gross-Goupil M, Di Palma M, Escudier B, Bossi A, et al. The interval from the last cycle of docetaxel-based chemotherapy to progression is associated with the efficacy of subsequent docetaxel in patients with prostate cancer. *Eur J Cancer*. 2010;46(10):1770-2.
233. Pound CR, Partin AW, Eisenberger MA, Chan DW, Pearson JD, Walsh PC. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *JAMA*. 1999;281(17):1591-7.

234. Psutka SP, Frank I, Karnes RJ. Risk Stratification in Hormone-sensitive Metastatic Prostate Cancer: More Questions than Answers. *Eur Urol.* 2015;68(2):205-6.
235. Yamashita S, Kohjimoto Y, Iguchi T, Koike H, Kusumoto H, Iba A, et al. Prognostic factors and risk stratification in patients with castration-resistant prostate cancer receiving docetaxel-based chemotherapy. *BMC Urol.* 2016;16:13.
236. Tomioka A, Tanaka N, Yoshikawa M, Miyake M, Anai S, Chihara Y, et al. Nadir PSA level and time to nadir PSA are prognostic factors in patients with metastatic prostate cancer. *BMC Urol.* 2014;14:33.
237. Hussain M, Tangen CM, Higano C, Schelhammer PF, Faulkner J, Crawford ED, et al. Absolute prostate-specific antigen value after androgen deprivation is a strong independent predictor of survival in new metastatic prostate cancer: data from Southwest Oncology Group Trial 9346 (INT-0162). *J Clin Oncol.* 2006;24(24):3984-90.
238. Wu KJ, Pei XQ, Tian G, Wu DP, Fan JH, Jiang YM, et al. PSA time to nadir as a prognostic factor of first-line docetaxel treatment in castration-resistant prostate cancer: evidence from patients in Northwestern China. *Asian J Androl.* 2018;20(2):173-7.
239. Armstrong AJ, Lin P, Higano CS, Iversen P, Sternberg CN, Tombal B, et al. Prognostic Association of Prostate-specific Antigen Decline with Clinical Outcomes in Men with Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer Treated with Enzalutamide in a Randomized Clinical Trial. *Eur Urol Oncol.* 2019;2(6):677-84.
240. Poon DMC, Wong KCW, Chan TW, Law K, Chan K, Lee EKC, et al. Survival Outcomes, Prostate-specific Antigen Response, and Tolerance in First and Later Lines of Enzalutamide Treatment for Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer: A Real-World Experience in Hong Kong. *Clin Genitourin Cancer.* 2018;16(5):402-12 e1.
241. Thomas C, Brandt MP, Baldauf S, Tsaur I, Frees S, Borgmann H, et al. Docetaxel-rechallenge in castration-resistant prostate cancer: defining clinical factors for successful treatment response and improvement in overall survival. *Int Urol Nephrol.* 2018;50(10):1821-7.
242. Zheng X, Zhao X, Xu H, Han X, Xu H, Dong X, et al. Efficacy and safety of abiraterone and enzalutamide for castration-resistant prostate cancer: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine (Baltimore).* 2019;98(44):e17748.
243. Ferreira MM, Ramani VC, Jeffrey SS. Circulating tumor cell technologies. *Mol Oncol.* 2016;10(3):374-94.
244. Balic M, Dandachi N, Hofmann G, Samonigg H, Loibner H, Obwaller A, et al. Comparison of two methods for enumerating circulating tumor cells in carcinoma patients. *Cytometry B Clin Cytom.* 2005;68(1):25-30.
245. Banko P, Lee SY, Nagygyorgy V, Zrinyi M, Chae CH, Cho DH, et al. Technologies for circulating tumor cell separation from whole blood. *J Hematol Oncol.* 2019;12(1):48.
246. Scher HI, Jia X, de Bono JS, Fleisher M, Pienta KJ, Raghavan D, et al. Circulating tumour cells as prognostic markers in progressive, castration-resistant prostate cancer: a reanalysis of IMMC38 trial data. *Lancet Oncol.* 2009;10(3):233-9.
247. Stott SL, Lee RJ, Nagrath S, Yu M, Miyamoto DT, Ulkus L, et al. Isolation and characterization of circulating tumor cells from patients with localized and metastatic prostate cancer. *Sci Transl Med.* 2010;2(25):25ra3.
248. Qin X, Park S, Duffy SP, Matthews K, Ang RR, Todenhofer T, et al. Size and deformability based separation of circulating tumor cells from castrate resistant prostate cancer patients using resettable cell traps. *Lab Chip.* 2015;15(10):2278-86.
249. Wang L, Balasubramanian P, Chen AP, Kummar S, Evrard YA, Kinders RJ. Promise and limits of the CellSearch platform for evaluating pharmacodynamics in circulating tumor cells. *Semin Oncol.* 2016;43(4):464-75.
250. McKay RR, Werner L, Mostaghel EA, Lis R, Voznesensky O, Zhang Z, et al. A Phase II Trial of Abiraterone Combined with Dutasteride for Men with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin Cancer Res.* 2017;23(4):935-45.
251. Li H, Wang Z, Xiao W, Yan L, Guan W, Hu Z, et al. Androgen-receptor splice variant-7-positive prostate cancer: a novel molecular subtype with markedly worse androgen-deprivation therapy outcomes in newly diagnosed patients. *Mod Pathol.* 2018;31(1):198-208.
252. Coumans FA, van Dalum G, Beck M, Terstappen LW. Filter characteristics influencing circulating tumor cell enrichment from whole blood. *PLoS One.* 2013;8(4):e61770.
253. Park S, Ang RR, Duffy SP, Bazov J, Chi KN, Black PC, et al. Morphological differences between circulating tumor cells from prostate cancer patients and cultured prostate cancer cells. *PLoS One.* 2014;9(1):e85264.

254. Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF, et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res*. 2004;10(24):8152-62.
255. Guo Z, Yang X, Sun F, Jiang R, Linn DE, Chen H, et al. A novel androgen receptor splice variant is up-regulated during prostate cancer progression and promotes androgen depletion-resistant growth. *Cancer Res*. 2009;69(6):2305-13.
256. Uo T, Dvinge H, Sprenger CC, Bradley RK, Nelson PS, Plymate SR. Systematic and functional characterization of novel androgen receptor variants arising from alternative splicing in the ligand-binding domain. *Oncogene*. 2017;36(10):1440-50.
257. Watson PA, Chen YF, Balbas MD, Wongvipat J, Socci ND, Viale A, et al. Constitutively active androgen receptor splice variants expressed in castration-resistant prostate cancer require full-length androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(39):16759-65.
258. Sharp A, Coleman I, Yuan W, Sprenger C, Dolling D, Rodrigues DN, et al. Androgen receptor splice variant-7 expression emerges with castration resistance in prostate cancer. *J Clin Invest*. 2019;129(1):192-208.
259. Takeuchi T, Okuno Y, Hattori-Kato M, Zaito M, Mikami K. Detection of AR-V7 mRNA in whole blood may not predict the effectiveness of novel endocrine drugs for castration-resistant prostate cancer. *Res Rep Urol*. 2016;8:21-5.
260. De Bono J. APCCC 2019: Clinical Utility of Molecular Markers [Internet]; at the 2019 Advanced Prostate Cancer Consensus Conference (APCCC), Aug 29 - 31, 2019 in Basel, Switzerland written by Zachary Klaassen [zitiert am 09.03.202] URL: <https://www.urotoday.com/conference-highlights/apccc-2019/114594-apccc-2019-clinical-utility-of-molecular-markers.html>. 2019.

8. Anhang

8.1. Patienteninformation und Patienteneinwilligung



UNIVERSITÄTSmedizin.

MAINZ

Klinik und Poliklinik für Urologie

Bestimmung von Biomarkern im Blut zur Prognose- und Therapiebeurteilung bei Patienten mit metastasiertem kastrationsresistenten Prostatakarzinom (mCRPC)

Hiermit erkläre ich,

Patientenaufkleber, Name, Vorname

Dass ich durch Herrn / Frau Dr. _____ mündlich und schriftlich über die Bedeutung, Tragweite und mögliche Risiken der wissenschaftlichen Untersuchung im Rahmen der o.g. Studie informiert wurde und ausreichend Gelegenheit hatte, meine Fragen hierzu in einem Gespräch mit dem Studienarzt zu klären. Ich habe ausreichend Bedenkzeit erhalten, um über meine Teilnahme zu entscheiden.

Ich habe insbesondere die mir vorgelegte Patienteninformation vom _____ gelesen, verstanden und zum Verbleib erhalten.

Mir ist bekannt, dass ich meine Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne nachteilige Folgen für mich zurückziehen und einer Weiterverarbeitung meiner Daten und Proben jederzeit widersprechen kann. Bei Widerruf werden die bis dahin gelagerten Proben vernichtet.

Ich erkläre mich freiwillig einverstanden, an der zuvor beschriebenen Studie teilzunehmen.

Ich bin weiterhin damit einverstanden, dass die Ergebnisse der Untersuchung der Blutproben zur weiteren Erforschung des Prostatakarzinoms genutzt werden können.

Ich weiß, dass die Untersuchungsergebnisse mir nicht mitgeteilt werden.

Ich bestätige mit meiner Unterschrift, kein Anrecht auf die Untersuchungsergebnisse sowie auf jeglichen finanziellen Ertrag geltend zu machen.

Ich bin damit einverstanden, dass die im Rahmen der Studie von mir entnommene Blutproben in pseudonymisierter Form (d.h. kodiert, ohne Angabe von Namen, Initialen, Anschrift und Ähnlichem) an kollaborierende Forschungszentren weitergegeben werden.

Ich bin weiterhin damit einverstanden, dass die Weitergabe von Daten an andere Parteien (z.B. für wissenschaftliche Veröffentlichungen) ausschließlich unter anonymisierten Bedingungen erfolgen kann.

Ich weiß dass meine persönlichen und medizinischen Daten von mir oder durch mich beauftragt, von meinem behandelnden Arzt, auf Richtigkeit überprüft werden können.

Meine Fragen wurden umfassend beantwortet.

Ort, Datum Unterschrift Studienteilnehmer

Ort, Datum Unterschrift Studienarzt

PATIENTENINFORMATIONVersion 6.05.2014
zur Studie**Bestimmung von Biomarkern im Blut zur Prognose- und
Therapiebeurteilung bei Patienten mit metastasiertem
kastrationsresistentem Prostatakarzinom (mCRPC)**

Sehr geehrter Patient,
wir möchten Sie fragen, ob Sie bereit sind, an der nachfolgend beschriebenen Studie teilzunehmen. Der nachfolgende Text sowie das Aufklärungsgespräch sollen Ihnen die Ziele und den Ablauf erläutern. Bitte zögern Sie nicht, alle Punkte anzusprechen, die Ihnen unklar sind. Sie werden danach ausreichend Bedenkzeit erhalten, um über Ihre Teilnahme zu entscheiden.

Hintergrund, Zweck und Ablauf der Studie

Das metastasierte kastrationsresistente Prostatakarzinom (mCRPC) kann nicht mehr geheilt werden. Dennoch haben wir heutzutage die Möglichkeit, durch eine Vielzahl zur Verfügung stehender Medikamente das Fortschreiten dieser Erkrankung über einen längeren Zeitraum zu verzögern. Allerdings spricht nicht jeder Betroffene gleich gut auf die zur Verfügung stehenden Therapieoptionen an. Dies liegt daran, dass das mCRPC heterogen ist, d.h. dass zwischen den Tumoren genetisch bedingt verschiedene Wachstums- und Metastasierungsmerkmale bestehen. Die uns momentan zur Verfügung stehenden klinischen (Allgemeinzustand, Schmerz), laborchemischen (Serum-PSA) und gewebspathologischen (Gleason Score) Entscheidungshilfen zur Wahl der optimalen Therapie sind in ihrer Aussagekraft limitiert. Es werden dringend neuartige Biomarker benötigt, die auf einfache Weise (z.B. über das Blut) bestimmt werden können und uns eine zuverlässige Aussage bzgl. der Wahrscheinlichkeit für das Therapieansprechen unter einem bestimmten Medikament liefern.

Bei diesen Markern kann es sich um

- zirkulierende Proteine im Blut
- zirkulierende Tumorzellen im Blut (CTC)
- zirkulierendes Genmaterial im Blut (DNA, RNA)

handeln. In der aktuellen Studie wollen wir alle drei genannten Möglichkeiten zur Biomarkerbestimmung testen. Für diese Studie soll Ihnen zu bestimmten Zeitpunkten jeweils 40ml Blut abgenommen werden. Dies soll zu folgenden Zeitpunkten geschehen:

- 1x vor Therapiebeginn
- alle 3 Monate unter laufender Therapie
- 1x nach Beendigung der Therapie

Die Untersuchungen und Analysen sollen im wissenschaftlichen Labor der urologischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz sowie im Vancouver Prostate Centre der University of

British Columbia (Vancouver / Kanada) durchgeführt werden. Gegebenenfalls werden spezielle Untersuchungen zusätzlich am Zentrum für Pathophysiologie der Knochenresorption und Therapie von Knochentumoren der Universität Nantes (Frankreich) durchgeführt. Zudem erklären Sie sich damit einverstanden, dass auf Überschussmaterial des Primärtumors (falls vorhanden) aus der Pathologie zurück gegriffen werden darf. Darunter versteht man Gewebe, das bei Ihrer Operation entnommen wurde, das aber für die Diagnose Ihres Tumors nicht mehr verwendet wird, also entsorgt würde.

Welche möglichen Risiken ergeben sich durch die Studienteilnahme?

Durch die Studienteilnahme und die damit verbundene Entnahme der Blutprobe entsteht Ihnen kein Nachteil.

Datenschutz

Es wird in Bezug auf den Datenschutz eine höchstmögliche Sicherheit gewährleistet sein. Die im Rahmen der klinischen Prüfung an Ihnen erhobenen Daten werden in verschlüsselter Form erfasst und zur Analyse der Laborergebnisse verwendet. Es werden folgende Daten erfasst: Alter, Geschlecht, Daten zur Krankenvorgeschichte und Daten zum Verlauf der Prostatakarzinomkrankung. Diese Daten werden von der Klinik in pseudonymisierter Form (verschlüsselt) verwendet.

Was geschieht mit Ihren Ergebnissen und Proben?

Sie erhalten persönlich keine Informationen über die daraus resultierenden Ergebnisse, da daraus zum jetzigen Zeitpunkt keine neuen, gesicherten Ergebnisse gewonnen werden können, die die Diagnose oder Therapie Ihrer Erkrankung beeinflussen könnten.

Die Ergebnisse der Untersuchung können für die weitere wissenschaftliche Erforschung von urologischen Erkrankungen genutzt werden.

Die Proben werden bis zur endgültigen Auswertung aufbewahrt. Bis zu diesem Zeitpunkt wird die Verschlüsselung Ihrer Daten aufrechterhalten. Danach werden die Proben vernichtet und Ihre Daten sowie die Ergebnisse nunmehr anonym gespeichert.

Welchen persönlichen Nutzen haben Sie von der Teilnahme an der Studie?

Mit der Studienteilnahme ist für Sie kein direkter oder indirekter Gesundheitsnutzen verbunden. Wir bitten Sie dennoch um Teilnahme an dieser Studie, da die hierbei gewonnenen Ergebnisse möglicherweise dazu beitragen, in Zukunft das Prostatakarzinom besser therapieren zu können.

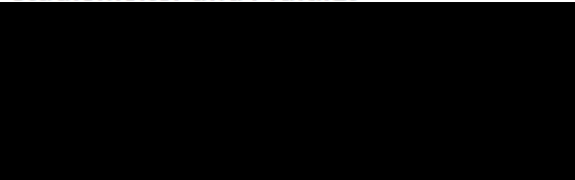
Freiwilligkeit der Teilnahme

Sie haben jederzeit das Recht, ohne Angabe von Gründen entweder nicht an der Studie teilzunehmen oder Ihre Einwilligung zurückzuziehen.

Medizinische Maßnahmen werden dadurch nicht beeinträchtigt.

Wird die Einwilligung zurückgezogen, werden Ihre Daten gelöscht und die Proben vernichtet.

Studienleiter und Prüfarzt



8.2. Entnahme der Blutprobenserien gruppiert nach Therapieregime

Tab.7: Patienten (n= 30) mit in den jeweiligen Blutprobennummern (1-77) gruppiert nach Therapieregime (Caba/ Enza/ Doce/ Abi/ Doce-Chaarted)

SAP Nr.	BE Serie 1	BE Serie2	BE Serie 3
	CTC -1	CTC- 2	CTC- 3
CABAZITAXELGRUPPE			
x	3	10	29
x	6	19	46
x	8	27	38
x	74		
DOCETAXELGRUPPE			
x	4	11	34
x	7	21	44
x	13	24	77
x	14	32	61
x	16	36	56
x	28	33	47
x	35	54	
x	45	60	76
x	48	65	75
x	53	70	
CHAARTED-Docetaxel bei mCSPC			
x	5	20	
x	26	50	
ENZA-POST-CHEMO			
x	9	31	
x	12	23	39
x	17	42	63
x	22	41	59
x	49		
x	46	69	71
ENZA-PRÄ-CHEMO			
x	18	43	64
x	25	57	67
x	37	55	
x	40	66	72
x	51		
x	58	68	73
x	62		
ABIRATERONE			
x	15	30	52

8.3. Excell-Tabelle mit Patientendaten der taxanbasierten Therapiegruppe (Doce + Caba)

SAP-Nr.	Geburtsdatum	Alter	Therapie	Karnofsky-Index bei ED CRPC	Knochen + JA=1; 0=Nein	Lymphknoten + Ja=1; 0=Nein	Organe + Ja=1; 0=Nein	Post Docetaxel 1=Ja/0=Nein	Post Cabazitaxel 1=Ja/0=Nein	Post Abirateron 1=Ja/0=Nein	Post Enzalutamid 1=Ja/0=Nein
X											
CABAZITAXELGRUPPE											
X	05.03.1942	78	6	70,00%	1	0	0	1	0	0	1
X	24.04.1959	60	6	70,00%	1	0	1	1	0	0	0
X	05.07.1952	67	6	80,00%	1	1	0	1	0	0	0
X	21.08.1942	77	6	70,00%	1	1	0	1	0	0	1
DOCETAXELGRUPPE											
X	20.01.1938	82	3	60,00%	1	1	0	0	0	0	0
X	05.07.1951	68	3	80,00%	1	1	1	0	0	1	0
X	20.04.1940	79	3	80,00%	1	0	0	1	0	1	0
X	24.05.1936	83	3	70,00%	1	1	0	0	0	1	0
X	12.11.1958	61	3	90,00%	0	1	0	0	0	1	0
X	28.01.1938	82	3	70,00%	1	1	0	0	0	1	0
X	22.02.1965	55	3	70,00%	1	0	0	0	0	0	0
X	07.04.1939	80	3	70,00%	1	0	0	0	0	1	0
X	18.11.1940	79	3	80,00%	1	1	0	0	0	1	1
X	25.09.1947	72	3	90,00%	1	1	0	0	0	0	0
CHAARTED-Docetaxel bei mCSPC											
X	14.12.1943	76	3	80,00%	1	0	0	0	0	0	0
X	22.06.1952	67	3	100,00%	1	0	0	0	0	0	0

SAP-Nr.	START neue Therapie	PSA Abfall initial in %	Nadir PSA Zeitpunkt	Zeit-Start-PSA-Nadir in Tagen	Partielle PSA-Remission Ja=1; Nein=0	Biochemischer Progress	Zeit-Beginn biochemischer Progress	radiologischer Progress	Zeit-Beginn radiologischer Progress (in Tagen)	Tod: 1= Ja Stand 1.07.2018
CABAZITAXELGRUPPE										
X	16.08.2014	86%	15.04.2015	242	1	12.08.2015	361	12.01.2015	149	1
X	14.10.2014	37,90%	03.03.2015	140	0	23.12.2014	70	23.02.2015	132	1
X	21.10.2014	3,40%	04.11.2014	14	0	11.11.2014	21	26.03.2015	156	0
X	22.09.2015	32%	23.12.2015	92	0	29.01.2016	129	29.01.2016	129	1
DOCETAXELGRUPPE										
X	22.08.2014	35,20%	11.11.2014	81	1	25.11.2014	95	28.11.2014	98	1

X	21.10.20 14	38,60 %	07.01.20 15	78	0	21.01.2015	92	18.02.2015	120	1
X	26.11.20 14	68%	18.03.20 15	112	1	30.09.2015	308	14.10.2015	322	0
X	27.11.20 14	85,10 %	03.06.20 15	188	1	05.08.2015	251	06.05.2015	160	1
X	10.12.20 14	86,40 %	29.04.20 15	140	1	24.06.2015	196	11.09.2015	275	1
X	04.02.20 15	66,66 %	26.05.20 15	111	1	03.02.2016	364	03.08.2015	180	0
X	11.03.20 15	61,90 %	20.05.20 15	70	1	09.09.2015	182	10.09.2015	183	x
X	08.04.20 15	79,80 %	29.07.20 15	112	1	13.10.2015	188	25.05.2016	413	1
X	15.04.20 15	91,50 %	22.09.20 15	160	1	02.03.2016	322	22.09.2015	160	1
X	12.05.20 15	93,10 %	20.10.20 15	161	1	12.01.2016	245	17.08.2016	463	0
CHAARTED- Docetaxel bei mCSPC										
X	14.10.20 14	40%	04.02.20 15	113	1	15.11.2016	763	keine Angaben	keine Angaben	0
X	28.01.20 15	93,90 %	13.05.20 15	105	1	10.03.2017	772	16.02.2017	750	0

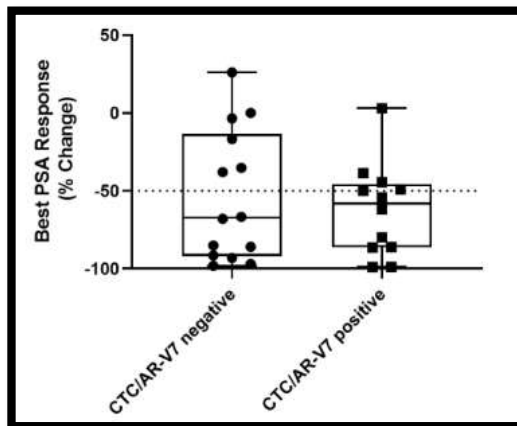
8.4. Excell-Tabelle mit Patientendaten der antihormonellen Therapiegruppe (Abi + Enza)

SAP-Nr.	Geburtsdatum	Alter	Therapie	Karnofsky-Index bei ED CRPC	Knochen + JA=1; 0=Nein	Lymphknoten + Ja=1; 0=Nein	Organ e + Ja=1; 0=Nein	Post Docetaxel 1=Ja/0=N ein	Post Cabazitaxel 1=Ja/0=N ein	Post Abirateron 1=Ja/0=Nein	Post Enzalutamid 1=Ja/0=Nein
ENZA-POST-CHEMO											
X	09.07.1939	80	5	70,00%	1	0	0	1	0	1	0
X	03.10.1946	73	5	80,00%	1	1	0	1	0	0	0
X	15.10.1941	78	5	80,00%	0	1	0	1	0	1	0
X	21.08.1942	77	5	80,00%	1	1	0	1	0	0	0
X	14.02.1935	85	5	70,00%	1	0	0	1	0	1	0
X	24.04.1959	60	5	70,00%	1	0	1	1	1	0	0
ENZA-PRÄ-CHEMO											
X	28.08.1948	71	2	80,00%	1	1	0	0	0	1	0
X	21.12.1946	73	2	80,00%	0	1	0	0	0	0	0
X	24.05.1936	83	2	60,00%	1	0	0	0	0	1	0
X	16.07.1937	82	2	70,00%	0	1	1	0	0	0	0
X	11.01.1930	90	2	70,00%	1	1	0	0	0	1	0
X	31.07.1941	78	2	80,00%	1	1	1	0	0	1	0
X	21.07.1942	77	2	50,00%	1	0	0	0	0	1	0
ABIRATERONE											
X	17.09.1953	66	1	90,00%	1	1	0	0	0	0	0

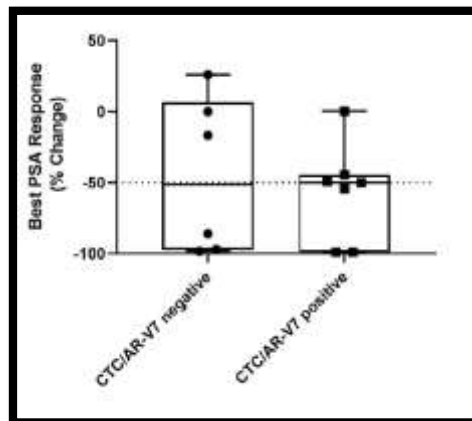
SAP-Nr.	START neue Therapie	PSA Abfall initial in %	Nadir PSA Zeitpunkt	Zeit-Start-PSA-Nadir in Tagen	Partielle PSA-Remission Ja=1; Nein=0	Biochemischer Progress	Zeit-Beginn biochemischer Progress	radiologischer Progress	Zeit-Beginn radiologischer Progress (in Tagen)	Tod: 1= Ja Stand 1.07.2018
ENZA-POST-CHEMO										
X	21.10.2014	plus 3,1%	17.12.2014	kein Abfall	0	11.03.2015	141	15.04.2015	176	1
X	11.11.2014	96,90%	03.02.2015	84	1	12.05.2015	182	27.01.2015	77	x
X	07.01.2015	86%	02.02.2016	391	1	01.02.2017	756	03.02.2016	392	0
X	21.01.2015	54,20%	18.02.2015	28	1	29.04.2015	98	29.05.2015	128	1
X	28.04.2015	98,80%	15.09.2015	140	1	01.07.2016	430	22.08.2016	482	1
X	13.05.2015	0%	13.05.2015	0	0	02.09.2015	112	24.08.2015	103	1
ENZA-PRÄ-CHEMO										
X	07.01.2015	49,10%	21.01.2015	14	1	01.04.2015	84	24.08.2016	595	0
X	28.01.2015	98,20%	21.06.2016	510	1	kein Progress bis 07/2018	kein Progress	kein Progress bis 07/2018	kein Progress (510)	0
X	18.03.2015	44,50%	01.04.2015	14	0	09.06.2015	83	11.05.2015	54	1
X	31.03.2015	50%	21.04.2015	21	1	09.06.2015	70	13.07.2015	104	1
X	29.04.2015	16,70%	13.05.2015	14	0	keine Angaben	keine Angaben	keine Angaben	keine Angaben	1
X	20.05.2015	plus 26%	09.06.2015	kein Abfall	0	09.06.2015	20	04.09.2015	107	0
X	09.06.2015	27,50%	24.08.2015	76	0	01.08.2016	419	keine Angaben	keine Angaben	1
ABIRATERONE										
X	02.12.2014	99%	12.01.2016	406	1	02.06.2017	913	17.04.2018	1232	0
										8

8.5. Boxplot-Analysen ergänzend zu Unterpunkt 4.6.

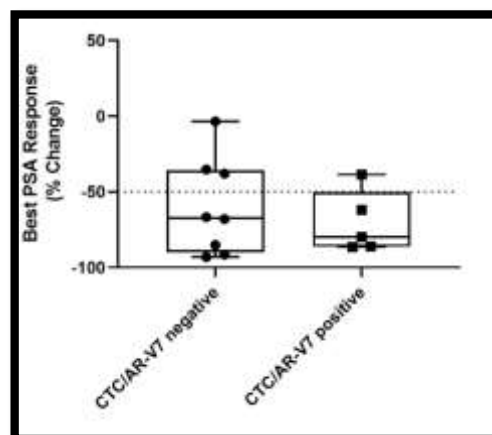
Boxplots-Analyse des PSA Ansprechens der Gesamtkohorte in Abhängigkeit des AR-V7 Status.



Boxplots-Analyse des PSA Ansprechens in der antiandrogenen Therapiegruppe in Abhängigkeit des AR-V7 Status.



Boxplots-Analyse des PSA Ansprechens in der taxanbasierten Therapiegruppe in Abhängigkeit des AR-V7 Status



9. Danksagung

Der größte Dank, gilt den Patienten die sich bereit erklärt haben trotz der persönlichen infausten Prognose ohne Eigennutzen an dieser Arbeit teilzunehmen. Die meisten dieser Patienten sind leider bereits verstorben.

Ich darf mich sehr bei XX für den Mut bedanken einem damals jungen Studenten eine derart ambitionierte Arbeit anzuvertrauen, als auch für die kontinuierliche zuverlässig gute Betreuung trotz erschwerter Umstände. Letztendlich bin ich vor allem durch diese Arbeit in der Urologie der Universitätsklinik Mainz gelandet. XX gebührt ein beträchtlicher Dank bei der Finalisierung dieser Arbeit.

Einen sehr großen Anteil an der Ausführung dieser Arbeit haben die beiden labortechnischen Assistentinnen XX und XX, die mich mit viel Geduld und Hilfe in die Laborroutine eingelernt haben. Die Interpretation der Daten wäre zudem ohne XX nur schwerlich vorstellbar gewesen. XX darf ich für die freundliche Übernahme der Zweitkorrektur danken.

Weiterhin gilt mein Dank dem Laborteam um XX, das mich offen in ihren Reihen integriert hat. Dem ganzen Team des universitären Tumorzentrums darf ich herzlichst für die Unterstützung während der Rekrutierungsphase danken.

Der Anteil meiner Eltern XX und XX an dieser Arbeit ist hingegen nicht bemessbar. Zuletzt darf ich mich bei meiner Verlobten XX für ihre immerwährende Geduld und Unterstützung bedanken. **Vielen Dank**

10. Tabellarischer Lebenslauf

Maximilian Peter Sparwasser geb. x



x



x



x

Akademischer Werdegang

Seit 08.2017 – bis heute: Assistenzarzt

Assistenzarzt in der Klinik für Urologie und Kinderurologie der Universitätsmedizin Mainz (Univ.Prof. Dr. med. x)

05.2016 – 04.2017: Praktisches Jahr

- 1.Tertial: Innere Medizin - Universitätsmedizin Mainz
 - Medizinische Klinik I (Schwerpunkte Gastroenterologie, Hepatologie, Endokrinologie und Stoffwechselerkrankungen) und Medizinische Klinik II (Zentrum für Kardiologie I)
- 2.Tertial: Urologie
 - Kantonspital Winterthur, Department Urologie (Prof. Dr. med. x)
 - Universitätsklinikum Innsbruck, Department Urologie (Prof. Dr. med. x)
- 3.Tertial: Chirurgie
 - Addington Hospital Durban, Department of Surgery, South Africa

03.2014: Beginn der Promotionsarbeit

Thema: „Bestimmung von Biomarkern im Blut zur Prognose- und Therapiebeurteilung bei Patienten mit metastasiertem kastrationsresistenten Prostatakarzinom (mCRPC)“

02.2013 – 09.2015: Famulaturen

- 09/2015 Klinik für Anästhesiologie, Bundeswehrkrankenhaus, Ulm
- 03/2014 Allgemeinarzt Praxis Dr. med. x, Weissenhorn
- 08/2013 Urologische Praxis, Dr. med. x, Berlin
- 02/2013 Klinik für pädiatrische Pneumologie und Neonatologie MHH, Hannover

04.2013 – 05.2017: Studium der Humanmedizin

Johannes-Gutenberg Universitätsmedizin, Mainz

09.2010 – 09.2012: Studium der Humanmedizin

Universitätsklinikum Albert-Szent-Györgyi, Szeged, Ungarn

10.2009 – 08.2010: Pre-Medical Program

Universitätsklinikum Albert-Szent-Györgyi, Szeged, Ungarn

08.2008 – 07.2009: Zivildienst als Krankenpflegehelfer

Querschnittsgelähmtenzentrum, Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm (RKU), Ulm; Leitung: Dr. med. x

Schulischer Werdegang

2005 – 2008: Allgemeine Hochschulreife , Friedrich-List Schule, Ulm

2003 – 2005: Nikolaus-Kopernikus Gymnasium, Weissenhorn

1998 – 2003: Clarentiner Kolleg, Weissenhorn

1994 – 1998: Grundschule Nord, Weissenhorn

1993 – 1994: Pre-School, Madison Wisconsin, USA