

**Das F-box/SPRY domain-containing protein 1  
(FBXO45) ist ein prognostisch relevanter Biomarker im  
Prostatakarzinom mit TMPRSS2-ERG Genfusion**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Marthe Antonia von Danwitz**

aus Brühl

2024

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Jörg Ellinger
2. Gutachter: PD Dr. med. Georg Feldmann

Tag der Mündlichen Prüfung: 02.07.2024

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Manuel Ritter

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	4
<b>1. Deutsche Zusammenfassung</b>	5
1.1 Einleitung	5
1.2 Material und Methoden	8
1.3 Ergebnisse	10
1.4 Diskussion	13
1.5 Zusammenfassung	16
1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	17
<b>2. Veröffentlichung</b>	23
Abstract	21
Introduction	24
Materials and Methods	24
Results	27
Discussion	30
Conclusion	31
References	31
<b>3. Danksagung</b>	34

## Abkürzungsverzeichnis

CRPC: Kastrations-resistentes Prostatakarzinom

ERG: Erythroblast-transformation-specific-related gene

FBXO45: F-box/SPRY domain-containing protein 1

FBXW7: F-Box/WD-Repeat-enthaltende Protein 7

ISUP: International Society of Urological Pathology

microRNA: micro-Ribonukleinsäure

mRNA: Messenger-Ribonukleinsäure

NAT: Normal adjacent tissue

Par-4: Prostata-Apoptose-Reaktionsprotein 4

PCA: Prostatakarzinom

PFS: Progressionsfreies Überleben

pPCA: Primäres Prostatakarzinom

PSA: Prostata-Spezifisches Antigen

pT: postoperative histopathologisch nachweisbare Ausdehnung des Primärtumors

pN: postoperativer histopathologisch nachweisbarer Lymphknotenbefall

RNA: Ribonukleinsäure

RT-qPCR: Realtime-quantitative Polymerase-Kettenreaktion

TCGA: The Cancer Genome Atlas

TMA: Tissue Microarray

TMPRSS2: Transmembrane Serinprotease 2

# 1. Deutsche Zusammenfassung

## 1.1 Einleitung

Das Prostatakarzinom (PCA) ist eine der häufigsten Krebserkrankungen bei Männern; weltweit betrachtet ist Prostatakrebs eine der Hauptursachen für krebsbedingte Todesfälle (Sung et al., 2021). Bei klinischem Verdacht auf ein PCA, zum Beispiel durch eine auffällige Tastuntersuchung oder einen erhöhten Wert des Prostata-Spezifischen Antigens (PSA), ist zur Diagnosesicherung eine Stanzbiopsie der Prostata angezeigt (EAU-Leitlinie, 2023). Um bei positivem stanzbiopsischen Befund eine Therapieentscheidung für das PCA zu treffen, wird im klinischen Alltag die Risikostratifizierung nach D'Amico angewandt, welche anhand klinisch-pathologischer Parameter in Niedrig-, Mittel- und Hochrisiko-Stadien einteilt, die dann entscheidend für das therapeutische Konzept sind (D'Amico et al., 2008). Insgesamt ist die Prognose des PCA gut (Hamdy et al., 2023), jedoch sind aufgrund der hohen Inzidenz insgesamt viele Todesfälle zu verzeichnen (Sung et al., 2021)

Kritische Schritte im Fortschreiten des PCAs sind insbesondere die Metastasierung sowie die Entwicklung der Kastrationsresistenz. Im sogenannten kastrationsresistenten Stadium wächst das PCA unabhängig von einer Androgenentzugstherapie weiter. In den letzten Jahren konnten erhebliche medizinische Fortschritte in der Therapie des klinisch fortgeschrittenen PCAs erzielt werden; das 4-Jahres-Gesamtüberleben von Patienten mit metastasiertem PCA konnte beispielsweise im Rahmen der ARASENS-Studie unter Triple-Therapie (Docetaxel, Abiraterone, Darolutamid) auf etwa 63% gesteigert werden, während es in der Placebo-Gruppe bei etwa 50 % lag (Smith et al., 2022) . Trotz der verbesserten Therapien ist die Mortalität im PCA durch die hohen Inzidenzen nicht zu unterschätzen (Sung et al., 2021). Zur Verbesserung der Mortalitätsraten könnte die Bestimmung prognostisch relevanter Biomarker eine entscheidende Rolle spielen.

Bisher finden molekulare Untersuchungen in der prognostischen Abschätzung des PCA kaum Anwendung, es erfolgt prätherapeutisch im Rahmen der Risikostratifizierung lediglich eine Einteilung anhand des PSA-Wertes, der klinischen Tastuntersuchung sowie

der histopathologischen ISUP-Gruppe (EAU-Leitlinie, 2023). Diese geben eine gute Orientierung hinsichtlich der Prognose, sind allerdings in ihrer Aussagekraft limitiert: Das ISUP-Grading weist beispielsweise eine Interobserver-Variabilität auf (Flach et al., 2022), während der PSA-Wert fälschlicherweise erhöht sein kann (Kilpeläinen et al., 2011). Insgesamt führt diese Einteilung zu merklicher Überbehandlung klinisch nicht signifikanter Tumoren (Schröder et al., 2014).

Komplementäre Biomarker zur besseren Prognosevorhersage könnten einerseits helfen, Patienten mit aggressiver Tumorbilogie zu identifizieren, die von Therapieintensivierung profitieren würden. Durch eine bessere Risikostratifizierung könnten andererseits aggressive Therapien mit einhergehenden Komplikationen, wie zum Beispiel postoperative Harninkontinenz (Aydin Sayilan und Özbaş, 2018), bei ausgewählten Patienten vermieden werden. Bei einem beträchtlichen Anteil an Patienten mit einem niedrigen oder intermediären Risiko nach D'Amico ist eine aktive Überwachung beim lokalisierten PCA ausreichend (Hamdy et al., 2023). Im Gegenzug wäre eine genauere Stratifizierung wichtig, um aggressivere Varianten frühzeitig zu detektieren.

PCAs weisen unterschiedliche molekulargenetische Signaturen, die bei der Identifizierung neuer Biomarker berücksichtigt werden sollten (He et al., 2018) ;Gerke et al., 2020). Etwa die Hälfte aller PCAs wird durch chromosomale Umlagerungen charakterisiert, die zur Fusion eines chimären Onkogens durch den Promotorbereich des durch Androgene induzierten transmembranösen Serinprotease-2-(TMPRSS2) Gens mit dem ETS-verwandten Gen (ERG) führen (TMPRSS2-ERG, T2E). Die TMPRSS2-ERG-Fusion wird als treibendes Ereignis für die Progression von Prostatakrebs anerkannt. Vorherige Studien haben gezeigt, dass T2E-positive und T2E-negative PCAs molekular unterschiedliche PCA-Subtypen darstellen, und potenzielle Biomarker sollten auch subtypspezifisch berücksichtigt werden (Gerke et al., 2020).

Die Datenbank der The Cancer Genome Atlas (TCGA) stellt mit seinen umfangreichen online verfügbaren Datensatz ein wertvolles Werkzeug zur explorativen Identifizierung potenzieller Biomarker dar. Durch eine explorative Analyse stießen wir auf FBXO45, ein prognostisch relevantes Gen, welches wir für eine tiefer gehende Untersuchung im Rahmen dieser Dissertationsarbeit auswählten. FBXO45 gehört zur Familie der F-Box-

Proteine und fungiert als substratspezifische Adaptereinheit in Ubiquitin-Ligase-Komplexen, die den Proteasom-Abbau zentraler zellulärer Regulatoren begünstigen (Cenciarelli et al., 1999; Jin et al., 2004; Skowyra et al., 1997; Liao et al., 2004). Eine weitere interessante Beobachtung hinsichtlich des PCAs ist, dass Par-4 (Prostata-Apoptose-Reaktionsprotein 4) als ein weiteres Zielprotein von FBXO45 identifiziert wurde. Par-4 ist ein Tumorsuppressor, der eine krebsselektive Apoptose auslöst. Wenn ein überexprimiertes FBXO45 verstärkt an Par-4 antiapoptotisch agiert, scheint ein Tumorprogress naheliegend, was auch schon in anderen Studien gezeigt werden konnte: Die Herunterregulierung oder gar der Funktionsverlust von Par-4 wurde bereits in der Vergangenheit mit Therapieresistenz von Tumoren und deren Rezidiven in Verbindung gebracht (Chen et al., 2014; Lin et al., 2020; Burikhanov und Rangnekar, 2021). Es wurde bereits berichtet, (Chen et al., 2014) dass FBXO45 die Apoptose, die neuronale Entwicklung und die Karzinogenese reguliert (Chen et al., 2014; Peschiaroli et al., 2009; Wang und Wei, 2014; Abshire et al., 2016; Hsieh et al., 2018). FBXO45 konnte bereits als prognostischer Parameter bei zahlreichen Krebsarten wie Plattenepithelkarzinom der Lunge und Magenkrebs identifiziert werden (Kogure et al., 2017; Wang et al., 2018; Lin et al., 2020).

Bislang erfolgte jedoch keine ausführliche Analyse zu der Rolle von FBXO45 im PCA. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich vielversprechende Merkmale für die weitere Forschung am PCA insbesondere an Genen, die eine Korrelation mit ungünstigem klinischen Outcome sowie ungünstigen pathologischen Parametern, finden. Daher wurde FBXO45 in dieser Studie als Target für eine ausführliche Analyse ausgewählt.

Die prognostische Relevanz von FBXO45 galt es in dieser Studie durch Expressionsanalysen etablierter PCA-Kohorten sowie durch funktionelle *in vitro*-Analysen an mehreren PCA- Zellkulturmodellen eingehend zu untersuchen.

## 1.2 Material und Methoden

Alle Versuche und Methoden sind ausführlich in der Publikation (Seite 22 ff.) sowie in einer weiteren von mir mit publizierten Arbeit (Klümper et al., 2020) beschrieben, hier wird daher das Wichtigste in Kürze dargestellt.

Um die PCA-Gewebekohorte zu etablieren, wurden Log<sub>2</sub>-transformierte RNA-Sequenzierungsdaten, die über die IlluminaHiSeq Plattform generiert wurden und vom TCGA Research Network öffentlich zugänglich sind, verwendet (<https://portal.gdc.cancer.gov/>, 2023). Die Kohorte dieser Studie umfasste 497 primäre PCA- und 52 Fälle von nicht-tumorösen Prostatagewebe angrenzend an den Tumor (normal adjacent tissue, NAT). Zusätzlich wurde mit Log-transformierten, pränormalisierten Array-Signalintensitäten von Microarray-Daten aus einer PCA-Progressionskohorte über Gene Expression Omnibus (Chandran et al., 2007) gearbeitet, welche ebenfalls öffentlich sind (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, 2023). Des Weiteren wurden Expressionsdaten von 25 metastatischen CRPC-Proben von vier Patienten eingeschlossen. Diese stammten von verschiedenen metastatischen Stellen und wurden daher als Einzelproben betrachtet (Primäres Prostatakarzinom (pPCA): n=66, Metastase: n=25).

Des Weiteren wurde eine primäre PCA-Gewebe-Mikroarray (TMA)-Kohorte immunhistochemisch analysiert. Tumorproben mit fehlendem Gewebe oder ohne Karzinom wurden nicht berücksichtigt. Insgesamt konnte das Gewebematerial von 161 Patienten mit PCA, die sich zwischen 1998 und 2008 einer radikalen Prostatektomie am Universitätsklinikum Bonn unterzogen hatten, ausgewertet werden. Nach Schneiden und Auftragen der Proben wurde die Färbung mit dem polyklonalen FBXO45-Antikörper (Antikörper-Seriennummer: bs-13150R, Verdünnung 1:300) auf dem automatischen Färbesystem Ventana Benchmark nach dem Protokoll des Herstellers (Ventana Medical System, Tucson, AZ, USA) vom Institut der Pathologie durchgeführt. In einem etablierten Verfahren (Condic et al., 2023) bewerteten zwei Untersucher\*innen unabhängig voneinander die Intensität der FBXO45-Färbung in den Kategorien negativ, schwach, mäßig oder stark (Werte 0 bis 3). Im Falle divergierender Bewertungen wurde ein Konsens durch Diskussion erzielt. Jeder TMA-Kern wurde individuell bewertet. Falls für einen



einzelnen Befund mehrere TMA-Kerne verfügbar waren, wurde der Mittelwert berechnet und für die weiteren Auswertungen berücksichtigt. Um die prognostische Rolle der FBXO45-Expression abhängig vom TMPRSS2-ERG-Status zu untersuchen, wurde eine Überlebensanalyse im Hinblick auf das progressionsfreie Überleben sowohl basierend auf der Gesamtkohorte als auch nach Stratifizierung nach TMPRSS2-ERG-Status (T2E-positiv, n=54 vs. T2E-negativ, n=107) durchgeführt, wie zuvor beschrieben (Gerke et al., 2020). Das progressionsfreie Überleben wurde als PSA-Rezidivfreies (PSA  $\geq$  0,2 ng/ml) Überleben nach radikaler Prostatektomie bestimmt.

Zur Untersuchung der funktionellen Rolle von FBXO45 *in vitro*, wurden zunächst die humanen PCA-Zelllinien (LNCaP, DU-145, PC-3 sowie C4-2B) unter Mykoplasmen-freien Bedingungen herangezüchtet.

Um einen transienten FBXO45-Knockdown zu erreichen, wurde ein spezifisches FBXO45-GapmeR-Konstrukt, mit dem die Zellen transfiziert wurden, entworfen. 48 Stunden nach der Transfektion isolierte ich RNA aus diesen Zellen, validierte die Menge sowie die Qualität und analysierte die Effizienz des Knockdowns mittels RT-qPCR.

Die Messung der Knockdown-Effizienz auf Proteinebene erfolgte mittels Western-Blot. 72 Stunden nach der GapmeR-Transfektion wurde der Proteinanteil aus den PCA-Zellen lysiert und die geladenen Proteine mit einem FBXO45-spezifischen Antikörper inkubiert. Als interne Ladekontrolle diente Tubulin.

Zur Quantifizierung der zellulären Proliferation wurde das EZ4U-Assay-Kit benutzt, in welchem 2000 bzw. 3000 Zellen pro Well in einer 96-well Platte ausgesät wurden. Über Nacht konnten diese sich anheften, wurden am Folgetag transfiziert und anschließend 48 bzw. 72 Stunden inkubiert. Mittels Farbabsorption wurde das Ergebnis dargestellt und zur Validierung der Ergebnisse wurde das Experiment in dreifacher Ausführung durchgeführt.

Um zu untersuchen, welche Auswirkung ein spezifischer FBXO45-Knockdown auf das zelluläre Migrationsverhalten hat, wurden 48 Stunden nach der Transfektion Zellen in sogenannte Migrationskammern nach Boyden eingesetzt und das Ergebnis nach weiteren 48 Stunden erneut validiert. Zur automatischen Zählung der migrierten Zellen wurde die QuPath-Software genutzt. Jedes Migrationsexperiment wurde zu Validierungszwecken ebenfalls in dreifacher Ausführung durchgeführt.

Microsoft Excel, SPSS und GraphPad Prism wurden für statistische Analysen und die Visualisierung der Daten verwendet. Für Gruppenvergleiche wurden der nichtparametrische Mann-Whitney-U- oder der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Überlebensanalysen wurden anhand von Kaplan-Meier-Schätzkurven und Log-Rank-Tests durchgeführt. So wurden multivariate Cox-Regressionsanalysen nach Koadjustierung des TNM-Stadiums, der ISUP-Gruppen und des Alters durchgeführt, um einen unabhängigen und additiven prognostischen Wert für das progressionsfreie Überleben der Patienten zu ermitteln.

Alle Patienten gaben ihre schriftliche Einwilligung zur Entnahme von Biomaterialien. Die Studie wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Bonn genehmigt (Nummer: 013/20). Die Untersuchungen erfolgten auf Grundlage der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (1983) und den entsprechenden gesetzlichen Grundlagen.

### **1.3 Ergebnisse**

#### *FBXO45 ist mit aggressiven lokalisierten PCA assoziiert*

Um die genauen Auswirkungen von FBXO45 in PCA zu verdeutlichen, haben wir den TCGA-Datensatz mit 497 Proben genutzt. Dabei wurde die Expression von FBXO45 in Beziehung zu klinisch-pathologischen Parametern und dem klinischen Verlauf der Patienten gesetzt. Es zeigte sich eine signifikant höhere FBXO45-Expression bei pPCA im Vergleich zu NAT ( $p < 0,0001$ , Abbildung 1A, Seite 27). Darüber hinaus konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der FBXO45-Expression und ungünstigen klinisch-pathologischen Parametern, wie dem ISUP-Grading ( $p < 0,0001$ , Abbildung 1B, Seite 27), dem pT (postoperative histopathologisch nachweisbare Ausdehnung des Primärtumors) -Stadium ( $p < 0,0001$ , Abbildung 1C, Seite 27) sowie dem pN (postoperativer histopathologisch nachweisbarer Lymphknotenbefall) -Stadium ( $p = 0,044$ , Abbildung 1D, Seite 27) beobachtet werden. Des Weiteren war eine hohe FBXO45-Expression stark mit einem biochemischen Rezidiv assoziiert ( $p = 0,042$ , Abbildung 1E, Seite 27). Um der Frage nachzugehen, ob die FBXO45-Expression in Primärtumoren und Metastasen variiert, erfolgte anschließend die Analyse der PCA-Progressionskohorte GSE6919. Diese Analyse ergab eine signifikant erhöhte FBXO45-RNA-Expression im

Progress zur Fernmetastasierung (Met) ( $p < 0,0001$ , Abbildung 1F, Seite 27). Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass die eine erhöhte transkriptionelle Expression von FBXO45 mit ungünstigen klinisch-pathologischen Parametern im lokalisierten PCA assoziiert ist.

*FBXO45 ist ein prognostischer Biomarker und sagt eine verkürztes Progressionsfreies (PFS) Überleben nach radikaler Prostatektomie voraus*

Im nächsten Schritt wurde die prognostische Bedeutung von FBXO45 auf Proteinebene untersucht. Daher wurde im nächsten Schritt eine immunhistochemische Färbung gegen FBXO45 auf einer PCA-TMA-Kohorte ( $n=161$ ) durchgeführt. Die immunhistochemische Auswertung zeigte, dass sich FBXO45 vor allem im Zytoplasma der Karzinomzellen anfärben ließ. 12,1% der Fälle waren FBXO45-negativ, 57,8% waren schwach gefärbt (mittlere Färbintensität  $\leq 1$ ), 18,5% waren mäßig gefärbt (mittlere Färbintensität 1-2) und 11,6% waren stark gefärbt (mittlere Färbintensität  $> 2$ , siehe Abbildung 2A-C auf Seite 27 für repräsentative Färbebeispiele). In der Kaplan-Meier-Überlebensanalyse zeigte sich ein nicht-signifikanter Trend ( $p=0,077$ ) hinsichtlich eines Zusammenhangs zwischen starker FBXO45-Expression (mittlere Färbintensität  $> 2$ ) und verkürztem PSA-freien Überleben nach Prostatektomie. In einer explorativen Subgruppenanalyse der Bonner TMA-Kohorte konnte festgestellt werden, dass die zytoplasmatische FBXO45-Proteinexpression in der T2E-positiven Untergruppe signifikant höher war (Abbildung 2E, Seite 28). Bemerkenswert ist, dass eine starke zytoplasmatische FBXO45-Proteinexpression signifikant mit einem verkürzten PFS in der T2E-positiven Untergruppe assoziiert war (Abbildung 2F, Seite 28), aber nicht in der T2E-negativen Untergruppe (T2E-negativ: Log Rank  $p=0,893$ ). Innerhalb der T2E-positiven Untergruppe bestätigte die multivariate Cox-Regressionsanalyse eine starke zytoplasmatische FBXO45-Färbung (mittlere Färbintensität  $> 2$ ) als unabhängigen prognostischen Parameter (Hazard Ratio 4,483,  $p=0,022$ ) bei Koadjustierung für pT-Stadium, pN-Stadium, ISUP-Gruppen und Alter (Tabelle 1, Seite 29).

### *FBXO45 verringert die Migration von PCA-Zellen in der Zellkultur*

Um die funktionelle Rolle von FBXO45 *in vitro* zu Charakterisierung, wurden mit Hilfe des etablierten Antisense Locked Nuclear Acid/GapmeR-vermittelten Systems in mehreren etablierten PCA-Zellkulturmodellen transiente FBXO45-Knockdowns induziert. Zunächst untersuchten wir die Zelllinien PC-3, C4-2B, LNCaP und DU-145 auf ihre FBXO45-Proteinexpression unter Standardbedingungen. Da PC-3, LNCaP und DU-145 die stärkste Proteinexpression von FBXO45 aufwiesen, wurden diese Zelllinien für die nachfolgenden Funktionsanalysen ausgewählt (Abbildung 3A, Seite 29). Es konnte ein effizienter FBXO45-Knockdown für PC-3, LNCaP und DU-145 etabliert werden. Dieser Knockdown war sowohl auf der mRNA-Ebene durch RT-qPCR (Abbildung 3B, Seite 28) nachweisbar mit einer mittleren Herunterregulation auf 40,5% für LNCaP, auf 28,4% für DU145 und auf 13,3% für PC-3, als auch auf der Proteinebene durch Western Blot (Abbildung 3C, Seite 29). Um anschließend die funktionellen Auswirkungen des FBXO45-Knockdowns auf das Tumorverhalten zu untersuchen, untersuchten wir zunächst die Wirkung von FBXO45 auf das Zellwachstum in einem Proliferations- und Zytotoxizitätstest. Die Proliferationskapazität der Tumorzellen veränderte sich durch den Knockdown nicht (Abbildung 3D, Seite 29,  $p=0,089$  für LNCaP,  $p=0,5$  für DU145 und  $p=0,19$  für PC-3). Die Depletion von FBXO45 unterdrückte jedoch die Migrationskapazität der PCA-Zellen in den Boyden-Kammer-Tests stark (Abbildung 3E/F, Seite 29,  $p=0,03$  für LNCaP,  $p=0,01$  für DU145 und  $p=0,03$  für PC-3).

Zusammenfassend stellten wir die Hypothese auf, dass die Expression von FBXO45 in PCA-Zellkulturmodellen eine unentbehrliche Rolle für die Aufrechterhaltung onkogener Eigenschaften einnimmt und dass die spezifische Ausschaltung von FBXO45 die Fähigkeit zur metastatischen Ausbreitung verringert.

## 1.4 Diskussion

In dieser Studie wurde das Protein FBXO45 hinsichtlich seiner Rolle im PCA untersucht. Unsere Analysen zeigen, dass das spezifische Ausschalten von FBXO45 die Fähigkeit zur metastatischen Ausbreitung des PCAs verringert. Somit ist FBXO45 eine essentielle Schaltstelle in der Tumorprogression und folglich ein relevanter prognostischer Biomarker.

Bisher finden molekulare Untersuchungen in der prognostischen Abschätzung des PCA wenig Anwendung, sie könnten jedoch die derzeitigen Therapieentscheidungen, die momentan auf wenig personalisierten Parametern fußt, individualisieren und bessere Therapieentscheidungen im Hinblick auf die spezifische Patientenprognose ermöglichen.

Auf molekularer Ebene wurde beobachtet, dass in den hier durchgeführten Untersuchungen der Effekt von FBXO45 sich vor allem in der T2E-positiven Untergruppe der PCA-Kohorte zeigte. Wie Gerke *et al.* bereits in früheren Studien erklärten, könnte diese T2E-Fusion, welche in etwa bei 50% der PCA-Fälle besteht, verschiedene Gensignaturen benutzen, um ein höheres Malignitätspotential zu erreichen (Gerke *et al.*, 2020; 2015; Penney *et al.*, 2016). Daher unterstützen Gerke *et al.* die Aussage, dass eine Unterscheidung des PCA in verschiedenen molekulare Subgruppen für die prognostische Einschätzung sinnvoll ist. Unterstützt wurde diese Ansicht durch den Nachweis subtypspezifischer Biomarker (Gerke *et al.*, 2020). Unsere Analyse zeigt einen mit 54 von 161 T2E-positiven Karzinomen eine etwas geringere Positivitätsquote als bereits veröffentlicht (Gerke *et al.*, 2020), also in etwa ein Drittel anstelle etwa der Hälfte.

In dieser Studie zeigte sich, dass FBXO45 in der T2E-Subgruppe stark überexprimiert ist und hier auch mit ungünstigen prognostischen Parametern, wie einem höheren ISUP-Grad, einem höheren pT und pN-Stadium sowie mit einem verkürzten PFS, einhergeht. So stützen meine Ergebnisse die These, dass eine Unterteilung in T2E-positive und -negative Subgruppen essentiell ist, um eine exaktere Prognoseabschätzung sowie das Malignitätspotential des Karzinoms vorherzusagen. FBXO45 könnte also einen klinisch relevanten Biomarker darstellen, wenn die Unterscheidung molekularer Subtypen zukünftig eine stärkere Rolle bei der prognostischen Vorhersage des PCA einnehmen wird.

Gestützt werden diese Ergebnisse auch insbesondere durch die funktionellen *in vitro* Untersuchungen. In drei verschiedenen Zelllinien des PCA konnte ich zeigen, dass die Fähigkeit der Zellen, zu metastasieren, nach einem spezifischen FBXO45-Knockdown deutlich eingeschränkt ist. Da die Metastasierung des PCAs einen der schwerwiegenden Schritte im Progress dieser Erkrankung darstellt und mit einer stark gesteigerten Mortalität einhergeht (Siegel et al., 2020), kann FBXO45 als prognostischer Marker als eindeutig relevant eingestuft werden.

Wie genau aber lässt sich nun der onkogene Effekt von FBXO45 erklären?

Wenn man sich die grundlegende Funktion von FBXO45 anschaut, stellt FBXO45 eine Substraterkennungs-Untereinheit von E3-Ligasen dar, die an der Steuerung des Proteinabbaus über Ubiquitinierung beteiligt sind. FBXO45 wird dabei eine überwiegend anti-apoptotische Wirkung zugeordnet. Seine Zielproteine arbeiten überwiegend als Tumorsuppressoren. Beispielsweise ubiquitiniert und baut FBXO45 das Zielprotein p73, ein Mitglied der p53-Familie, ab, was zu einer Verringerung des Zelltods führt (Peschiaroli et al., 2009). Die Zellen sind also bei erhöhter FBXO45-Expression insgesamt langlebiger und entgehen der Apoptose.

Ebenso scheint FBXO45 im onkologischen Kontext eine zentrale Rolle einzunehmen: In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass FBXO45 bei Patienten mit Magenkrebs (Kogure et al., 2017) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Lunge (Wang et al., 2018) stark überexprimiert ist und mit einem verkürzten Überleben assoziiert ist. Ebenso konnte gezeigt werden, dass FBXO45 in der Biologie der Tumorgenese sowie der -progression wichtig zu sein scheint und die Signalwege der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) beeinflusst (Díaz und Herreros, 2016). Des Weiteren hat das Protein bei zahlreichen weiteren Krankheiten sowie der Entwicklung des Nervensystems eine Funktion inne (Saiga et al., 2009). Ein ähnlicher Effekt von FBXO45 auf die Tumorprogression wie im PCA konnte beim Pankreaskarzinom beobachtet werden (Wu et al., 2022). Somit scheint FBXO45 eine entitätsübergreifende Rolle bei der Genese und Progression verschiedenster Karzinome einzunehmen.

Im funktionellen Kontext ist weiteres interessantes Zielprotein von FBXO45, FBXW7, zu nennen. Hierbei handelt es sich um einen Tumorsuppressor, der selbst spezifische

Substrate zur Ubiquitinierung und zum Abbau ansteuert, darunter die bekannten Treiber-Onkogene der aggressiven PCA MYC und Mcl-118, (Qiu et al., 2022; Reiner et al., 2015). Hierbei ist bemerkenswert, dass FBXO45 - vermittelt durch FBXW7 - die Empfindlichkeit gegenüber Spindelgiften wie Taxanen, deutlich herabsetzt (Richter et al., 2020). Aus klinisch-therapeutischer Sicht ist dies beim PCA von besonderem Interesse, da die Substanzen Docetaxel und Cabazitaxel als Chemotherapeutika bei metastasiertem PCA häufig zum Einsatz kommen (EAU-Leitlinie, 2023). Somit könnte der spezifische Einsatz von FBXO45 als prognostischem Biomarker relevant sein, um eine Chemotherapie im metastasierten PCA sinnvoll einsetzen zu können und so Nutzen und Risiko einer Chemotherapie individualisierter abschätzen zu können. Hierbei wäre es wichtig, die Relevanz dieser herabgesetzten Empfindlichkeit gegenüber Taxanen in einer klinischen Studie weiterführend zu untersuchen.

Durch die Identifikation verschiedener Onkogene, welche ähnlich wie FBXO45 die zelluläre Apoptose verringern und damit das Tumorwachstum vorantreiben, und der Entwicklung gezielter therapeutischer Hemmung dieser Onkogene, wie zum Beispiel die Tyrosinkinase Her-2/neu (Hanker et al., 2021), hat sich die onkologische Therapie bei Entitäten wie dem Mammakarzinom grundlegend verändert und neue, individuellere therapeutische Optionen geschaffen. Bei genauerer Untersuchung solcher Onkogene im Prostatakarzinom könnten also auch hier neue Wege begangen und die Identifikation von high-risk-Tumoren erleichtert sowie Übertherapie bei indolenten Tumoren künftig verringert werden. Ebenso könnte FBXO45 als Prognoseparameter bei Entscheidungen zur Therapieeskalation dienen, beispielsweise zur Einleitung einer adjuvanten Hormon- oder Strahlentherapie nach radikaler Prostatektomie zur Verringerung des Rezidivrisikos.

Nicht nur spezifische GapmeR-Konstrukte, wie in dieser Studie, können für einen spezifischen Knockdown eingesetzt werden, sondern auch microRNAs können Proteine wie FBXO45 herunterregulieren und haben in diesem Kontext in der uro-onkologischen Forschung in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Für FBXO45 konnte beispielsweise kürzlich gezeigt werden, dass die tumorsuppressive microRNA-30e eine Herunterregulation von FBXO45 bewirkt (Ganapathy et al., 2022). Die Überexpression von FBXO45 in PCA könnte durch die Herunterregulierung der microRNA-30e bedingt sein. Umgekehrt könnte man schließen, dass die krebshemmende Funktion der

microRNA-30e durch die Herunterregulierung von FBXO45 vermittelt wird, was auf einen möglichen gegenseitigen Regulationsmechanismus hindeutet, welchen es noch weiterführend zu erforschen gilt.

Die Daten dieser Studie geben einen starken Hinweis auf die prognostische Rolle von FBXO45 – dennoch ist es unentbehrlich, diese Daten weiterführend anzuwenden. Um die Relevanz von FBXO45 therapeutisch nutzen zu können, bedarf es einer Validierung unserer Ergebnisse in einer prospektiven klinischen Kohorte.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen zwar eine signifikant erhöhte FBXO45-RNA-Expression im Progress zur Fernmetastasierung, allerdings wären zudem Daten von Interesse, die eine unterschiedliche Expression von FBXO45 im metastasierten kastrationssensiblen und kastrationsrefraktären PCA sehen, da die Hormonresistenz im PCA einen weiteren Eskalationsschritt in der Therapie erfordert (EAU-Leitlinie, 2023).

## **1.5 Zusammenfassung**

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse dieser Arbeit den Schluss zu, dass eine Überexpression von FBXO45 relevante onkogene Eigenschaften im Prostatakarzinom (PCA) vermittelt. Man kann davon ausgehen, dass FBXO45 ein unabhängiger prognostischer Biomarker in der Subgruppe mit TMRPSS2-ERG-Genfusion darstellt. Die funktionellen Daten deuten zudem darauf hin, dass FBXO45 an der Bildung und Verbreitung von Metastasen, welche einen kritischen Schritt in der Progression des PCAs darstellen, beteiligt ist. Unsere Daten bestätigen die onkogene Rolle von FBXO45, welche bereits in verschiedenen Studien in anderen Tumorentitäten beobachtet wurde, und geben. Darüber hinaus bestärkt unsere Arbeit die Sinnhaftigkeit einer Klassifizierung von PCA in verschiedene molekulare Subtypen. Die Implementierung der molekularen Subtypisierung in der klinischen Praxis könnte genauere prognostische Vorhersagen ermöglichen. Ebenso könnten Übertherapien und deren Konsequenzen vermieden werden. Die aktive Überwachung eines PCAs könnte zudem sensitiver werden für Progressionen, sodass frühzeitig radikale Therapieoptionen bei einem Progress im PCA beginnen könnten. Insgesamt würde der Einsatz prognostischer Biomarker im PCA den Weg für individualisierte Therapie ebnen.



## 1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Abshire CF, Carroll JL, Dragoi A-M. FLASH protects ZEB1 from degradation and supports cancer cells' epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogenesis* 2016; 5: e254

Aydın Sayılan A, Özbaş A. The Effect of Pelvic Floor Muscle Training On Incontinence Problems After Radical Prostatectomy. *AJMH* 2018; 12: 1007–1015

Burikhanov R, Rangnekar VM. Par-4 as a Therapeutic Target in Cancer and Other Diseases. In: Rangnekar VM, Hrsg. *Tumor Suppressor Par-4*. Cham: Springer International Publishing; Imprint Springer, 2021: 313–320

Cenciarelli C, Chiaur DS, Guardavaccaro D, Parks W, Vidal M, Pagano M. Identification of a family of human F-box proteins. *Curr. Biol.* : CB 1999; 9: 1177–1179

Chandran UR, Ma C, Dhir R, Bisceglia M, Lyons-Weiler M, Liang W, Michalopoulos G, Becich M, Monzon FA. Gene expression profiles of prostate cancer reveal involvement of multiple molecular pathways in the metastatic process. *BMC cancer* 2007; 7: 64

Chen X, Sahasrabuddhe AA, Szankasi P, Chung F, Basrur V, Rangnekar VM, Pagano M, Lim MS, Elenitoba-Johnson KSJ. Fbxo45-mediated degradation of the tumor-suppressor Par-4 regulates cancer cell survival. *Cell Death Differ.* 2014; 21: 1535–1545

Condic M, Egger EK, Klümper N, Kristiansen G, Mustea A, Thiesler T, Ralser DJ. TROP-2 is widely expressed in vulvar squamous cell carcinoma and represents a potential new therapeutic target. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2023 ;149(11): 8235–8241

D'Amico AV, Chen M-H, Renshaw AA, Loffredo M, Kantoff PW. Androgen suppression and radiation vs radiation alone for prostate cancer: a randomized trial. *JAMA* 2008; 299: 289–295

Díaz VM, Herreros AG de. F-box proteins: Keeping the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in check. *Semin. cancer biol.* 2016; 36: 71–79

Flach RN, Egevad L, Eklund M, van der Kwast TH, Delahunt B, Samaratunga H, Suelmann BBM, Willemse P-PM, Meijer RP, van Diest PJ. Use of the ISUP e-learning module improves interrater reliability in prostate cancer grading. *J. clin Pathol.* 2023 77(1):22-26

Ganapathy K, Ngo C, Andl T, Coppola D, Park J, Chakrabarti R. Anticancer function of microRNA-30e is mediated by negative regulation of HELLPAR, a noncoding macroRNA, and genes involved in ubiquitination and cell cycle progression in prostate cancer. *Mol. Onc.* 2022; 16: 2936–2958

Gerke JS, Orth MF, Tolkach Y, Romero-Pérez L, Wehweck FS, Stein S, Musa J, Knott MML, Hölting TLB, Li J, Sannino G, Marchetto A, Ohmura S, Cidre-Aranaz F, Müller-Nurasyid M, Strauch K, Stief C, Kristiansen G, Kirchner T, Buchner A, Grünewald TGP. Integrative clinical transcriptome analysis reveals TMPRSS2-ERG dependency of prognostic biomarkers in prostate adenocarcinoma. *Int. J. Cancer* 2020; 146: 2036–2046

Hamdy FC, Donovan JL, Lane JA, Metcalfe C, Davis M, Turner EL, Martin RM, Young GJ, Walsh EI, Bryant RJ, Bollina P, Doble A, Doherty A, Gillatt D, Gnanapragasam V, Hughes O, Kockelbergh R, Kynaston H, Paul A, Paez E, Powell P, Rosario DJ, Rowe E, Mason M, Catto JWF, Peters TJ, Oxley J, Williams NJ, Staffurth J, Neal DE. Fifteen-Year Outcomes after Monitoring, Surgery, or Radiotherapy for Prostate Cancer. *NEJM* 2023; 388: 1547–1558

Hanker AB, Brown BP, Meiler J, Marín A, Jayanthan HS, Ye D, Lin C-C, Akamatsu H, Lee K, Chatterjee S, Sudhan DR, Servetto A, Brewer MR, Koch JP, Sheehan JH, He J, Lalani AS, Arteaga CL. Co-occurring gain-of-function mutations in HER2 and HER3 modulate HER2/HER3 activation, oncogenesis, and HER2 inhibitor sensitivity. *Cancer cell* 2021; 39: 1099-1114.e8

He Z, Tang F, Lu Z, Huang Y, Lei H, Li Z, Zeng G. Analysis of differentially expressed genes, clinical value and biological pathways in prostate cancer. *Am. J. Transl. Res.* 2018; 10: 1444–1456

Hsieh M-C, Ho Y-C, Lai C-Y, Chou D, Chen G-D, Lin T-B, Peng H-Y. Spinal TNF- $\alpha$  impedes Fbxo45-dependent Munc13-1 ubiquitination to mediate neuropathic allodynia in rats. *Cell Death Dis.* 2018; 9: 811

Jin J, Cardozo T, Lovering RC, Elledge SJ, Pagano M, Harper JW. Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. *Genes Dev.* 2004; 18: 2573–2580

Kilpeläinen TP, Tammela TLJ, Roobol M, Hugosson J, Ciatto S, Nelen V, Moss S, Määttä L, Auvinen A. False-positive screening results in the European randomized study of screening for prostate cancer. *Eur. J. Cancer (Oxford, England : 1990)* 2011; 47: 2698–2705

Klümper N, Danwitz M von, Stein J, Schmidt D, Schmidt A, Kristiansen G, Muders M, Hölzel M, Ritter M, Alajati A, Ellinger J. Downstream Neighbor of SON (DONSON) Expression Is Enhanced in Phenotypically Aggressive Prostate Cancers. *Cancers* 2020; 12

Kogure N, Yokobori T, Ogata K, Altan B, Mochiki E, Ohno T, Toyomasu Y, Yanai M, Kimura A, Yanoma T, Suzuki M, Bai T, Asao T, Kuwano H. Low Expression of FBXO45 Is Associated with Gastric Cancer Progression and Poor Prognosis. *Anticancer Res.* 2017; 37: 191–196

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Prostatakarzinom, Langversion 6.2, 2021, AWMF Registernummer: 043/022OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/prostatakarzinom/> (abgerufen am: 09.02.2024)

Liao EH, Hung W, Abrams B, Zhen M. An SCF-like ubiquitin ligase complex that controls presynaptic differentiation. *Nature* 2004; 430: 345–350

Lin M, Wang Z-W, Zhu X. FBXO45 is a potential therapeutic target for cancer therapy. *Cell Death Discov.* 2020; 6: 55

Penney KL, Pettersson A, Shui IM, Graff RE, Kraft P, Lis RT, Sesso HD, Loda M, Mucci LA. Association of Prostate Cancer Risk Variants with TMPRSS2:ERG Status: Evidence for Distinct Molecular Subtypes. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the AACR cosponsored by the ASPO* 2016; 25: 745–749

Peschiarioli A, Scialpi F, Bernassola F, Pagano M, Melino G. The F-box protein FBXO45 promotes the proteasome-dependent degradation of p73. *Oncogene* 2009; 28: 3157–3166

Qiu X, Boufaied N, Hallal T, Feit A, Polo A de, Luoma AM, Alahmadi W, Larocque J, Zadra G, Xie Y, Gu S, Tang Q, Zhang Y, Syamala S, Seo J-H, Bell C, O'Connor E, Liu Y, Schaeffer EM, Jeffrey Karnes R, Weinmann S, Davicioni E, Morrissey C, Cejas P, Ellis L, Loda M, Wucherpfennig KW, Pomerantz MM, Spratt DE, Corey E, Freedman ML, Shirley Liu X, Brown M, Long HW, Labbé DP. MYC drives aggressive prostate cancer by disrupting transcriptional pause release at androgen receptor targets. *Nat. comm.* 2022; 13: 2559

Reiner T, Las Pozas A de, Parrondo R, Palenzuela D, Cayuso W, Rai P, Perez-Stable C. Mcl-1 protects prostate cancer cells from cell death mediated by chemotherapy-induced DNA damage. *Oncoscience* 2015; 2: 703–715

Richter KT, Kschonsak YT, Vodicska B, Hoffmann I. FBXO45-MYCBP2 regulates mitotic cell fate by targeting FBXW7 for degradation. *Cell Death Differ.* 2020; 27: 758–772

Saiga T, Fukuda T, Matsumoto M, Tada H, Okano HJ, Okano H, Nakayama KI. Fbxo45 forms a novel ubiquitin ligase complex and is required for neuronal development. *Mol. Cell. Biol.* 2009; 29: 3529–3543

Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TLJ, Zappa M, Nelen V, Kwiatkowski M, Lujan M, Määttä L, Lilja H, Denis LJ, Recker F, Paez A, Bangma CH, Carlsson S, Puliti D, Villers A, Rebillard X, Hakama M, Stenman U-H, Kujala P, Taari K, Aus G, Huber A, van der Kwast TH, van Schaik RHN, Koning HJ de, Moss SM, Auvinen A. Screening and prostate cancer mortality: results of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 years of follow-up. *Lancet* 2014; 384: 2027–2035

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA: a cancer journal for clinicians* 2020; 70: 7–30

Skowyra D, Craig KL, Tyers M, Elledge SJ, Harper JW. F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* 1997; 91: 209–219

Smith MR, Hussain M, Saad F, Fizazi K, Sternberg CN, Crawford ED, Kopyltsov E, Park CH, Alekseev B, Montesa-Pino Á, Ye D, Parnis F, Cruz F, Tammela TLJ, Suzuki H, Utriainen T, Fu C, Uemura M, Méndez-Vidal MJ, Maughan BL, Joensuu H, Thiele S, Li R, Kuss I, Tombal B. Darolutamide and Survival in Metastatic, Hormone-Sensitive Prostate Cancer. *NEJM* 2022; 386: 1132–1142

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians* 2021; 71: 209–249

The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell* 2015; 163: 1011–1025

Wang K, Qu X, Liu S, Yang X, Bie F, Wang Y, Huang C, Du J. Identification of aberrantly expressed F-box proteins in squamous-cell lung carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2018; 144: 1509–1521

Wang Z, Wei W. Fbxo45 joins the 'Par-4' ty in controlling apoptosis of cancer cells. *Cell Death Differ* 2014; 21: 1508–1510

Wu L, Yu K, Chen K, Zhu X, Yang Z, Wang Q, Gao J, Wang Y, Cao T, Xu H, Pan X, Wang L, Xia J, Li Y, Wang ZP, Ma J. Fbxo45 facilitates pancreatic carcinoma progression by targeting USP49 for ubiquitination and degradation. *Cell Death Dis* 2022; 13: 231

## 2. Veröffentlichung



Article

# Identification of F-Box/SPRY Domain-Containing Protein 1 (FBXO45) as a Prognostic Biomarker for TMPRSS2–ERG-Positive Primary Prostate Cancers

Marthe von Danwitz <sup>1,2</sup> , Niklas Klümper <sup>1,2,3</sup> , Marit Bernhardt <sup>2,4</sup>, Alexander Cox <sup>1,2</sup> , Philipp Krausewitz <sup>1,2</sup> , Abdullah Alajati <sup>1,2</sup>, Glen Kristiansen <sup>2,4</sup> , Manuel Ritter <sup>1,2</sup>, Jörg Ellinger <sup>1,2,\*,†</sup> and Johannes Stein <sup>1,2,\*,†</sup>

<sup>1</sup> Department of Urology, University Hospital Bonn, University of Bonn, 53127 Bonn, Germany

<sup>2</sup> Center for Integrated Oncology, University Hospital Bonn, University of Bonn, 53127 Bonn, Germany

<sup>3</sup> Institute of Experimental Oncology, University Hospital Bonn, University of Bonn, 53127 Bonn, Germany

<sup>4</sup> Institute of Pathology, University Hospital Bonn, University of Bonn, 53127 Bonn, Germany

\* Correspondence: joerg.ellinger@ukbonn.de (J.E.); johannes.stein@ukbonn.de (J.S.);

Tel.: +49-228-287-14184 (J.E. & J.S.)

† These authors contributed equally to this work.

**Simple Summary:** FBXO45 plays a role in the regulation of apoptosis through the ubiquitylation and degradation of specific target proteins. While FBXO45 has been suggested to have prognostic potential in various cancers, its specific role in prostate carcinoma (PCA) remains unclear. Transcriptome data concerning FBXO45 were analysed using The Cancer Genome Atlas (TCGA) and a publicly available Gene Expression Omnibus (GEO) progression PCA cohort. In addition, FBXO45 protein expression was evaluated using immunohistochemistry in a large cohort of PCA tissue microarrays. It was demonstrated that high FBXO45 expression was associated with advanced stages of PCA and biochemical recurrence. Shortened progression-free survival was associated with strong FBXO45 staining, especially in TMPRSS2–ERG-positive PCA. In vitro experiments demonstrated that FBXO45 knockdown led to a significant reduction in migration capacity in the PC-3, DU-145 and LNCaP cell lines. These findings suggest that FBXO45 may serve as a promising biomarker for PCA and exhibit oncogenic properties.



**Citation:** von Danwitz, M.; Klümper, N.; Bernhardt, M.; Cox, A.; Krausewitz, P.; Alajati, A.; Kristiansen, G.; Ritter, M.; Ellinger, J.; Stein, J. Identification of F-Box/SPRY Domain-Containing Protein 1 (FBXO45) as a Prognostic Biomarker for TMPRSS2–ERG-Positive Primary Prostate Cancers. *Cancers* **2023**, *15*, 1890. <https://doi.org/10.3390/cancers15061890>

Academic Editor: Sanjay Gupta

Received: 5 February 2023

Revised: 23 February 2023

Accepted: 20 March 2023

Published: 21 March 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Background: F-box/SPRY domain-containing protein 1 (FBXO45) plays a crucial role in the regulation of apoptosis via the ubiquitylation and degradation of specific targets. Recent studies indicate the prognostic potential of FBXO45 in several cancers. However, its specific role in prostate carcinoma remains unclear. Methods: A systematic analysis of FBXO45 mRNA expression in PCA was performed using The Cancer Genome Atlas database and a publicly available Gene Expression Omnibus progression PCA cohort. Subsequently, FBXO45 protein expression was assessed via immunohistochemical analysis of a comprehensive tissue microarray cohort. The expression data were correlated with the clinicopathological parameters and biochemical-free survival. The immunohistochemical analyses were stratified according to the TMPRSS2–ERG rearrangement status. To assess the impact of FBXO45 knockdown on the tumour proliferation capacity of cells and metastatic potential, transfection with antisense-oligonucleotides was conducted within a cell culture model. Results: FBXO45 mRNA expression was associated with adverse clinicopathological parameters in the TCGA cohort and was enhanced throughout progression to distant metastasis. FBXO45 was associated with shortened biochemical-free survival, which was pronounced for the TMPRSS2–ERG-positive tumours. In vitro, FBXO45 knockdown led to a significant reduction in migration capacity in the PC3, DU145 and LNCaP cell cultures. Conclusions: Comprehensive expression analysis and functional data suggest FBXO45 as a prognostic biomarker in PCA.

**Keywords:** prostate cancer; FBXO45; prognostic biomarker; apoptosis

## 1. Introduction

Prostate cancer (PCA) is a common cancer in men and a major cause of cancer-related deaths globally [1]. While primary PCA can be potentially cured, the high rate of overtreatment highlights the limitations of current diagnostic tools, such as prostate-specific antigen (PSA) and grading according to the International Society of Urological Pathology (ISUP), in accurately discriminating between indolent and aggressive cases [2]. Despite significant advancements in medical therapy, mortality remains high and treatment options are limited for advanced stages of the disease [3,4]. A deeper understanding of PCA tumour biology and the identification of molecular biomarkers may improve risk assessment and treatment planning.

The current state of research supports the notion that PCAs have distinct molecular genetic signatures that require consideration in the process of identification of new biomarkers [5,6]. Thus, approximately half of all PCAs are characterised by chromosomal rearrangements leading to a chimeric oncogene through fusion of the promoter region of the androgen-induced transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2) gene with the ETS-related gene (ERG) (TMPRSS2-ERG (T2E)). TMPRSS2-ERG fusion is recognised as a driver event for the progression to prostate cancer. Prior studies proved that T2E-positive and T2E-negative PCAs represent molecularly different PCA subtypes, and potential biomarkers should also be considered subtype specifically [6].

The Cancer Genome Atlas (TCGA) database allows us to identify potential biomarker candidates through an investigative approach. In a systematic analysis, we identified FBXO45 as an interesting prognostic gene and selected it for further comprehensive analysis. FBXO45 is a member of the F-box proteins, which function as the substrate-specific adaptor subunit in ubiquitin ligase complexes that promote proteasomal degradation of critical cellular regulators [7–10]. It has already been reported that FBXO45 targets regulate cell apoptosis, neural development and carcinogenesis [11–15]. FBXO45 is a prognostic parameter in numerous cancers, such as squamous-cell lung carcinoma and gastric cancer [16–18].

However, the role of FBXO45 in PCA remains enigmatic. The present study aimed to investigate its potential role as a prognostic tissue-based biomarker for PCA.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Transcriptome Data Assembly

The log<sub>2</sub>-transformed RNA sequencing data generated by IlluminaHiSeq and publicly available through the TCGA Research Network were downloaded via the UCSC Xena browser (<http://xena.ucsc.edu> accessed on 4 February 2023). The cohort comprised 497 primary PCA and 52 normal adjacent tissue (NAT) cases. The log-transformed, pre-normalised array signal intensities of the microarray data from a PCA progression cohort were downloaded via Gene Expression Omnibus (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> accessed on 4 February 2023, GSE6919) [19]. The expression data of 25 androgen-deprivation-resistant metastatic samples derived from 4 patients were obtained from different metastatic sites and were thereby considered as individual samples (primary PCA (pPCA):  $n = 66$ , metastasis:  $n = 25$ ).

### 2.2. Immunohistochemistry

In order to identify tissue-specific biomarkers that can facilitate more accurate prognostic predictions in the early stages following diagnosis, we chose to analyse radical prostatectomy specimens with comprehensive follow-up data, including biochemistry-free survival. Therefore, we immunohistochemically analysed the FBXO45 expression of a well-characterised primary PCA tissue microarray (TMA) cohort. The TMAs were constructed as described previously [20–22]. In brief, one to four tissue cores (1.2 mm diameter) of paraffin-embedded prostate tissue represented one case. Tumour samples with a lack of tissue or absence of carcinoma were excluded. In total, the tissue of 161 patients who underwent radical prostatectomy at the University Hospital of Bonn between 1998 and



2008 was available for analysis. The TMAs were freshly cut (3 µm) and mounted on Super Frost Plus Slides. Staining was performed using the polyclonal FBXO45-antibody (bs-13150R, dilution 1:300) on the Ventana Benchmark automated staining system following the manufacturer's protocol (Ventana Medical System, Tucson, AZ, USA). The detection of the signal was performed using the ultraView Universal DAB detection kit. The slides were finally counterstained with haematoxylin and Bluing Reagent, dehydrated, mounted, and digitalised. The staining quality and specificity were confirmed by experienced uropathologists. Two observers independently rated the intensity of the FBXO45 staining as negative, weak, moderate, or strong (scores from 0 to 3). In the case of divergent rates, consensus was achieved by discussion. Each TMA core was assessed individually. If multiple TMA cores were available for one case, the mean value was calculated and considered for the further analyses. To investigate the prognostic role of FBXO45 expression, depending on the TMPRSS2-ERG status, a survival analysis regarding progression-free survival was performed based on both the total cohort and after stratification by TMPRSS2-ERG status (T2E-positive,  $n = 54$  vs. T2E-negative,  $n = 107$ ) as described by Gerke et al. [6]. Progression-free survival was defined as PSA-relapse-free (PSA  $\geq 0.2$  ng/mL) survival following radical prostatectomy.

### 2.3. Cell Lines and Culture Conditions

The human PCA cell lines (LNCaP, DU-145, PC-3, C4-2B) were obtained from the Leibniz Institute DSMZ—German Collection of Microorganisms and Cell Culture (Braunschweig, Germany). All the cell lines were cultured in RPMI1640 medium (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS Superior, Biochrom GmbH, Berlin, Germany), 0.4% penicillin/streptomycin and 1% glutamine (Thermo Fisher Scientific, Inc., Darmstadt, Germany) in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air at 37 °C. The experiments were performed with mycoplasma-free and previously authenticated cell lines.

### 2.4. Antisense LNA GapmeR-Mediated Knockdown

We designed the specific FBXO45 GapmeR construct using the online available Antisense Gapmer Designer from Exiqon for the transient FBXO45 knockdown in vitro (Vedbaek, Denmark). The specific sequence of the construct was (5'-A\*G\*C\*G\*C\*G\*C\*A\*G\*A\*A\*G\*A\*G\*A\*T-3'). Furthermore, the following non-targeting negative control GapmeR sequence Negative Control A was used: (Neg Ctrl-A:) (5'-\*C\*G\*T\*A\*\*G\*T\*C\*G\*A\*G\*C\*A\*A\*G\*T\*A-3'). The transfections in the cell lines were performed in a final concentration of 150 nM at a ratio of 1:3 with the FuGENE HD-Transfection Reagent (#E2311, Promega Corporation, Madison, WI, USA) as defined in the manufacturer's instructions.

### 2.5. RNA Isolation

Isolation of the RNA of the cell pellets was conducted using a Total RNA Purification Mini Spin Column Kit (Genaxxon bioscience GmbH, Ulm, DE, USA). After RNA isolation, the RNA quantity and quality were measured using a NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

### 2.6. Real-Time PCR

The mRNA expression of the corresponding cell lines was quantified 48 h post-transfection using RT-qPCR to analyse the knockdown efficiency. The following primer sequences were used: FBXO45 forward primer: 5'-GGCTGGAATCTGGTGGACAA-3' and reverse primer: 5'-TCTCCTATCTGATATTTGGTGCCT-3';  $\beta$ -actin forward primer: 5'-CCAACCGCGAGAAGATGA-3' and reverse primer: 5'-CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3'. CDH1 forward primer: 5'-AAGGGGTCTGTTCATGGAAGG-3' and reverse primer: 5'-GGTGTTCACATCATCGTCCG-3'; CDH2 forward primer: 5'-CCATCATGCCATCCTGCTC-3' and reverse primer: 5'-GTTTGGCCTGGCGTCTTTA-3'; SNAI1 forward primer: 5'-GCTGCAGGACTCTAATCCAGA-3' and reverse primer: 5'-ATCTCCGAGGTGGGATG-

3'; SNAI2 forward primer: 5'-TGGTTGCTTCAAGGACACAT-3' and reverse primer: 5'-GTTGCAGTGAGGGCAAGAA-3'; ZEB1 forward primer: 5'-CAGGGAGGAGCAGTGAAAGA-3' and reverse primer: 5'-ACATCCTGCTTCATCTGCCT-3'; and VIM forward primer: 5'-GAGAGGAAGCCGAAAACACC-3' and reverse primer: 5'-TTGCGTTCAAGGTCAAGACG-3'.

The different levels of mRNA expression were standardised to  $\beta$ -actin and quantified using the  $\Delta\Delta$  CT method.

### 2.7. Western Blot

Western blots were used to validate the FBXO45 knockdown efficiency at the translational level in the transfected PCA cell lines: After 72 h of transfection, cells were collected and homogenised in 100–200  $\mu$ L RIPA cell lysis buffer (300 mM NaCl 5 M, 20 mM Tris 500 mM pH 7.5, 2% Nonidet<sup>®</sup> P40 BioChemica, Espoo, Finland, A1694 AppliChem Panreac, Darmstadt, Germany, 0.5% sodium deoxycholate D6750 Sigma-Aldrich, 0.2% SDS (*sodium dodecyl sulphate*) 10% L3771 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, 70% H<sub>2</sub>O, Ampuwa), including a protease inhibitor cocktail (Complete Mini EDTA-free, Roche, Basel, Switzerland, 10 mM NaF (*sodium fluoride*) 200 mM S7920 Sigma-Aldrich). The protein concentration was determined with a BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA).

The primary antibody against FBXO45 was used for incubation at a dilution of 1:500 (LS-C169575, Rabbit, LSBio, Seattle, WA, USA). As an internal loading control antibody, anti-alpha-tubulin was used at a dilution of 1:4000 (#A5316, mouse, Sigma-Aldrich). We performed the signal detection with horseradish peroxidase-associated antibodies (antirabbit POD, #7074, Cell Signaling, and anti-mouse-POD, #170-6516, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). To visualise the chemiluminescence signal, we used a SuperSignal WestFemto Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and an LAS 3000 Image Reader (Fujifilm, Tokyo, Japan) for documentation. Densitometry was performed using the software ImageJ as described previously by Stael et al. [23].

### 2.8. Cell Proliferation Assays

An EZ4U cell proliferation assay kit was used according to the manufacturer's protocol (EZ4U; Biomedica Group, Vienna, Austria). A total of 2000 PC3 and DU-145 cells/well or 3000 LNCaP cells/well were seeded in 96-well plates in 100  $\mu$ L medium and incubated overnight. The GapmeR transfections were then conducted with the adhered cells. We measured the 96-well plates 48 h and 72 h post-transfection by quantifying the colour absorbance spectrometrically in a microplate reader (Tecan Spectra Thermo, SLT Labinstrumente Deutschland GmbH) at a 450 nm wavelength, with a 620 nm reference. We conducted the experiments in triplicates.

### 2.9. Migration Assays

After a 48 h period following transfection, we harvested the cells and seeded them into migration Boyden chambers. A total of  $5 \times 10^4$  cells of PC-3 and  $1.5 \times 10^5$  cells of DU-145 and LNCaP were plated in the upper chamber of the migration inserts (VWR, Darmstadt, Germany) containing RPMI medium without FCS. For the chemotactic attraction, we filled a medium containing 10% FCS in the lower chamber. The cells were fixed after 48 h with 4% formaldehyde (PanReac AppliChem, Darmstadt, Germany), washed and permeabilised with TBST (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5), and then coloured with haematoxylin (Vector Hematoxylin Counterstain H-3404, Vector Laboratories) and washed with water three times. We scanned the membranes and the cell number was determined automatically via nucleus detection using the QuPath software. Each experiment was conducted three times.

### 2.10. Statistical Analysis

Microsoft Excel, SPSS, and GraphPad Prism were used for the statistical analyses and visualisation of the data. The non-parametric Mann–Whitney U test was used for the group comparisons. The non-parametric Kruskal–Wallis test was applied to test three or

more groups. Survival analyses were performed using the Kaplan–Meier estimate curves and log-rank tests. Thus, multivariate Cox regression analyses were performed after the co-adjustment of the TNM stage, ISUP groups and age to provide an independent and additive prognostic value for the patients' progression-free survival.

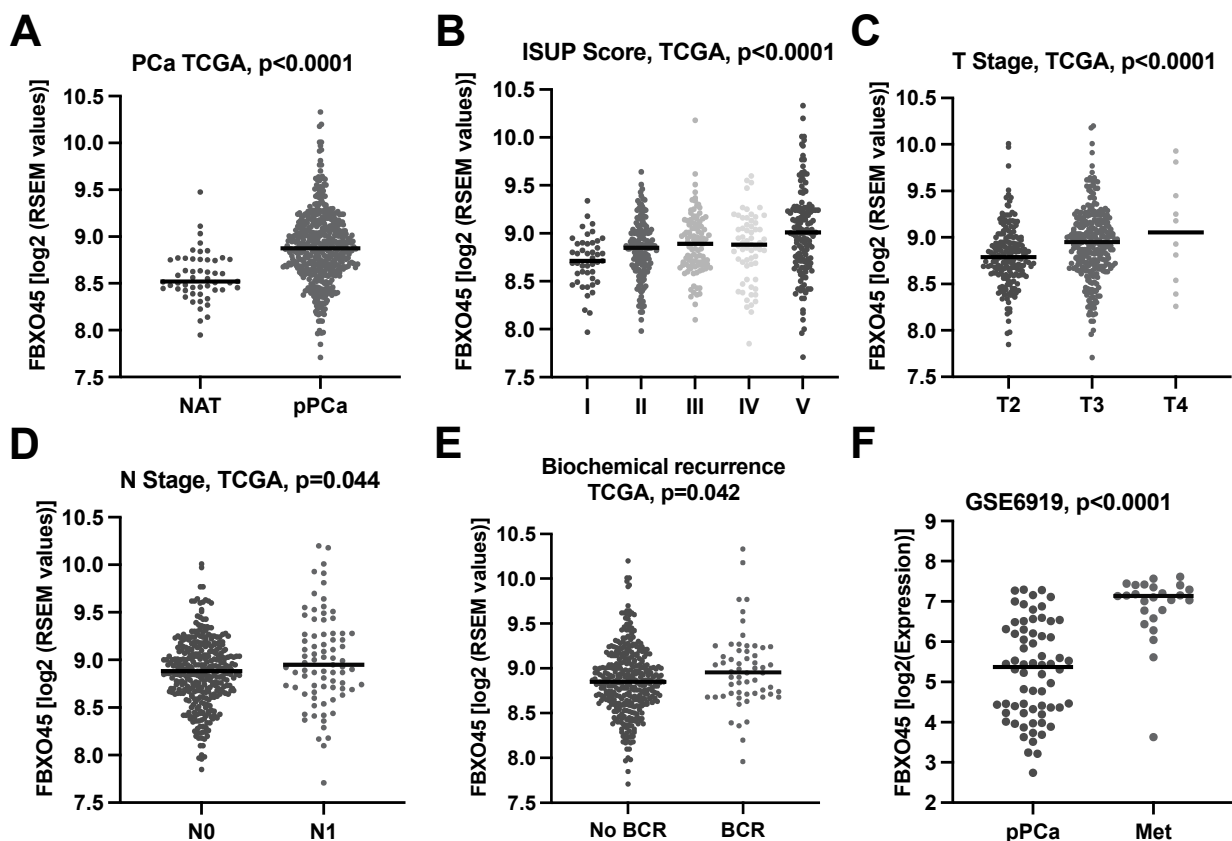
### 2.11. Ethical Approval and Consent to Participate

All the patients gave written informed consent for the collection of biomaterials. The study was approved by the ethics committee of the University Hospital Bonn (number: 013/20).

## 3. Results

### 3.1. F-Box/SPRY Domain-Containing Protein 1 (FBXO45) In Silico Expression Analysis

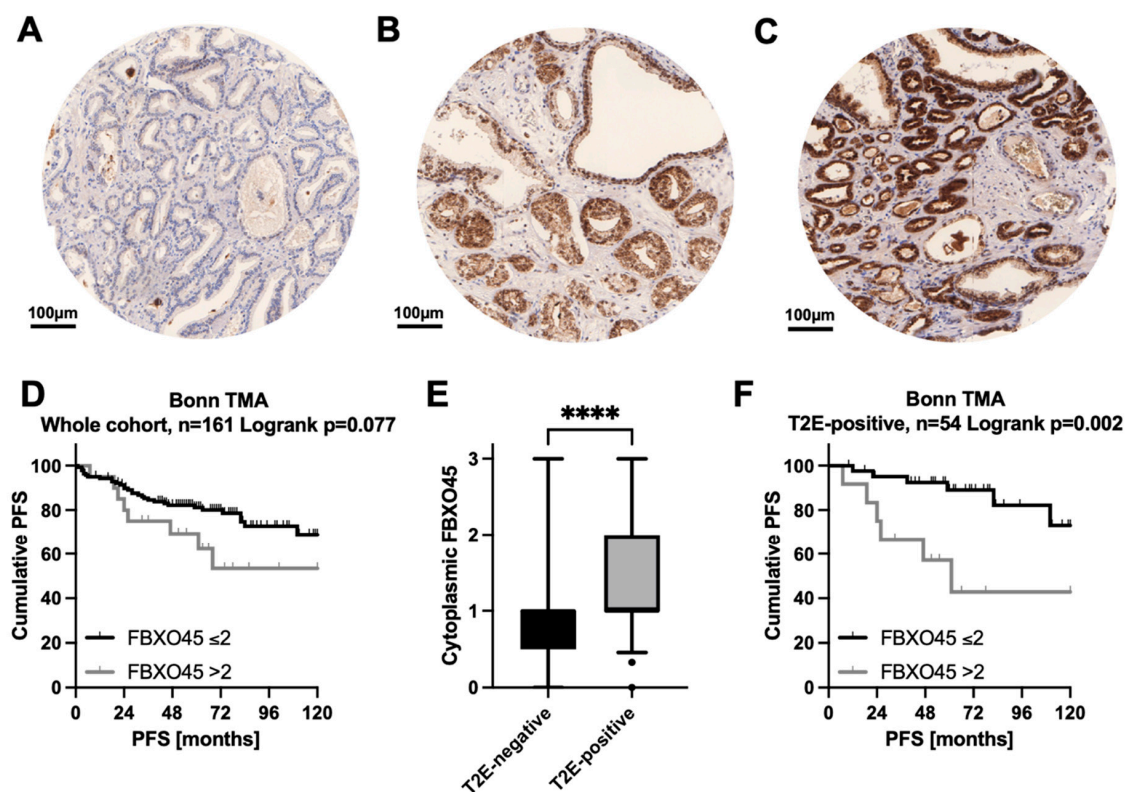
To investigate the impact of FBXO45 in PCA, we correlated the FBXO45 expression with the clinicopathological parameters and the clinical course of the patients using the PCA TCGA dataset ( $n = 497$ ). The analysis revealed significantly higher FBXO45 expression in pPCA compared to NAT ( $p < 0.0001$ , Figure 1A). In addition, the analysis showed the significant association of the FBXO45 expression with the adverse clinicopathological parameters ISUP grading groups ( $p < 0.0001$ , Figure 1B), pT stage ( $p < 0.0001$ , Figure 1C), and pN stage ( $p = 0.044$ , Figure 1D). Furthermore, high FBXO45 expression was associated with biochemical recurrence ( $p = 0.042$ , Figure 1E). To further elucidate whether the FBXO45 expression varies in primary tumours and metastasis, we analysed the PCA progression cohort GSE6919. This analysis revealed significantly increased FBXO45 RNA expression throughout the progression to distant metastasis (Met) ( $p < 0.0001$ , Figure 1F).



**Figure 1.** FBXO45 expression is enhanced in aggressive primary prostate cancers (pPCA) and distant metastasis (Met). (A–E) are based on the PCA TCGA dataset: (A) Distribution of FBXO45 RNA expression in normal adjacent prostatic tissue (NAT) in comparison to primary prostate cancer (pPCA). (B) The scatter plots depict FBXO45 RNA expression across ISUP subgroups (B), by T Stage (C), by N Stage (D) and by biochemical recurrence status (BCR) in (E). (F) Illustration of FBXO45 RNA expression in pPCA compared to distant metastasis (Met) in the PCA progression cohort GSE6919.

### 3.2. FBXO45 Protein Expression on a PCA Tissue Microarray (TMA)

To further ascertain the prognostic impact of FBXO45 at the protein level, we immunohistochemically stained and evaluated a large PCA-TMA cohort ( $n = 161$ ). The immunohistochemical analysis revealed the predominantly cytoplasmic staining of the carcinoma cells. A total of 12.1% of the cases were FBXO45-negative (no staining, intensity 0), 57.8% were weakly stained ( $0 < \text{mean staining intensity} \leq 1$ ), 18.5% were moderately stained ( $1 < \text{mean staining intensity} \leq 2$ ) and 11.6% were strongly stained (mean staining intensity  $> 2$ , see Figure 2A–C for representative staining examples). The Kaplan–Meier analysis showed a modest trend ( $p = 0.077$ ) regarding the association of strong FBXO45 staining (mean staining intensity  $> 2$ ) and shortened PSA-free survival after prostatectomy. In an exploratory analysis of the Bonn TMA cohort, we found that the cytoplasmic FBXO45 protein expression was significantly higher in the TMPRSS2–ERG (T2E)-positive subgroup (Figure 2E). Kaplan Meier analysis of the overall cohort showed an association of strong FBXO45 staining with a shortened PFS in terms of modest trend (log-rank  $p = 0.077$ , Figure 2D). Of note, strong cytoplasmic FBXO45 protein expression was significantly associated with shortened PFS in the T2E-positive subgroup (Figure 2F), but not in the T2E-negative subgroup (log-rank  $p$ -value for T2E-negative = 0.893). Within the T2E-positive subgroup, the multivariate Cox regression analysis confirmed strong cytoplasmic FBXO45 (mean staining intensity  $> 2$ ) as an independent prognostic parameter (hazard ratio 4.483,  $p = 0.022$ ) when co-adjusted for the pT stage, pN stage, ISUP groups and age (Table 1).



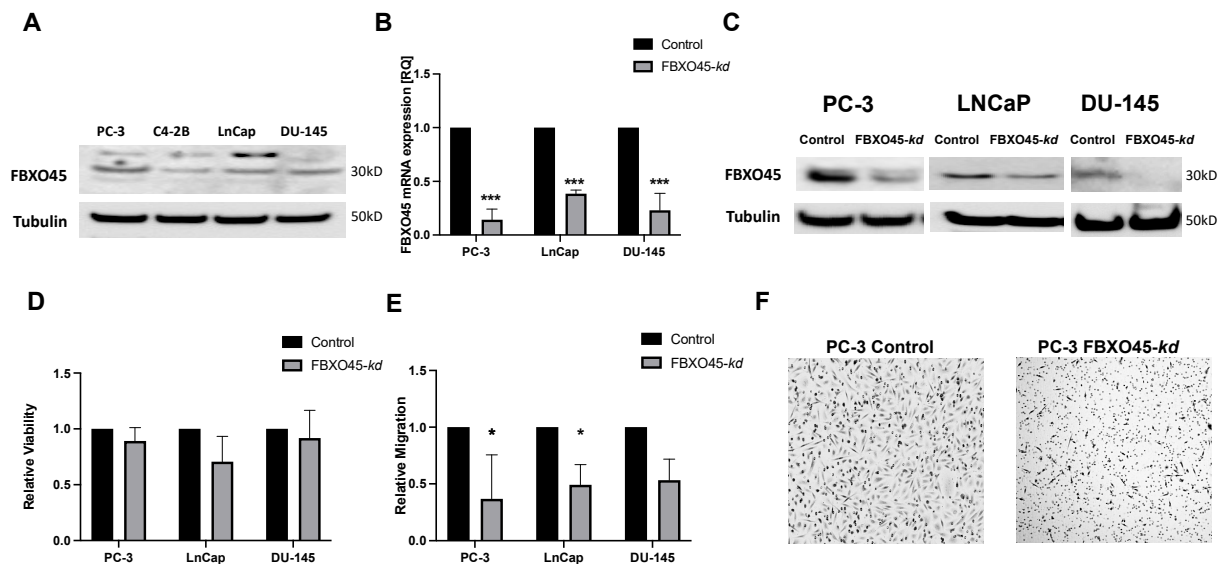
**Figure 2.** Increased cytoplasmic FBXO45 expression is associated with unfavourable progression-free survival (PFS) in the TMPRSS2–ERG (T2E)-positive primary prostate cancer (pPCA) subgroup. (A–C) Representative immunohistochemical staining for FBXO45 on primary prostate cancers (pPCA) at  $10\times$  magnification, scale bars =  $100\ \mu\text{m}$ . (A) Absence of FBXO45 expression in pPCA. Moderate (B) and strong (C) cytoplasmic FBXO45 expression in pPCA. (D) Kaplan–Meier curve using the FBXO45 cut-off 2 (negative to moderate versus strong cytoplasmic FBXO45 protein expression) with regard to PFS. (E) Boxplot depicting cytoplasmic FBXO45 expression for the TMPRSS2–ERG (T2E)-negative ( $n = 107$ ) versus -positive ( $n = 54$ ) subgroup. (F) Strong cytoplasmic FBXO45 expression is associated with unfavourable PFS in the T2E-positive subgroup. \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ .

**Table 1.** Multivariate Cox regression analyses of the T2E-positive subgroup (TMA cohort) regarding progression-free survival (PFS).

Paramter	<i>p</i> -Value	Hazard Ratio	95% Confidence Interval	
			Low	High
FBXO45	0.022	4.483	1.246	16.136
pT	0.372	1.943	0.452	8.357
pN	0.471	0.404	0.034	4.751
ISUP	0.636	0.972	0.866	1.092
Age	0.636	0.972	0.866	1.092

### 3.3. Functional Characterization of FBXO45 In Vitro

To further elucidate the functional role of FBXO45 in vitro, we aimed to induce transient FBXO45 knockdown (FBXO45-kd) using the established antisense locked nuclear acid (LNA)/GapmeR-mediated system on several established PCA cell culture models. First, we screened the cell lines PC-3, C4-2B, LNCaP and DU-145 for their FBXO45 protein expression under standard conditions. Since PC-3, LNCaP and DU-145 showed the strongest protein expression of FBXO45, we chose them for the subsequent functional analyses (Figure 3A). We were able to establish efficient FBXO45-kd for PC-3, LNCaP and DU-145, which was confirmed at both the mRNA level and the protein level, detected by RT-qPCR (Figure 3B), and confirmed by Western blot (Figure 3C). The densitometry data and uncropped Western blots are available in the Supplementary Materials. To subsequently investigate the functional impact of FBXO45 knockdown on tumour behaviour, we first examined the effect of FBXO45 on cell growth in a proliferation and cytotoxicity assay. The proliferation capacity of the tumour cells was not changed (Figure 3D). However, FBXO45 depletion strongly decreased the migration capacity of the PCA cells according to the Boyden chamber assays (Figure 3E or Figure 3F). In summary, we hypothesise that FBXO45 expression in PCA cell culture models is essential for maintaining oncogenic traits and specific FBXO45 knockdown reduces the ability for metastatic spread.



**Figure 3.** Functional impact of FBXO45 loss in prostate cancer cell culture models. (A) Baseline FBXO45 protein expression in different prostate cancer cell lines. (B) FBXO45 mRNA (B) and protein (C) expression following Antisense LNA GapmeR-mediated FBXO45-knockdown (FBXO45-kd). (D) Impact of FBXO45-kd on relative viability in our prostate cancer cell lines compared to the control. (E) FBXO45-kd impairs migration capacity according to the Boyden chamber assay; representative images of the Boyden chamber membrane depicted for PC-3 (F). Experiments were performed in triplicates. \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

#### 4. Discussion

In this study, we investigated the prognostic role of FBXO45 in PCA and its functional role in metastatic disease progression. Several lines of evidence support the notion that the gene has oncogenic properties in PCA and could, therefore, be a promising candidate for a new biomarker.

First, we demonstrated that FBXO45 is overexpressed and is associated with adverse clinicopathological parameters and shortened progression-free survival based on an analysis of a large mRNA cohort. Second, the investigation of a PCA progression cohort revealed a further upregulation of FBXO45 in PCA metastasis. These results were supported by an analysis of FBXO45 at the protein level. Remarkably, the principle of considering different molecular subtypes in biomarker studies was supported in this study. As described by Gerke et al. [6], in approximately 50% of PCA cases, a chromosomal rearrangement that forms a chimeric oncogene through fusion of TMPRSS2 with ERG (TMPRSS2:ERG or T2E) is present, which may exploit different gene signatures or pathways to promote the malignancy of PCA [6,24,25]. In recent years, TMPRSS2:ERG has been a major focus of research in the field of prostate cancer [6,25,26]. It has been shown that ERG overexpression is mostly related to the gene fusion of TMPRSS2 and ERG [27]. PCA is characterised by the fusion of the promoter region of TMPRSS2 with the coding region of ERG. The promoter region of TMPRSS2 is known to contain androgen-sensitive elements, which allows the overexpression of ERG to be driven by androgens [27,28]. Currently, this gene fusion is considered to be a driver event for carcinogenesis in prostate cancer [26]. TMPRSS2:ERG fusion is known to play a critical role in driving the progression from prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) to invasive carcinoma [29]. Normal prostate tissue does not express ERG under regular circumstances [30]. The overexpression of ERG leads to the dysregulation of cell proliferation, differentiation, angiogenesis, inflammation and apoptosis, and it is thereby considered one of the main factors for the transformation from localised to aggressive and metastatic cancer [26,31]. Nevertheless, only 50% of PCAs are T2E-positive. Gerke et al. [6] showed that PCAs should be classified as different molecular subtypes based on their T2E status. Overall, their study demonstrated that the T2E status, which itself is not a strong prognostic biomarker, critically determines the prognostic value of other biomarkers. They identified five prognostic biomarkers associated with a worse outcome exclusively in T2E-negative PCA. Remarkably, no biomarker was found in the T2E-positive subgroup. The authors concluded that the molecular subtype must be considered when applying prognostic biomarkers for outcome prediction in PCA [6]. Therefore, we aimed to assess a subtype-specific analysis based on the T2E-negative and T2E-positive molecular subtypes in this study. The present work revealed a T2E-positive status in approximately 1/3 of cases (54/161), which is slightly lower than the published data [32]. FBXO45 is significantly overexpressed in T2E-positive PCA and is also associated with an unfavourable clinical course only in this subgroup, which further supports the subtype-specific consideration, especially concerning TMPRSS2-ERG fusion, in the development of robust prognostic biomarker models for PCA. Remarkably, this is the first biomarker—to the best of our knowledge—that is identified in the T2E-positive subgroup. Finally, functional analyses *in vitro* revealed that FBXO45 has an impact on the cell motility and migration capacity in three metastatic PCA cell lines, suggesting that the metastatic ability of PCA is at least in part influenced by FBXO45 activity.

Placing the results in a functional context, FBXO45 represents the substrate-recognition subunit of the E3 ligases that control protein degradation via ubiquitylation. Recent scientific works demonstrated its pivotal role in numerous human diseases, neuronal development, tumorigenesis and tumour progression. It was shown that FBXO45 is highly expressed in gastric cancer and squamous-cell lung carcinoma and correlated with shortened survival [16,17]. Furthermore, there is evidence that FBXO45 facilitates tumour progression in pancreatic cancer [33]. The unfavourable prognostic role in tumour diseases is attributed to the anti-apoptotic function of FBXO45, resulting from the various target proteins that predominantly act as tumour suppressors. Thus, FBXO45 ubiquitinates and degrades the target p73, a member of the p53 family, leading to a reduction in cell death [12].

Another target that has already been investigated is the prostate apoptosis response protein 4 (Par-4). Par-4 is a tumour suppressor that induces cancer-selective apoptosis. Loss or downregulation of Par-4 has already been shown to be associated with therapy resistance and tumour relapse [11,18,34]. Another interesting target of FBXO45, FBXW7, is a tumour suppressor that targets specific substrates for ubiquitination and degradation, including the known driver oncogenes of aggressive PCA MYC and Mcl-1 [18,35,36]. Remarkably, FBXO45—mediated by FBXW7—decreases sensitivity to spindle poisons such as taxanes [37]. From a therapeutical point of view, this is of particular interest since docetaxel and cabazitaxel are used as chemotherapy agents for metastatic PCA.

In the last few years, microRNAs have increasingly gained attention in uro-oncological research. FBXO45 might also play a role in this context. A recent study showed that FBXO45 is downregulated by the tumour-suppressive microRNA-30e [38]. Overexpression of FBXO45 might be driven by the downregulation of microRNA-30e in PCA. Vice versa, the anticancer function of microRNA-30e could be mediated by the downregulation of FBXO45, suggesting a possible regulatory mechanism.

## 5. Conclusions

In a synopsis of the literature and the results of this work, FBXO45 overexpression seems to mediate relevant oncogenic properties in PCA and represent an independent prognostic biomarker. The functional data also suggest that FBXO45 is involved in the formation of metastasis. Of particular clinical relevance is the potential impact of FBXO45 on the tumour response to taxane-based chemotherapy. Furthermore, our work strengthens the classification of PCA into different molecular subtypes. Implementation of molecular subtyping in clinical practice could enable accurate prognostic predictions and pave the way towards individualised therapy.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers15061890/s1>, Table S1. Supplemental data\_Table\_Western\_Blot\_Densitometry, Figure S1. Supplemental\_Figure\_Western\_Blot.

**Author Contributions:** Conceptualisation, N.K., J.S. and J.E.; Methodology, N.K., M.v.D., M.B., J.S. and J.E.; Investigation, N.K., M.v.D., M.B. and J.S.; Resources, G.K., M.R., A.A. and J.E.; Writing, J.S., M.v.D. and N.K.; Review and Editing: all authors. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** The study was approved by the ethics committee of the University Hospital Bonn (number: 013/20).

**Informed Consent Statement:** All the patients gave written informed consent for the collection of biomaterials.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** The tissue samples were collected within the framework of the Biobank of the Center for Integrated Oncology ABCD (Aachen, Bonn, Cologne, Düsseldorf) at the University Hospital Bonn.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Schröder, F.H.; Hugosson, J.; Roobol, M.J.; Tammela, T.L.J.; Ciatto, S.; Nelen, V.; Kwiatkowski, M.; Lujan, M.; Lilja, H.; Zappa, M.; et al. Screening and Prostate-Cancer Mortality in a Randomized European Study. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 1320–1328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Dellis, A.; Zagouri, F.; Liontos, M.; Mitropoulos, D.; Bamias, A.; Papatsoris, A.G. Management of Advanced Prostate Cancer: A Systematic Review of Existing Guidelines and Recommendations. *Cancer Treat. Rev.* **2019**, *73*, 54–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Gillissen, S.; Attard, G.; Beer, T.M.; Beltran, H.; Bjartell, A.; Bossi, A.; Briganti, A.; Bristow, R.G.; Chi, K.N.; Clarke, N.; et al. Management of Patients with Advanced Prostate Cancer: Report of the Advanced Prostate Cancer Consensus Conference 2019. *Eur. Urol.* **2020**, *77*, 508–547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. He, Z.; Tang, F.; Lu, Z.; Huang, Y.; Lei, H.; Li, Z.; Zeng, G. Analysis of Differentially Expressed Genes, Clinical Value and Biological Pathways in Prostate Cancer. *Am. J. Transl. Res.* **2018**, *10*, 1444–1456.
6. Gerke, J.S.; Orth, M.F.; Tolkach, Y.; Romero-Pérez, L.; Wehweck, F.S.; Stein, S.; Musa, J.; Knott, M.M.L.; Hölting, T.L.B.; Li, J.; et al. Integrative Clinical Transcriptome Analysis Reveals TMPRSS2-ERG Dependency of Prognostic Biomarkers in Prostate Adenocarcinoma. *Int. J. Cancer* **2020**, *146*, 2036–2046. [[CrossRef](#)]
7. Cenciarelli, C.; Chiaur, D.S.; Guardavaccaro, D.; Parks, W.; Vidal, M.; Pagano, M. Identification of a Family of Human F-Box Proteins. *Curr. Biol.* **1999**, *9*, 1177–1179. [[CrossRef](#)]
8. Jin, J.; Cardozo, T.; Lovering, R.C.; Elledge, S.J.; Pagano, M.; Harper, J.W. Systematic Analysis and Nomenclature of Mammalian F-Box Proteins. *Genes Dev.* **2004**, *18*, 2573–2580. [[CrossRef](#)]
9. Skowyra, D.; Craig, K.L.; Tyers, M.; Elledge, S.J.; Harper, J.W. F-Box Proteins Are Receptors That Recruit Phosphorylated Substrates to the SCF Ubiquitin-Ligase Complex. *Cell* **1997**, *91*, 209–219. [[CrossRef](#)]
10. Liao, E.H.; Hung, W.; Abrams, B.; Zhen, M. An SCF-like Ubiquitin Ligase Complex That Controls Presynaptic Differentiation. *Nature* **2004**, *430*, 345–350. [[CrossRef](#)]
11. Chen, X.; Sahasrabudhe, A.A.; Szankasi, P.; Chung, F.; Basrur, V.; Rangnekar, V.M.; Pagano, M.; Lim, M.S.; Elenitoba-Johnson, K.S.J. Fbxo45-Mediated Degradation of the Tumor-Suppressor Par-4 Regulates Cancer Cell Survival. *Cell Death Differ.* **2014**, *21*, 1535–1545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Peschiaroli, A.; Scialpi, F.; Bernassola, F.; Pagano, M.; Melino, G. The F-Box Protein FBXO45 Promotes the Proteasome-Dependent Degradation of P73. *Oncogene* **2009**, *28*, 3157–3166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Wang, Z.; Wei, W. Fbxo45 Joins the ‘Par-4’ ty in Controlling Apoptosis of Cancer Cells. *Cell Death Differ.* **2014**, *21*, 1508–1510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Abshire, C.F.; Carroll, J.L.; Dragoi, A.-M. FLASH Protects ZEB1 from Degradation and Supports Cancer Cells’ Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Oncogenesis* **2016**, *5*, e254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Hsieh, M.-C.; Ho, Y.-C.; Lai, C.-Y.; Chou, D.; Chen, G.-D.; Lin, T.-B.; Peng, H.-Y. Spinal TNF- $\alpha$  Impedes Fbxo45-Dependent Munc13-1 Ubiquitination to Mediate Neuropathic Allodynia in Rats. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 811. [[CrossRef](#)]
16. Kogure, N.; Yokobori, T.; Ogata, K.; Altan, B.; Mochiki, E.; Ohno, T.; Toyomasu, Y.; Yanai, M.; Kimura, A.; Yanoma, T.; et al. Low Expression of FBXO45 Is Associated with Gastric Cancer Progression and Poor Prognosis. *Anticancer Res.* **2017**, *37*, 191–196. [[CrossRef](#)]
17. Wang, K.; Qu, X.; Liu, S.; Yang, X.; Bie, F.; Wang, Y.; Huang, C.; Du, J. Identification of Aberrantly Expressed F-Box Proteins in Squamous-Cell Lung Carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2018**, *144*, 1509–1521. [[CrossRef](#)]
18. Lin, M.; Wang, Z.; Zhu, X. FBXO45 Is a Potential Therapeutic Target for Cancer Therapy. *Cell Death Discov.* **2020**, *6*, 55. [[CrossRef](#)]
19. Chandran, U.R.; Ma, C.; Dhir, R.; Bisceglia, M.; Lyons-Weiler, M.; Liang, W.; Michalopoulos, G.; Becich, M.; Monzon, F.A. Gene Expression Profiles of Prostate Cancer Reveal Involvement of Multiple Molecular Pathways in the Metastatic Process. *BMC Cancer* **2007**, *7*, 64. [[CrossRef](#)]
20. Stein, J.; Majores, M.; Rohde, M.; Lim, S.; Schneider, S.; Krappe, E.; Ellinger, J.; Dietel, M.; Stephan, C.; Jung, K.; et al. KDM5C Is Overexpressed in Prostate Cancer and Is a Prognostic Marker for Prostate-Specific Antigen-Relapse Following Radical Prostatectomy. *Am. J. Pathol.* **2014**, *184*, 2430–2437. [[CrossRef](#)]
21. Mang, J.; Korzeniewski, N.; Dietrich, D.; Sailer, V.; Tolstov, Y.; Searcy, S.; von Hardenberg, J.; Perner, S.; Kristiansen, G.; Marx, A.; et al. Prognostic Significance and Functional Role of CEP57 in Prostate Cancer. *Transl. Oncol.* **2015**, *8*, 487–496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Klümper, N.; von Danwitz, M.; Stein, J.; Schmidt, D.; Schmidt, A.; Kristiansen, G.; Muders, M.; Hölzel, M.; Ritter, M.; Alajati, A.; et al. Downstream Neighbor of SON (DONSON) Expression Is Enhanced in Phenotypically Aggressive Prostate Cancers. *Cancers* **2020**, *12*, 3439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Stael, S.; Miller, L.P.; Fernández-Fernández, Á.D.; Van Breusegem, F. Detection of Damage-Activated Metacaspase Activity Activities by Western Blot in Plants. In *Plant Proteases and Plant Cell Death: Methods and Protocols*; Klemenčič, M., Stael, S., Huesgen, P.F., Eds.; Methods in Molecular Biology; Springer: New York, NY, USA, 2022; pp. 127–137; ISBN 978-1-07-162079-3.
24. Abeshouse, A.; Ahn, J.; Akbani, R.; Ally, A.; Amin, S.; Andry, C.D.; Annala, M.; Aprikian, A.; Armenia, J.; Arora, A.; et al. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell* **2015**, *163*, 1011–1025. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Penney, K.L.; Pettersson, A.; Shui, I.M.; Graff, R.E.; Kraft, P.; Lis, R.T.; Sesso, H.D.; Loda, M.; Mucci, L.A. Association of Prostate Cancer Risk Variants with TMPRSS2:ERG Status: Evidence for Distinct Molecular Subtypes. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2016**, *25*, 745–749. [[CrossRef](#)]
26. Adamo, P.; Ladomery, M.R. The Oncogene ERG: A Key Factor in Prostate Cancer. *Oncogene* **2016**, *35*, 403–414. [[CrossRef](#)]
27. Tomlins, S.A.; Rhodes, D.R.; Perner, S.; Dhanasekaran, S.M.; Mehra, R.; Sun, X.-W.; Varambally, S.; Cao, X.; Tchinda, J.; Kuefer, R.; et al. Recurrent Fusion of TMPRSS2 and ETS Transcription Factor Genes in Prostate Cancer. *Science* **2005**, *310*, 644–648. [[CrossRef](#)]
28. Kim, T.S.; Heinlein, C.; Hackman, R.C.; Nelson, P.S. Phenotypic Analysis of Mice Lacking the Tmprss2-Encoded Protease. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 965–975. [[CrossRef](#)]



29. Carver, B.S.; Tran, J.; Chen, Z.; Carracedo-Perez, A.; Alimonti, A.; Nardella, C.; Gopalan, A.; Scardino, P.T.; Cordon-Cardo, C.; Gerald, W.; et al. ETS Rearrangements and Prostate Cancer Initiation. *Nature* **2009**, *457*, E1. [[CrossRef](#)]
30. Deramaudt, T.B.; Remy, P.; Stiegler, P. Identification of Interaction Partners for Two Closely-Related Members of the ETS Protein Family, FLI and ERG. *Gene* **2001**, *274*, 169–177. [[CrossRef](#)]
31. Shimizu, K.; Ichikawa, H.; Tojo, A.; Kaneko, Y.; Maseki, N.; Hayashi, Y.; Ohira, M.; Asano, S.; Ohki, M. An Ets-Related Gene, ERG, Is Rearranged in Human Myeloid Leukemia with t(16;21) Chromosomal Translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10280–10284. [[CrossRef](#)]
32. Tomlins, S.A.; Bjartell, A.; Chinnaiyan, A.M.; Jenster, G.; Nam, R.K.; Rubin, M.A.; Schalken, J.A. ETS Gene Fusions in Prostate Cancer: From Discovery to Daily Clinical Practice. *Eur. Urol.* **2009**, *56*, 275–286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Wu, L.; Yu, K.; Chen, K.; Zhu, X.; Yang, Z.; Wang, Q.; Gao, J.; Wang, Y.; Cao, T.; Xu, H.; et al. Fbxo45 Facilitates Pancreatic Carcinoma Progression by Targeting USP49 for Ubiquitination and Degradation. *Cell Death Dis.* **2022**, *13*, 231. [[CrossRef](#)]
34. Burikhanov, R.; Rangnekar, V.M. Par-4 as a Therapeutic Target in Cancer and Other Diseases. In *Tumor Suppressor Par-4: Role in Cancer and Other Diseases*; Rangnekar, V.M., Ed.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2021; pp. 313–320; ISBN 978-3-030-80558-6.
35. Qiu, X.; Boufaied, N.; Hallal, T.; Feit, A.; de Polo, A.; Luoma, A.M.; Alahmadi, W.; Larocque, J.; Zadra, G.; Xie, Y.; et al. MYC Drives Aggressive Prostate Cancer by Disrupting Transcriptional Pause Release at Androgen Receptor Targets. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 2559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Reiner, T.; de las Pozas, A.; Parrondo, R.; Palenzuela, D.; Cayuso, W.; Rai, P.; Perez-Stable, C. Mcl-1 Protects Prostate Cancer Cells from Cell Death Mediated by Chemotherapy-Induced DNA Damage. *Oncoscience* **2015**, *2*, 703–715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Richter, K.T.; Kschonsak, Y.T.; Vodicska, B.; Hoffmann, I. FBXO45-MYCBP2 Regulates Mitotic Cell Fate by Targeting FBXW7 for Degradation. *Cell Death Differ.* **2020**, *27*, 758–772. [[CrossRef](#)]
38. Ganapathy, K.; Ngo, C.; Andl, T.; Coppola, D.; Park, J.; Chakrabarti, R. Anticancer Function of microRNA -30e Is Mediated by Negative Regulation of *HELLPAR*, a Noncoding macroRNA, and Genes Involved in Ubiquitination and Cell Cycle Progression in Prostate Cancer. *Mol. Oncol.* **2022**, *16*, 2936–2958. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

### 3. Danksagung

Zu allererst möchte ich dem Betreuer meiner Arbeit, PD Dr. med. Niklas Klümper, danken, ohne dessen unerschütterliche Motivation und Begeisterung für die uro-onkologische Forschung diese Arbeit wohl nicht zustande gekommen wäre. Egal ob WhatsApp-Nachrichten mit völlig verpixelten Western Blot-Bildern, spontane Labmeetings am Abend oder am Wochenende oder nicht lieferbare Reagenzien, Niklas kümmert sich – trotz viel zu viel Arbeit als Assistenzarzt in der Klinik.

Der Erfolg dieser Arbeit ist außerdem Prof. Dr. med. Jörg Ellinger zu verdanken, der mir ermöglicht hat, im Labor der Urologie mitzuarbeiten, den wohl schnellsten Doktorandenvertrag dieser Welt auf die Beine gestellt hat, und der in seiner Rolle als Doktorvater und als ehemaliger Laborleiter sehr gute, wirklich verlässliche Arbeit geleistet hat.

Ebenfalls besonders danken möchte ich Professor Dr. med. Manuel Ritter für seine ebenfalls uneingeschränkte Unterstützung.

Ohne einen besonders engagierten Menschen wäre kein einziges Experiment gelungen: Doris Schmidt. Die beste technische Assistentin, die sich ein Labor nur wünschen kann. Doris hat immer ein offenes Ohr, schaut sich stundenlang Ergebnisse mit einem an, kennt jeden Kniff an allen Laborgeräten und erklärt einem jeden Versuchsaufbau mit einer Engelsgeduld. Und das macht sie alles mit einer unverwechselbaren Herzlichkeit – Doris, Dir kann man nur immer weiter danken!

Ein riesiger Dank gebührt außerdem meinem Mann, Dr. med. Niklas von Danwitz, der mich jederzeit mit seinem Glauben an mich tatkräftig unterstützt hat.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mir ermöglicht haben, Medizin zu studieren und damit diese Doktorarbeit erst möglich gemacht haben. Danke, dass ihr immer für mich da seid und meine Ziele fördert.