

„Liquid Biopsy“ beim Prostatakrebs (II)

Präzisionsonkologie mithilfe zirkulierender Tumorzellen?

Fortschritte bei der Isolierung zirkulierender Tumorzellen (CTC) aus dem peripheren Blut von Krebspatienten und die Möglichkeit des genomischen Profilings einzelner Zellen haben in jüngerer Zeit zu verstärktem Interesse an CTC als Biomarker geführt. Mit ihnen steht Probenmaterial für die onkologische Präzisionsmedizin zur Verfügung, das sämtliche individuellen Tumormerkmale repräsentiert und deutlich leichter zugänglich ist als Metastasengewebe. Im letzten Jahrzehnt wurden auch Anwendungsmöglichkeiten der CTC beim Prostatakarzinom erforscht. Zunächst hat sich die Quantifizierung der CTC im Blut bei Patienten mit metastasiertem kastrationsresistentem Prostatakrebs (mCRPC) in mehrfacher Hinsicht als prognostisch wertvoll erwiesen. Gegenwärtig gehen die Bestrebungen aber dahin, den CTC weitergehende Informationen zu „entlocken“, anhand derer sich personalisierte, zielgerichtete Therapiestrategien orientieren können [1–3].

Ins periphere Blut übergetretene Tumorzellen entstammen entweder dem Primärtumor oder bereits abgesiedelten metastatischen Herden. Die Loslösung von Epithelzellen aus ihrem Zellverband bedingt deren tiefgreifende strukturelle und molekulare Umwandlung. Das ist das Werk eines zellulären Transdifferenzierungsprogramms (epithelial-mesenchymale Transition), durch das die Tumorzellen in einen Phänotyp mit erhöhtem Migrations- und Invasionspotenzial übergehen. Zudem erleichtert dieser Prozess die Infiltration von Blutgefäßen mit dem Übergang zu frei zirkulierenden Tumorzellen. Ferner sichert die Transdifferenzierung einer CTC-Subpopulation das Überleben im Blutkreislauf. Denn normalerweise unterliegen Epithelzellen, die den Kontakt zur extrazellulären Matrix verloren haben, einer Form des programmierten Zelltodes, der als Anoikis (altgriechisch: heimatlos) bezeichnet wird. Ohne Anbindung

an die extrazelluläre Matrix ermöglichen Änderungen des Stoffwechsellusters und Widerstandsfähigkeit gegenüber Anoikis aggressiven Krebszellen in der Zirkulation das Überleben und damit die Metastasenbildung. Molekulare Grundlagen der Anoikis-Resistenz, die aggressiven Prostatakrebszellen das Überleben in der Zirkulation und damit überhaupt erst die Absiedlung in entfernten Organen ermöglicht, sind noch unzureichend erforscht [4]. Von der Identifizierung therapeutischer Ziele im Anoikis-Resistenzmechanismus verspricht man sich Angriffspunkte, um die Metastasierungskaskade auf Ebene der CTC aufhalten zu können.

Es ist davon auszugehen, dass es bereits in einem frühen Stadium der Krebsentstehung zur Absiedelung von Tumorzellen kommt. In einigen Studien wurden im peripheren Blut von Patienten mit klinisch lokalisierbarem (nicht metastasiertem) Prostatakrebs denn auch CTC in zumeist

sehr geringer Zahl nachgewiesen. Allerdings konnte ihnen keine prognostische Signifikanz beigemessen werden. Auch zwischen der CTC-Zahl und den klinischen Ergebnissen ließ sich keine eindeutige Korrelation herstellen. Andererseits knüpft sich an verbesserte Verfahren zur Detektion von CTC die Erwartung, dass damit ein Biomarker für Minimal Residual Disease bei der Nachbeobachtung von Prostatakrebs-Patienten verbunden ist.

Nachweis und klinische Bedeutung von CTC bei lokalisiertem Prostatakrebs

Die Isolierung, Quantifizierung und Charakterisierung von CTC bei Prostatakrebs-Patienten konzentrierte sich im Wesentlichen auf fortgeschrittene/metastasierte Krankheitsstadien. Andererseits fehlte es nicht an Bestrebungen, auch bei lokal begrenzten Prostatakarzinomen klinische ver-

wertbare Informationen aus CTC zu gewinnen. Einschlägige Studien waren auf die Bewertung eines durch CTC-Nachweis gegenüber klassischen klinisch-pathologischen Parametern vermehrten Nutzens fokussiert.

Bei Patienten mit lokalisiertem Prostatakrebs wurden CTC – wie nicht anders zu erwarten – seltener und in geringerer Zahl als bei metastasierter Krankheit isoliert. Das trifft insbesondere auf Untersuchungen mit dem CellSearch®-System zu, da diesem Tumorzellen entgehen, die im Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition zunehmend EpCAM-negativ werden.

Keine Korrelation der mit dem CellSearch®-System ermittelten CTC-Zahl und anderen klinischen Parametern [1].

Davis et al. (2008) isolierten bei 21% von 97 Patienten mit lokalisiertem Prostatakrebs CTC in geringer Zahl aus Blutproben, die vor der radikalen Prostatektomie sowie 2, 3 und 6 Wochen postoperativ entnommen worden waren. Sechs Wochen nach der radikalen Prostatektomie wurden CTC in den Proben von 16% der zu Baseline CTC-positiven und 11% der zu Baseline CTC-negativen Männer vorgefunden ($p=0,51$). Bemerkenswerterweise fanden sich auch CTC bei fünf von 25 zur Kontrolle herangezogenen Männern mit erhöhtem PSA, die trotz extendierter Prostatabiopsie mit keiner Tumordiagnose konfrontiert waren. Zu Baseline hatten nur 3,1% der Krebspatienten und 8% der Kontrollen ≥ 3 CTC in 22,5 ml Blut. Zwischen der CTC-Zahl und herkömmlichen Prognosefaktoren bestand keine Korrelation [5].

Meyer et al. (2016) isolierten bei 17 von 152 Patienten mit klinisch lokalisiertem Prostatakrebs (11%) aus Blutproben vom Vortag der radikalen Prostatektomie mit dem CellSearch®-System median 1 CTC/7,5 ml Blut. Beim Staging resultier-

ten dann 62,5% pT2-, 26,3% pT3a- und 11,2% pT3b-Tumoren. Es bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen CTC-Positivität und PSA-Spiegel, pT-Stadium oder Gleason-Score. Auch hinsichtlich der 4-Jahresrate an biochemischer Rezidivfreiheit wurde kein Unterschied zwischen Patienten mit und ohne CTC im Blut registriert ($p=0,7$) [6].

Thalgott et al. (2015) ermittelten mit dem CellSearch®-System CTC im Blut bei 20 Patienten mit lokal fortgeschrittenem Hochrisiko-Prostatakrebs auf gleichem Niveau wie bei 15 gesunden Kontrollen ($p=0,66$) [7].

Mit einem neuen mikrofluidischen Ratschenmechanismus entdeckten Todenhöfer et al. (2016) CTC bei 25 von 50 Patienten mit lokalisiertem Prostatakarzinom. Ihre Anzahl betrug median 9 in 2 ml Blut (Bereich: 1–417). Die CTC-Detektionsrate war deutlich höher als die in Studien, die mit dem CellSearch®-System durchgeführt worden waren. Die Autoren führen ihre erhöhte EpCAM-Positivität darauf zurück, dass die Zelladhäsionsmoleküle mit Immunfluoreszenzmikroskopie auch bei geringer Expressionsstärke sichtbar werden, während sie der Erfassung mit immunomagnetischer Zellseparation entgehen [8].

Mit verbessertem CTC-Nachweis zum Biomarker für minimale Resterkrankung [9]: Um bei Patienten mit nicht-metastasiertem Hochrisiko-Prostatakrebs eine erhöhte Sensitivität des CTC-Nachweises zu erreichen, kombinierten Kuske et al. (2016) drei methodisch differierende CTC-Assays: CellSearch®, GILUPI CellCollector® und EPISPOT. Damit ließ sich bei 86 Patienten mit nicht metastasiertem Hochrisiko-Prostatakrebs (37 Patienten Tc1, 45 T2) eine hohe Inzidenz an CTC nachweisen. Hierdurch erlangen CTC-basierte Flüssigbiopsien die Fähigkeit, in diesem Patientenkreis das Vorliegen einer minimalen Resterkrankung zu überwachen [9].

Brachytherapie: CTC-Nachweis erst unmittelbar nach der Seed-Implantation [10]: Von einer japanischen Studiengruppe wurde untersucht, ob für Prostatakrebs-Patienten, die sich der Brachytherapie unterziehen, bei der Seed-Implantation das Risiko der hämatogenen Verschleppung von Tumorzellen besteht. Hierfür wurden den Männern ($n=59$) Blutproben vor Einsetzen der Nadeln und unmittelbar nach der Prozedur abgenommen. In 7,5 ml des präoperativen Blutes ließen sich mittels CellSearch®-System in keinem Fall CTC nachweisen. Hingegen fanden sich nach dem Eingriff bei sieben Patienten (11,8%) ≥ 1 CTC/7,5 ml Blut. Es bestand keine Korrelation mit Variablen wie dem PSA-Wert bei der Diagnosestellung, einer vorausgegangenen neoadjuvanten Androgendeprivationstherapie, der Art der Brachytherapie oder dem Gleason-Score [10].

CTC bei hormonsensitivem Prostatakrebs (HSPC) als Echtzeit-Substrat für krankheitsrelevantes targeted Next-Generation Sequencing (NGS) [11]: Auf dem ASCO 2013 stellten Liu et al. eine Pilotstudie vor, in der sie die Anwendbarkeit von CTC als krankheitsrelevantes Substrat für Echtzeit-NGS unter Beweis stellten. Dem lag das Bestreben zu Grunde, personalisierte genomische Ziele, an denen sich die Behandlungsstrategie orientieren kann, trotz fehlender Gewebeproben des Primärtumors identifizieren zu können. Ihre Zielgruppe waren in erster Linie Patienten, die sich einer definitiven Strahlentherapie unterziehen oder bei denen die Krankheit bei der Diagnosestellung bereits metastasiert hat. Die CTC wurden aus Blutproben von Patienten mit HSPC mittels einer immunoaffinitätsbasierten mikrofluidischen, für genomische Ereignisse maßgeschneiderten Vorrichtung isoliert. Bei der achtköpfigen Patientengruppe wurden in allen Fällen CTC erhalten (median 64,5, Bereich: 17–217). Krebs-

relevante Einzelnukleotid-Varianten waren bei der Hälfte der Patienten detektierbar [11].

Charakterisierung und molekulare Analyse isolierter CTC

Bei der Charakterisierung von CTC lag der Schwerpunkt bisher auf dem Nachweis der Expression des Androgenrezeptors (AR) und/oder seiner Varianten. Das ist der Erkenntnis geschuldet, dass Kastrationsresistenz beim Prostatakarzinom mit der Wiederaufnahme der Transkriptionsaktivität des AR durch Gain-of-Function-Mutationen oder die Expression konstitutiv aktiver AR-Splicevarianten assoziiert ist, und daraus Informationen über das Ansprechen auf bestimmte Therapieformen abgeleitet werden können.

Wahl zwischen Antiandrogen- und Taxan-Therapie anhand des AR-V7-Status: Antonarakis et al. isolierten mit dem AdnaTests CTC aus dem Blut von CRPC-Patienten unter antihormoneller Therapie der neuen Generation. In 29% der Fälle wiesen sie in den CTC die Androgenrezeptor-Variante 7 (AR-V7) nach. Deren Vorkommen war prognostisch für Überlebensparameter und stand im Zusammenhang mit Resistenz gegenüber Abirateron und Enzalutamid [12]. In einer analogen Studie mit Taxan-behandelten CRPC-Patienten hatten AR-V7-positive CTC keine prognostische und prädiktive Aussagekraft [13].

CTC-Telomerase-Aktivität molekularer Biomarker beim mCRPC [24]: Mit der in intakten CTC gemessenen Telomerase-Aktivität erprobten Goldkorn et al. (2015) erstmals einen Kandidaten für CTC-assoziierte Biomarkerfunktion bei mCRPC-Patienten. Hierfür griffen sie auf prospektive Daten der Phase-III-Studie SWOGS0421 zurück. Mit einem neuartigen Mikroschlitzfilter waren lebensfähige

CTC in den Blutproben erfasst und die Messung der Telomerase-Aktivität durchgeführt worden, während die Auszählung der CTC parallel mittels CellSearch® erfolgt war. Von 263 Patienten waren 263 Proben erhalten worden, die zu 215 Messungen der Telomerase-Aktivität geführt hatten. Nur bei Männern mit einer CTC-Zahl ≥ 5 CTC/7,5 ml Blut war nach Korrekturen für andere klinische Kovariate eine signifikante Korrelation zwischen Telomerase-Aktivität und OS feststellbar (HR: 1,14; $p=0,001$) [14].

CTC-Zahl wertet konventionelles Prognose-Modell auf [25]: Durch Hinzufügen der CTC-Zahl zu einem Prognose-Modell („ALPHA“) aus Albumin, Laktatdehydrogenase (LDH), PSA, Hämoglobin und alkalischer Phosphatase (ALK) erhöhte sich dessen Trennschärfe als prognostischer Biomarker für Überlebenswahrscheinlichkeit bei Patienten mit mCRPC [25]. Das analysierten Heller et al. (2017) anhand der Daten zweier prospektiver, randomisierter, zulassungsrelevanter Studien (COU-AA-301 und ELM-PC4). Die Integration der CTC-Auszählung zu Beginn und während der frühen Behandlungsphase in das ALPHA-Modell erlaubte eine akkuratere Bestimmung des Risikos zu Baseline und Post-Baseline in einem prospektiven Patientenkreis mit mCRPC [15].

Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) in CTC

Die EMT ist ein dynamischer morphogenetischer Prozess, der auch an der Entstehung von CTC beteiligt ist, und hierüber mit gesteigerter Invasivität und Metastasierung im Zusammenhang steht. Dabei wird die Expression epithelialer Marker wie E-Cadherin, EpCAM und Zytokeratin (CK) im Verlauf der EMT herunterreguliert und die mesenchymalen Marker wie N-Cadherin, Vimentin und Twist heraufreguliert.

Durch den Verlust epithelialer Merkmale und die Annahme eines mesenchymalen Phänotyps entziehen sich EMT-transformierte CTC der Erfassung mit EpCAM-basierten Technologien wie insbesondere mit dem CellSearch®-System. Das wird bei ~35% der Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom deutlich, bei denen sich mit der CellSearch®-Methode keine CTCs nachweisen lassen. Da bei systemischer Ausbreitung normalerweise nicht davon auszugehen ist, dass tatsächlich keine CTC vorhanden sind, bietet sich als Erklärung hierfür der EMT-bedingte Verlust der CTC-Identifizierungsmarker an. Andererseits bedürfen die den CTC zugrundeliegende Biologie und das komplexe Zusammenwirken von EMT, CTC und Metastasierung der grundlegenden Aufklärung.

Untersuchung menschlicher CTC in Maus-Xenograft-Modellen [16]: In der Studie von Lowes et al. (2016) wurden ein dem CellSearch®-System (CSS)-analoger EpCAM-basierter Assay und ein vom EMT-Status semi-unabhängiger Assay verglichen. Letzterer basierte auf dem Entzug der CD45⁺-Leukozyten mittels negativer Immunoselektion und nachfolgend kombinierter Markierung der Tumorzellen mit humanem Leukozytenantigen (HLA) und EpCAM. Mit diesen Assays wurde zunächst die Nachweisbarkeit von vier humanen Prostatakrebs-Zelllinien mit ansteigend mesenchyalem Phänotyp (LNCaP, LNCaP C4-2B, PC-3, PC-3M) in damit versetztem Mäuseblut geprüft. Den Erwartungen entsprechend konnte mit dem CSS-Assay ein signifikanter Anteil der mesenchymalen CTC (~40–50%) nicht entdeckt werden.

Nach jeweils orthotoper Injektion der Prostatakrebs-Zelllinien in Mäuse ließen sich in deren Blut in vivo entstandene CTC nachweisen. Dabei war die Freisetzung von CTC bei Prostatakrebs-Zelllinien mit verstärkt mesenchyalem Phänotyp

deutlich am stärksten ausgeprägt. Zudem waren deren CTC mit dem CSS-basierten Assay vielfach nicht nachweisbar. Das bezieht sich im Wesentlichen auf den Status nach der Etablierung von Metastasen, während die CTC in frühen Krankheitsstadien mit dem CSS überwiegend erfasst wurden [35].

Prostatakrebs-Zelllinien mit deutlich ausgeprägtem mesenchyalem Phänotyp waren verstärkt zur Bildung von Primärtumoren und zur Metastasierung befähigt. Bei der Injektion von PC-3M-Zellen kam es signifikant häufiger und zu größeren Primärtumoren als mit den anderen Zelllinien ($p=0,05$). Andererseits waren das Gewicht der Primärtumoren und die Anzahl der in die Blutzirkulation abgegebenen CTC (vom EMT-Status semi-unabhängiger Assay) bei allen Zelllinien positiv korreliert (Abb.) [16].

Auszählung Vimentin-positiver CTC für Prostatakrebs-Progression prädiktiv [17]: Satelli et al. (2017) analysierten Blutproben von 48 Prostatakrebs-Patienten (hormonsensitive und kastrationsresistente Subgruppen) hinsichtlich drei unterschiedlicher Eigenschaften: (1) Die Bestimmung der Zahl EMT-assoziiierter CTC mit dem gegen Zelloberflächen-Vimentin (cell-surface vimentin, CSV) gerichteten monoklonalen Antikörper Klon 84-1, (2) die Auszählung der nach der CellSearch-Methode isolierten CTC und (3) die Bestimmung des Serum-PSA-Spiegels. Ziel war es, zwischen den Populationen mit Krankheitsprogression und denen mit Behandlungsansprechen unterscheiden zu können. Im Vergleich mit dem CellSearch®-System hatte die CSV-basierte Methode höhere Sensitivität und Spezifität. Bei CRPC-Patienten war die CTC-Zahl mit der CSV-Methode signifikant größer als mit der CellSearch®-Methode. Die CSV-basierten CTC-Zahlen und die PSA-Spiegel waren unabhängig mit Kastrationsresistenz assoziiert [17].

CTC signalisieren Therapieresistenzen

Oft bewirken genetische Veränderungen in Tumoren, dass sie Resistenz gegenüber einer bis dato wirksamen Therapie entwickeln. Die Information über diesen Wechsel steckt wahrscheinlich frühzeitig in den CTC. Ließe sich den CTC diese Information entlocken, könnten Patienten auf eine alternative Therapie umgestellt werden, bevor sich wieder Tumorwachstum bemerkbar macht. Allerdings liegen hierzu erst wenige anspruchsvolle Proof-of-principle-Studien vor. Damit

aber hochtechnologische Methoden zur molekularen Charakterisierung von CTC den Eingang in den klinischen Betrieb finden können, müssen leichter handhabbare Technologien zur schonenden Isolierung der seltenen fragilen Zellen entwickelt werden.

Wnt-Signalwegaktivierung bei Resistenz gegen Antiandrogen-Therapie [18]: Miyamoto et al. (2015) gelang es, mit dem CTC-iChip 77 intakte CTC von 13 CRPC-Patienten zu isolieren (im Mittel 6 CTC/Patient). Die Einzelzell-RNA-Sequenzierung offenbarte eine Reihe von Abweichungen zum Primärtumor wie auch beträchtliche intraindividuell

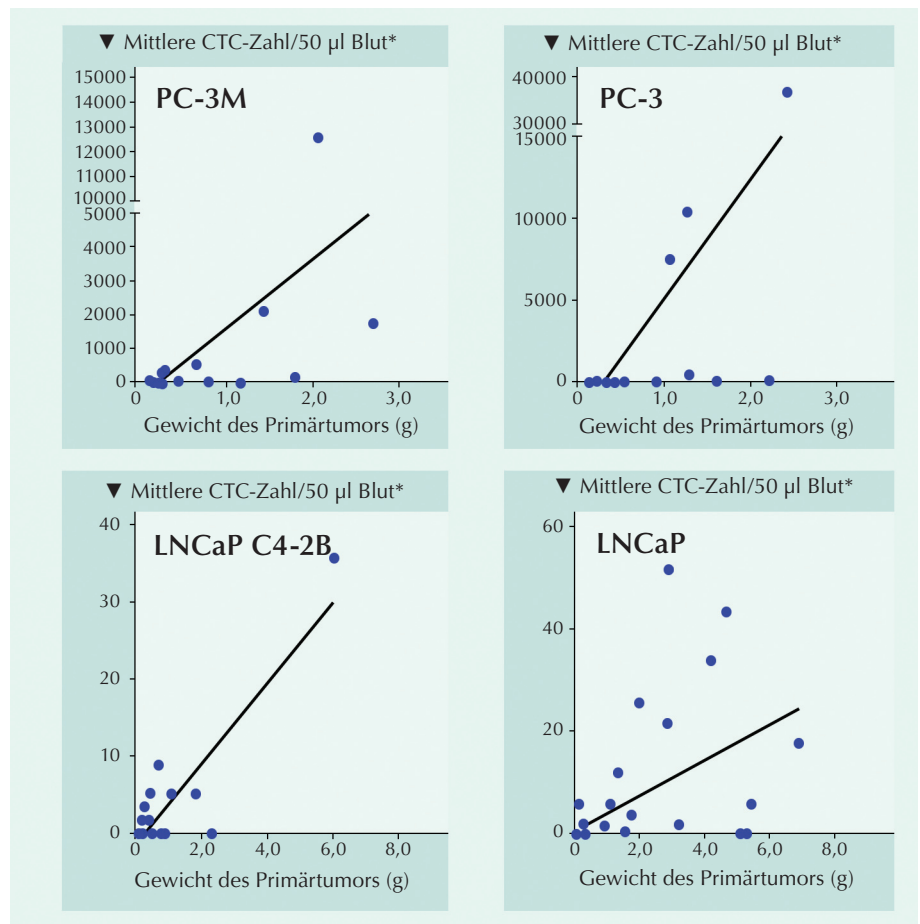


Abb.: Xenograft-Tumoren mit zunehmend mesenchyalem Phänotyp generieren CTC in größerer Anzahl zu einem frühen Zeitpunkt und mit größerer metastatischer Kapazität als Prostatakarzinome mit epithelialem Phänotyp. Die mittlere normierte CTC-Zahl/50µl Blut (Anwendung des vom EMT-Status semi-unabhängigen Assays) korreliert bei allen Zelllinien mit dem Gewicht des Primärtumors. * Normierte Assay-spezifische Zelllinien-Erfassung [16].

le Heterogenität und Diversität an Signalwegen, die an einem Therapieversagen beteiligt sein können. Insbesondere wurde bei einigen Patienten eine differente Expression von Androgenrezeptor-Genmutationen in einzelnen CTC und die Aktivierung nicht-kanonischer (β -Catenin-unabhängiger) Wnt-Signalwege nachgewiesen. Hierdurch wird Therapieresistenz infolge gesteigerter Invasivität und maligner Progression begünstigt [18].

Sequenzierung des Exoms einzelner CTC [19]: Von der Sequenzierung aller Abschnitte des Genoms, die potenziell Proteine kodieren, werden Antworten auf die Fragen erwartet, wie sich Tumore entwickeln, woraus CTC abstammen und welche Wirkung von Therapeutika zu erwarten ist. Auch wenn mit der Charakterisierung einzelner CTC die Gewinnung von schwer zugänglichem metastasiertem Gewebe umgangen wird, stellt die Isolierung geeigneter intakter Zellen aus dem Blut und die Sequenzierung derart geringen Ausgangsmaterials neue schwer zu überwindende Hürden dar [19].

Das Vorgehen umfasste die Zellanreicherung und Isolierung, die genomische Amplifikation, die Qualitätskontrolle der DNA-Bibliotheken sowie die Sequenzierung. Mit der MagSweeper-Technik wurden EpCAM-exprimierende CTC angereichert. Die isolierten Zellen wurden in Nöpfchen (Wells) auf Mikrotiterplatten überführt und geeignete CTC anhand epifluoreszenzmikroskopischer Bildgebung aussortiert. Bei der Sequenzierung beschränkten Lohr et al. (2014) die Strategie des „census-based sequencing“, bei der zur Verbesserung der Sensitivität Sequenzierungsdaten aus unabhängigen CTC-Bibliotheken kombiniert werden. Machtkalkulationen lassen erkennen, dass hiermit die Zuordnung von >99,995% des Exoms in den CTC möglich war [19].

Das Vorgehen wurde bei zwei Prostatakrebs-Patienten überprüft. In ei-

nem Fall konnten CTC, eine Lymphknoten-Metastase und neun Stanzungen des Primärtumors sequenziert werden. Im zusammengehörenden Gewebe stimmten 51 von 73 Mutationen (70%) überein. Ferner wurden in Tumorproben 10 Mutanten, die bereits früh in der Tumorentwicklung vorhanden sind, und 56 Mutanten in metastatischen Präkursoren identifiziert, von denen sich 90% bzw. 73% auch in CTC-Exomen nachweisen ließen [19].

Fazit

Zirkulierende Tumorzellen gehören heute als Biomarker zum erweiterten klinischen Instrumentarium in der Behandlung bei Prostatakrebs. Ihre Anwendung auf Fragestellungen bei Patienten mit lokalisiertem Prostatakrebs setzt erweiterte Detektionsverfahren voraus, mit denen das komplette CTC-Spektrum erfasst wird. Bei Patienten mit fortgeschrittenem/metastasiertem Prostatakarzinom ist die Quantifizierung isolierter CTC als mehrfach verifizierter prognostischer Parameter etabliert. Studien jüngerer Datums befassen sich überwiegend mit dem genomischen Profiling viabler CTC. Sie liefern wegweisende Informationen zur geeigneten Therapiewahl und können frühzeitig die Resistenzentwicklung erkennen lassen. Doch trotz bedeutender Fortschritte hinsichtlich der klinischen Anwendbarkeit von CTC bestehen noch grundlegende Anforderungen an ihre praktische Umsetzung im Klinikbetrieb, bevor sie zum routinemäßigen onkologischen Rüstzeug gehören. *jfs* ◀

[1] Maas M, Hegemann M, Rausch S, et al. 2017. Circulating tumor cells and their role in prostate cancer. *Asian J Andro* doi: 10.4103/aja.aja_29_17. [Epub ahead of print].

[2] Chen JF, Lu YT, Cheng S, et al. 2017. Circulating tumor cells in prostate cancer: beyond enumeration. *Clin Adv Hematol Oncol* 15:63-73.

[3] Liu W, Yin B, Wang X, et al. 2017. Circulating tumor cells in prostate cancer: Precision diagnosis and therapy. *Oncol Lett* 14:1223-1232.

[4] Howard EW, Leung SC, Yuen HF, et al. 2008. Decreased adhesiveness, resistance to anoikis and suppression of GRP94 are integral to the survival of circulating tumor cells in prostate cancer. *Clin Exp Metastasis* 25:497-508.

[5] 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* 179:2187-2191.

[6] Meyer CP, Pantel K, Tennstedt P, et al. 2016. Limited prognostic value of preoperative circulating tumor cells for early biochemical recurrence in patients with localized prostate cancer. *Urol Oncol* 34:235.e11-6.

[7] Thalgot M, Rack B, Maurer T, et al. 2013. Detection of circulating tumor cells in different stages of prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 139:755-763.

[8] Todenhöfer T, Park ES, Duffy S, et al. 2016. Microfluidic enrichment of circulating tumor cells in patients with localized localized prostate cancer. *Urol Oncol* 34:483.e9-483.e16.

[9] Kuske A, Gorges TM, Tennstedt P, et al. 2016. Improved detection of circulating tumor cells in non-metastatic high-risk prostate cancer patients. *Sci Rep* 6, 39736; doi: 10.1038/srep39736

[10] Tsumura H, Satoh T, Ishiyama H, et al. 2017. Perioperative search for circulating tumor cells in patients undergoing prostate brachytherapy for clinically nonmetastatic prostate cancer. *Int J Mol Sci* 18, pii: E128.

[11] Liu SV, Dempsey PW, Strauss W, et al. 2013. Targeted next-generation sequencing (NGS) of circulating tumor cells (CTCs) in hormone-sensitive prostate cancer (HSPC). *J Clin Oncol* 31, no. 15_suppl (May 2013) 11040-11040.

[12] Antonarakis AS, Lu C, Wang H, et al. 2014. AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *N Engl J Med* 371:1028-1038.

[13] Antonarakis ES, Lu C, Luber B, et al. 2015. Androgen receptor splice variant 7 and efficacy of taxane chemotherapy in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *JAMA Oncol* 1:582-591.

[14] Goldkorn A, Ely B, Tangen CM, et al. 2015. Circulating tumor cell telomerase activity as a prognostic marker for overall survival in SWOG 0421: a phase 3 metastatic castration resistant prostate cancer trial. *Int J Cancer* 136:1856-1862.

[15] Heller G, Fizazi K, McCormack R, et al. 2017. The added value of circulating tumor cell enumeration to standard markers in assessing prognosis in a metastatic castration-resistant prostate cancer population. *Clin Cancer Res* 23:1967-1973.

[16] Lowes LE, Goodale D, Xia Y, et al. 2016. Epithelial-to-mesenchymal transition leads to disease-stage differences in circulating tumor cell detection and metastasis in pre-clinical models of prostate cancer. *Oncotarget* 7: 76125-76139.

[17] Satelli A, Batth I, Brownlee Z, et al. 2017. EMT circulating tumor cells detected by cell-surface vimentin are associated with prostate cancer progression. *Oncotarget* 8: 49329-49337.

[18] Miyamoto DT, Zheng Y, Wittner BS, et al. 2015. RNA-Seq of single prostate CTCs implicates noncanonical Wnt signaling in anti-androgen resistance. *Science* 349:1351-1356.

[19] Lohr JG, Adalsteinsson VA, Cibulskis K, et al. 2014. Whole-exome sequencing of circulating tumor cells provides a window into metastatic prostate cancer. *Nat Biotechnol* 32: 479-484.