

Detektion zirkulierender Tumorzellen im peripheren Blut beim Prostatakarzinom

Zirkulierende Tumorzellen („circulating tumor cells“, CTC) können im peripheren Blut von Patienten mit einem lokalisierten sowie metastasierten Prostatakarzinom detektiert werden. In den metastasierten Stadien des Prostatakarzinoms scheinen CTC ein verlässlicher Prognosemarker für das Überleben zu sein.

Die Prognose von Patienten mit einem Prostatakarzinom ist abhängig von der Entstehung und dem Wachstum der Metastasen [27]. Obwohl der PSA-Wert (prostata-spezifisches Antigen) routinemäßig als Serummarker genutzt wird, hat er in den lokalisierten Stadien des Prostata-

karzinoms eine fehlende Korrelation mit dem pathologischen Stadium [11]. Beim metastasierten Prostatakarzinom wird häufig eine mangelnde Korrelation des PSA-Wertes mit der Tumorlast bzw. des PSA-Verlaufs mit der Progression in den bildgebenden Staginguntersuchungen beobachtet [12, 25]. Zusammenfassend besteht ein Bedarf für früher anwendbare, sensitivere und spezifische serumbasierte Marker mit einer verbesserten prognostischen Wertigkeit [11, 12, 13].

Ein potentieller molekularer Marker sind CTC, die als prognostischer Marker des metastasierten Prostatakarzinoms etabliert wurden [12]. CTC wurden erstmalig 1869 beschrieben und wur-

den seitdem in mehr als 14.000 Publikationen diskutiert [2, 27]. Da CTC sowohl im peripheren Blut von Patienten mit lokalisiertem als auch mit metastasiertem Prostatakarzinom nachgewiesen wurden, erscheinen sie als ein vielversprechender stadienübergreifender molekularer Marker [28, 34].

Biologie der CTC

Für das Auftreten von CTC in peripherem Blut wird das Loslösen der Zellen aus dem primären Tumorverbund oder aus Metastasen mit Übertritt in die Zirkulation verantwortlich gemacht [28]. Da CTC eine Lebensdauer von lediglich 24 h und eine gleichmäßige Detektionsrate ohne Tageschwankungen aufweisen, werden CTC als ein verlässlicher Parameter der Tumoraktivität sowie der Tumorlast vermutet [9, 28, 30].

Das Eindringen von epithelialen Tumorzellen in das Blutgefäßsystem wird durch einen Mechanismus gefördert, der als epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet wird [16]. Um eine Apoptose oder immunvermittelten Untergang im Kreislauf zu verhindern, kann es hierbei zu phänotypischen Veränderungen kommen [16, 28]. Für die Implantation von Metastasen am Zielorgan ist wiederum eine mesenchymal-epitheliale Transition (MET) erforderlich [17]. Jedoch scheint nur eine Subgruppe der CTC

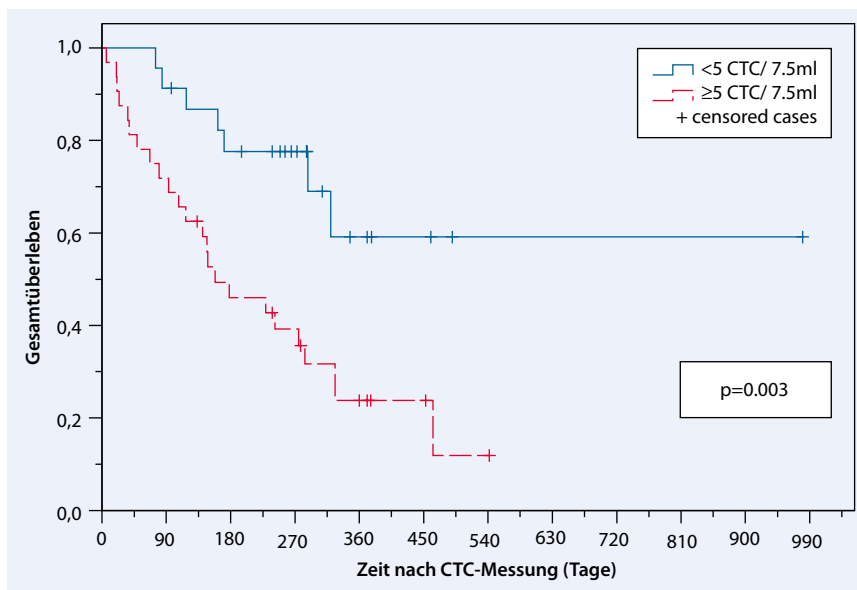


Abb. 1 ▲ Gesamtüberleben in Abhängigkeit der CTC-Zahl (<5 vs. ≥5 CTC in 7,5 ml Vollblut) bei Patienten mit einem metastasierten Prostatakarzinom in einer klinischen Validierungsstudie. (Nach [35])

Mark Thalgott und Matthias M. Heck haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen.

ein malignes Potential, im Sinne von metastaseninitiierenden Zellen, aufzuweisen [27]. So konnte in einem Xenograftmodell durch die Implantation von CTC von CRPC-Patienten („castration-resistant prostate cancer“) bisher kein Tumorstadium induziert werden, dagegen gelang dies bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom [4, 5, 19].

Da die molekulare Heterogenität von Primärtumor, Metastasen und CTC gezeigt wurde, ist die CTC-Isolierung als „liquid biopsy“ mit konsekutiver Charakterisierung des CTC-Pools ein vielversprechender Ansatz mit einer Echtzeitbeurteilung des Therapieverlaufs oder Prädiktion des Therapieerfolgs anhand der molekularen Signatur [1, 17, 19, 27]. Obwohl CTC derzeit als prädiktiver Marker intensiv erforscht werden, ist dieser Ansatz klinisch noch nicht etabliert. Hingegen konnte die prognostische Bedeutung der CTC-Zahl im peripheren venösen Blut für das Überleben (OS) bei metastasierten Patienten belegt werden [12].

Methoden der CTC-Detektion

Da selbst in metastasierten Stadien die CTC-Konzentration mit 1 CTC auf 10^8 gesunder hämatopoetischer Zellen sehr niedrig ist, bleibt die CTC-Isolation technisch schwierig [1, 16]. So erscheint, unter Berücksichtigung der Tumormasse, die beschriebene CTC-Detektionsrate häufig unerwartet niedrig [16]. Insgesamt wird eine Vielzahl innovativer CTC-Detektionsmethoden untersucht, die morphologische, immunologische, nukleinsäurebasierte und zytometrische Methoden umfassen, jedoch z. T. eine mangelnde Reproduzierbarkeit und Spezifität aufweisen [26, 28, 29].

Im Folgenden soll näher auf die etablierte Methodik, der automatisierten CTC-Detektion aus peripher venösem Vollblut mittels CellSearch®-System (CSS; Veridex LLC, Johnson & Johnson) eingegangen werden. Das CSS kombiniert eine immunomagnetische Anreicherung EpCAM-exprimierender („anti-epithelial cell adhesion molecule“) Zellen mit einer Fluoreszenzfärbung für Zytokeratin als epithelialen Marker [11, 12]. Aufgrund einer hohen Spezifität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit ist das CSS von der

M. Thalgott · M.M. Heck · K. Pantel

Detektion zirkulierender Tumorzellen im peripheren Blut beim Prostatakarzinom

Zusammenfassung

Zirkulierende Tumorzellen („circulating tumor cells“, CTC) können mit sensitiven immunzytochemischen und molekularen Methoden detektiert werden und können Fernmetastasen bewirken. Konsekutiv konnte die prognostische Wertigkeit der CTC für das Überleben beim metastasierten Prostatakarzinom demonstriert werden. Hierbei ist ein CTC-Schwellenwert von <5 vs. ≥ 5 CTC den bekannten PSA-Algorithmen prognostisch überlegen. Hingegen ist bei Patienten mit lokalisiertem Prostatakarzinom die klinische Wertigkeit der CTC umstritten. Des Weiteren könnten CTC einen prädiktiven Marker für

den Therapieerfolg darstellen, da sie die heterogene molekulare Signatur sowohl des Tumors als auch der Metastasen aufweisen können. Folglich könnten CTC, nicht nur als prognostischer Marker, sondern auch als „liquid biopsy“ ein Zugang zu personalisierten Therapiestrategien sein. In dieser Übersichtsarbeit wird stadienübergreifend die klinische Anwendung der CTC diskutiert.

Schlüsselwörter

Biomarker · Marker, molekularer · Marker, prognostischer · Therapiemonitoring · Metastasen

Detection of circulating tumor cells from peripheral blood in prostate cancer

Abstract

Circulating tumor cells (CTCs) can be detected with sensitive immunocytological and molecular methods and can potentially cause distant metastases. Consecutively the prognostic significance of CTC-counts for survival was demonstrated in metastatic prostate cancer (mPC) revealing CTCs as reliable surrogate marker during therapy. Comparatively the prognostic value of a CTC-threshold with <5 vs. ≥ 5 CTCs was superior to the commonly used PSA-decrement algorithms. In contrast despite evidence of CTCs in localized PC, their clinical value in this stage is currently precarious. Furthermore, CTCs may serve as predic-

tive markers with the ability to predict treatment sensitivity or resistance, since they may represent the heterogeneous molecular signature of primary as well as metastatic cancer lesions. Thus, the isolation of CTCs may serve not only as a prognostic tool but moreover as a liquid biopsy and a window towards personalized treatment. This review discusses the clinical impact of CTCs in the different stages of PC.

Keywords

Biomarkers · Marker, molecular · Marker, prognostic · Therapy monitoring · Metastases

„US Food and Drug Administration“ für das Therapiemonitoring des metastasierten Prostatakarzinoms zugelassen [12, 32]. Beim metastasierten Prostatakarzinom wurde ein Schwellenwert von ≥ 5 CTC pro 7,5 ml venösem Vollblut als prognostisch ungünstig für das Überleben beschrieben [12, 25]. Fehlerquellen des CSS ist die selektive Detektion von EpCAM in den bisherigen Studien, dessen Expression während der EMT auf den CTC verloren gehen kann, sowie das geringe untersuchte Blutvolumen [15, 19].

Beim Vergleich unterschiedlicher Methoden zeigte sich eine signifikante Korrelation von Ergebnissen des CSS mit proteinbasierter Detektion EpCAM-exprimierender CTC und Ergebnissen der

reversen Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) mit RNA-basierter Detektion von PSA/PSMA bzw. KLK2/PSA in Vollblut [6, 18]. Des Weiteren konnte eine prognostische Wertigkeit der Genexpression gezeigt werden. Mittels RT-PCR wurden 5 Gene identifiziert (KLK3, KLK2, HOXB13, GRHL2, FOXA1) die mit einem Tumorprogress assoziiert waren. Bei Kombination der unterschiedlichen Methoden CSS und RT-PCR wurde eine bessere Risikostratifizierung von CRPC-Patienten bezüglich des Gesamtüberlebens beschrieben [10].

Lokal begrenztes Prostatakarzinom

Beim lokal begrenzten Prostatakarzinom gibt es derzeit keinen etablierten molekularen serumbasierten Marker, der für Therapiemonitoring und Prognoseabschätzung geeignet ist. Mit Hilfe des CSS zeigten Patienten mit einem lokal begrenzten oder lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinom in mehreren Studien CTC-Zahlen auf Kontrollniveau [11, 35]. Interessante Daten wurden von Steuber et al. [33] berichtet, die trotz fehlender Korrelation der CTC-Zahl zu PSA-Wert oder Tumorstadium einen Trend für ein gesteigertes biochemisches Rezidivrisiko bei Patienten mit ≥ 1 CTC/7,5 ml Blut beobachteten, wobei die Signifikanz – wahrscheinlich aufgrund der kurzen Follow-up-Zeit – knapp verfehlt wurde. Eine neue Methode stellt eine Mikrochiptechnologie dar, die PSA als zusätzlichen Marker zu Ep-CAM nutzt und eine Detektionsrate von 42% zeigt. Postoperativ zeigte sich jedoch bisher keine eindeutige klinische Wertigkeit [34].

Ob das Auftreten der CTC in diesem Tumorstadium prognostisch für Überleben und Rezidivrisiko ist, müsste in größeren prospektiven Studien mit längerem Beobachtungszeitraum sowie sensitiveren Methoden untersucht werden [1, 35]. Da z. B. beim Mamma- und Harnblasenkarzinom die prognostische Signifikanz der CTC in lokalisierten Stadien demonstriert wurde und CTC z. T. noch Jahre nach chirurgischer Sanierung, trotz klinisch inapparenter Metastasen, vorliegen, scheinen CTC schon früh in den Metastasierungsprozess involviert und könnten somit ein

Indikator für den Bedarf systemischer Therapien sein [27].

Metastasiertes Prostatakarzinom

Mit fortschreitendem Prostatakarzinomstadium steigt die mediane CTC-Zahl [35]. Beim metastasierten Prostatakarzinom wurde eine Zunahme der CTC-Zahl vom hormonsensitiven (HSPC) zum kastrationsresistenten Prostatakarzinom (CRPC), mit einer Zunahme an Patienten mit der prognostisch ungünstigen CTC-Zahl ≥ 5 , beobachtet. Des Weiteren zeigte sich für das CRPC eine steigende CTC-Zahl mit zunehmender Anzahl zytotoxischer Therapielinien [6, 7, 14]. Für Gesunde wurden ≤ 1 CTC als Schwellenwert etabliert [6].

Assoziationsuntersuchungen der CTC-Zahl mit Routinelaborparametern zeigten eine Korrelation mit der alkalischen Phosphatase (AP) und Laktatdehydrogenase (LDH) sowie mit erniedrigten Hämoglobinwerten, jedoch widersprüchliche Ergebnisse bzgl. des PSA-Wertes sowie der PSA-Verdoppelungszeit [6, 7, 14, 25, 35]. In Bezug auf die Art der Metastasierung zeigten sich die höchsten CTC-Zahlen bei Patienten mit ossären und viszerale Metastasen und die niedrigsten bei alleiniger Weichgewebemetastasierung [7, 14, 35]. Während bei alleiniger Weichgewebemetastasierung die Detektionsrate auf Kontrollniveau liegt, scheint das Vorliegen ossärer Metastasen eine Voraussetzung für erhöhte CTC-Zahlen beim Prostatakarzinom darzustellen. Ein Zusammenhang der CTC-Zahl mit der ossären Tumormasse konnte jedoch

nicht beobachtet werden [7, 14, 25, 31, 35]. Somit ist in der klinischen Praxis die Bestimmung der CTC-Zahl besonders bei Patienten mit ossären ± viszerale Metastasen sinnvoll.

Die unabhängige prognostische Wertigkeit der CTC für das Überleben, mit einem Schwellenwert von ≥ 5 CTC/7,5 ml Vollblut wurde in unterschiedlichen Studien belegt (**Abb. 1**, [12, 25, 35]). CRPC-Patienten mit initial ≥ 5 vs. < 5 CTC vor Beginn einer neuen Systemtherapie hatten ein signifikant unterschiedliches Überleben von 11,5 vs. 21,7 Monaten. Bei Patienten mit ≥ 5 CTC vor Therapiebeginn und einem Abfall der CTC < 5 unter Therapie wurde ein Zusammenhang mit einer Verbesserung des Überlebens von 6,8 auf 21,3 Monate beobachtet [12]. Dieser Schwellenwert wurde für Patienten mit HSPC als auch für Patienten mit CRPC für den Zeitpunkt 2–5 Wochen nach Therapiebeginn als auch für spätere Zeitpunkte bestätigt [12, 24, 25]. Im Vergleich zum PSA-Wert im Serum erlaubt die CTC-Bestimmung unter Therapie eine genauere Einteilung in Prognosegruppen zur Einschätzung des Überlebens [12].

Zusätzlich zu den Schwellenwertanalysen wurde auch eine Assoziation der kontinuierlichen CTC-Zahl mit dem OS beobachtet [7, 31]. Demzufolge kann ein therapiebedingter Abfall der CTC-Zahl von $\geq 30\%$ prognostisch signifikant für das Überleben sein [25]. In einer kleinen Kohorte zeigte sich eine Korrelation des Therapieansprechens mit einem Anstieg oder Abfall der CTC-Zahl unter Therapie [13]. Folglich scheint nicht nur der Schwellenwert der CTC prognostisch für das Über-

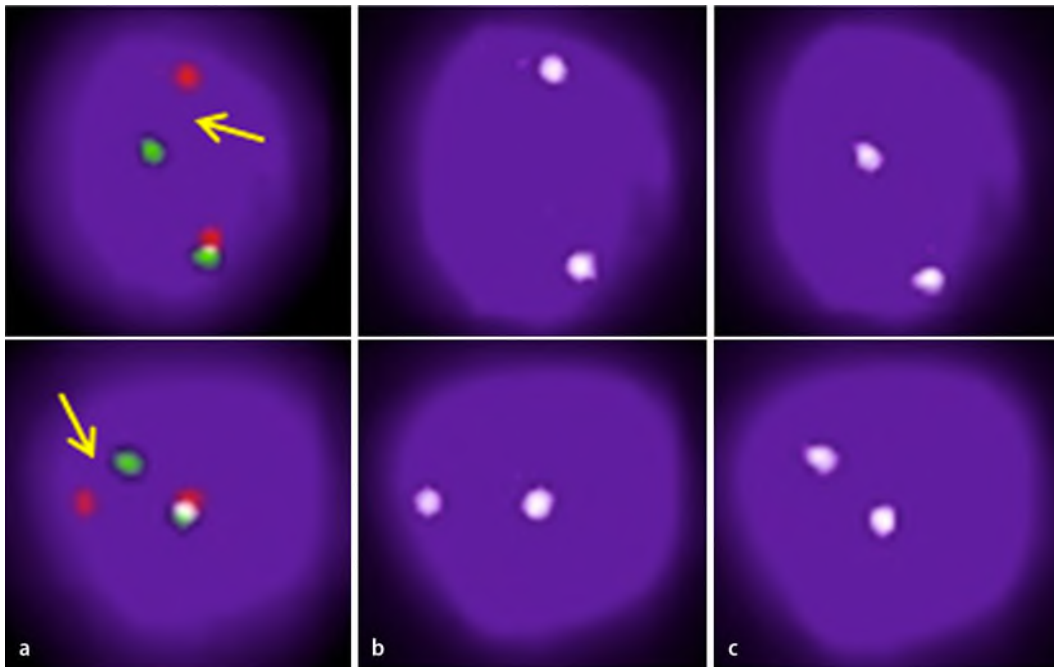


Abb. 2 ◀ Untersuchung des ERG-Rearrangements (Chromosom 21q22.2) in den CTC mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) für die ERG 5'- (grün) und 3'-Sequenz (rot). **a** Übereinander gelagerte Bilder, **gelber Pfeil** Auseinanderbrechen der beiden Gensequenzen (Rearrangement), **b** ERG 5'; **c** ERG 5'

leben, sondern auch die absolute Höhe der CTC-Zahl sowie die relative Veränderung unter Therapie.

CTC-Charakterisierung

Die molekulare Charakterisierung der CTC könnte einen prädiktiven Marker für das Therapieansprechen im Sinne einer „liquid biopsy“ darstellen und somit einen Wandel von empirischen zu personalisierten Therapiekonzepten ermöglichen. Da CTC die genotypischen Merkmale sowohl des Tumors als auch dessen Metastasen beherbergen, wäre ein Vorteil, dass der heterogene Zellpool unterschiedlichen Ursprungs und malignen Potentials untersucht werden kann und somit eine umfassende molekulare Signatur des Tumors erlaubt [1, 17, 19, 27].

Erste Ergebnisse weisen darauf hin, dass mittels molekularer Charakterisierung spezifische Genmutationen oder Proteine detektiert werden können, die für die Effektivität der Therapie relevant sind [16]. Als Beispiel eines „Liquid-biopsy-Konzepts“ konnten Kirby et al. [20] nachweisen, dass CTC von CRPC-Patienten mit Tumorprogression unter Docetaxel-Chemotherapie auch ex vivo unter Laborbedingungen resistent auf die Taxane Docetaxel und Paclitaxel waren. Eine Limitation stellen jedoch die ge-

nutzten Detektionsmethoden ebenso wie der potentielle EMT-assoziierte Verlust der epithelialen Marker EpCAM und Zytokeratin dar, wodurch eine Selektion von CTC-Subpopulationen und somit Fehlinterpretationen begünstigt werden könnten [15, 16, 19].

Mit der Entwicklung neuer Hormontherapien zur Behandlung des CRPC mit Zweitgenerationsantiaandrogenen und Androgenbiosyntheseinhibitoren erscheint die Untersuchung des Androgenrezeptors (AR) sowie der damit assoziierten Signalwege von besonderem Interesse [17]. Frühe molekularbiologische Untersuchungen an CTC von Prostatakarzinompatienten zeigten das Vorliegen prostatakarzinomassoziierten Gene wie PSA, PSMA, EGFR und dem AR [23, 32]. Eine Amplifikation oder Mutation des AR in den CTC konnte in mehreren Untersuchungen gezeigt werden [3, 21, 32]. Die Amplifikation des AR lag insbesondere bei Patienten mit hohen CTC-Zahlen, ebenso wie eine Zunahme des Protoonkogens *MYC*, das mit aggressiven Karzinomen assoziiert ist, vor [21]. Eine Untersuchung des Aktivierungsstatus des AR der CTC im Verlauf einer Abiraterone-Therapie zeigte bei HSPC-Patienten vorherrschend einen AR-on-Status (aktiviert), während CRPC-Patienten einen heterogenen AR-Status, mit vorwiegen-

den AR-off- bzw. AR-mixed-Status, aufwiesen. CRPC-Patienten mit einem AR-on-Status zeigten einen CTC-Abfall von >50% unter Abiraterone Therapie. Hingegen war das Vorliegen des AR-mixed-Status oder ein Anstieg des AR-on-Status unter Therapie mit einem schlechteren OS assoziiert [22].

Weiterhin konnte bei CRPC-Patienten eine Deletion des Tumorsuppressorgens *PTEN* („phosphatase und tensin homolog“) sowie bei einem Teil der Patienten ein Rearrangement des ERG-Onkogens („erythroblast related gene“) in Primärtumoren, Metastasen und CTC beobachtet werden. Das Auftreten des ERG-Rearrangements zeigte in einer Studie eine signifikante Assoziation mit dem PSA-Abfall unter Abiraterone-Therapie [3]. Zusätzlich konnte eine Genfusion des androgenabhängigen Gens *TMPRSS2* mit dem ERG-Onkogen zu *TMPRSS2-ERG* („transmembran protease, Serin 2-ERG“) in den CTC von CRPC-Patienten beobachtet werden, jedoch war der *TMPRSS2-ERG*-Fusionsstatus nicht prädiktiv für den klinischen Erfolg einer Abiraterone-Therapie [3, 8].

Fazit für die Praxis

- CTC sind ein prognostischer Marker für das Überleben bei Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom.
- Für das Therapiemonitoring mit CTC erscheinen insbesondere Patienten mit ossären ± viszerale Metastasen geeignet.
- Therapieziel ist die Abnahme der CTC-Zahl unter den Schwellenwert von <5 CTC, da diese CTC-Zahl mit längerem Überleben einhergeht.
- CTC könnten ein Echtzeitmonitoring der Tumoraktivität und der molekularen Veränderungen ermöglichen.
- Die molekulare Charakterisierung der CTC könnte in Zukunft einen prädiktiven Marker für den Therapieerfolg darstellen.

Korrespondenzadresse



Dr. M. Thalgott

Urologische Klinik und
Poliklinik, Klinikum rechts der
Isar, Technische Universität
München,
Ismaninger Straße 22,
81675 München
mark.thalgott@lrz.tum.de

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. M. Thalgott, M.M. Heck und K. Pantel geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Dieser Beitrag beinhaltet keine Studien an Menschen oder Tieren.

Literatur

1. Alix-Panabières C, Pantel K (2013) Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem* 59(1):110–118
2. Ashworth T (1869) A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aust Med J* 14:146–147
3. Attard G, Swennenhuis JF, Olmos D et al (2009) Characterization of ERG, AR and PTEN gene status in circulating tumor cells from patients with castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res* 69(7):2912–2918
4. Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S et al (2013) Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat Biotechnol* 31(6):539–544
5. Carvalho FL, Simons BW, Antonarakis ES et al (2013) Tumorigenic potential of circulating prostate tumor cells. *Oncotarget* 4:413–421
6. Chen BT, Loberg RD, Neeley CK et al (2005) Preliminary study of immunomagnetic quantification of circulating tumor cells in patients with advanced disease. *Urology* 65(3):616–621
7. Danila DC, Heller G, Gignac GA et al (2007) Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 13(23):7053–7058
8. Danila DC, Anand A, Sung CC et al (2011) TMPRSS2-ERG status in circulating tumor cells as a predictive biomarker of sensitivity in castration-resistant prostate cancer patients treated with abiraterone acetate. *Eur Urol* 60(5):897–904
9. Danila DC, Fleisher M, Scher HI (2011) Circulating tumor cells as biomarkers in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 17(12):3903–3912
10. Danila DC, Anand A, Schultz N et al (2013) Analytic and clinical validation of a prostate cancer-enhanced messenger RNA detection Assay in whole blood as a prognostic biomarker for survival. *Eur Urol* 64(6):873–875
11. Davis JW, Nakanishi H, Kumar VS et al (2008) Circulating tumor cells in peripheral blood samples from patients with increased serum prostate specific antigen: initial results in early prostate cancer. *J Urol* 179(6):2187–2191
12. De Bono JS, Scher HI, Montgomery RB et al (2008) Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 14(19):6302–6309
13. Gonzales JC, Fink LM, Goodman OB Jr et al (2011) Comparison of circulating MicroRNA 141 to circulating tumor cells, lactate dehydrogenase, and prostate-specific antigen for determining treatment response in patients with metastatic prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer* 9(1):39–45
14. Goodman OB Jr, Fink LM, Symanowski JT et al (2009) Circulating tumor cells in patients with castration-resistant prostate cancer baseline values and correlation with prognostic factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18(6):1904–1913
15. Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M et al (2012) Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer* 12:178
16. Gorges TM, Pantel K (2013) Circulating tumor cells as therapy-related biomarkers in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 62(5):931–939
17. Harouaka R, Kang Z, Zheng SY et al (2014) Circulating tumor cells: advances in isolation and analysis, and challenges for clinical applications. *Pharmacol Ther* 141(2):209–221
18. Helo P, Cronin AM, Danila DC et al (2009) Circulating prostate tumor cells detected by reverse transcription-PCR in men with localized or castration-refractory prostate cancer: concordance with Cell-Search assay and association with bone metastases and with survival. *Clin Chem* 55(4):765–773
19. Hu B, Rochefort H, Goldkorn A (2013) Circulating tumor cells in prostate cancer. *Cancers (Basel)* 5(4):1676–1690
20. Kirby BJ, Jodari M, Loftus MS et al (2012) Functional characterization of circulating tumor cells with a prostate-cancer-specific microfluidic device. *PLoS One* 7(4):35976
21. Leversha MA, Han J, Asgari Z et al (2009) Fluorescence in situ hybridization analysis of circulating tumor cells in metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res* 15(6):2091–2097
22. Miyamoto DT, Lee RJ, Stott SL et al (2012) Androgen receptor signaling in circulating tumor cells as a marker of hormonally responsive prostate cancer. *Cancer Discov* 2(11):995–1003
23. O'Hara SM, Moreno JG, Zweitzig DR et al (2004) Multigene reverse transcription-PCR profiling of circulating tumor cells in hormone-refractory prostate cancer. *Clin Chem* 50(5):826–835
24. Okegawa T, Nutahara K, Higashihara E (2008) Immunomagnetic quantification of circulating tumor cells as a prognostic factor of androgen deprivation responsiveness in patients with hormone naive metastatic prostate cancer. *J Urol* 180(4):1342–1347
25. Olmos D, Arkenau HT, Ang JE et al (2009) Circulating tumour cell (CTC) counts as intermediate end points in castration-resistant prostate cancer (CRPC): a single-centre experience. *Ann Oncol* 20(1):27–33
26. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B (2008) Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer* 8:329–340
27. Pantel K, Alix-Panabières C (2013) Real-time liquid biopsy in cancer patients: fact or fiction? *Cancer Res* 73(21):6384–6388. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2030
28. Panteleakou Z, Lembessis P, Sourla A et al (2009) Detection of circulating tumor cells in prostate cancer patients: methodological pitfalls and clinical relevance. *Mol Med* 15(3–4):101–114
29. Parkinson DR, Dracopoli N, Petty BG et al (2012) Considerations in the development of circulating tumor cell technology for clinical use. *J Transl Med* 7:10–138
30. Patel H, Le Marer N, Wharton RQ et al (2002) Clearance of circulating tumor cells after excision of primary colorectal cancer. *Ann Surg* 235(2):226–231
31. Scher HI, Jia X, Bono JS et al (2009) Circulating tumour cells as prognostic markers in progressive, castration-resistant prostate cancer: a reanalysis of IMMC38 trial data. *Lancet Oncol* 10(3):233–239
32. Shaffer DR, Leversha MA, Danila DC et al (2007) Circulating tumor cell analysis in patients with progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 13(7):2023–2029
33. Steuber T, Schlomm T, Heinzer H et al (2012) Prävalenz und prognostischer Wert von zirkulierenden Tumorzellen (CTC) im Blut von Patienten mit einem lokalisierten Prostatakarzinom vor radikaler Prostataktomie. *Urologe* 51(1)
34. Stott SL, Lee RJ, Nagrath S et al (2010) Isolation and characterization of circulating tumor cells from patients with localized and metastatic prostate cancer. *Sci Transl Med* 2(25):25
35. Thalgott M, Rack B, Maurer T et al (2013) Detection of circulating tumor cells in different stages of prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 139(5):755–763