

Forschungsbericht

an die

B. Braun-Stiftung

Zum Projekt:

Die Rolle von FABP5 (fatty acid binding protein 5) als Gewebe- und Exosomen-basierter Marker im lokalisierten Prostatakarzinom

Antragsteller:

PD Dr. med. Thomas Worst

Dr. rer. nat. Katja Nitschke

PD Dr. med. Frank Waldbillig

Klinik für Urologie und Urochirurgie, Universitätsmedizin Mannheim

Medizinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg

Theodor Kutzer-Ufer 1-3, 68167 Mannheim

Datum der Berichtserstellung:

28.06.2024

1. Zusammenfassung

ETS-Genfusionen (*ETV1*, *ETV4*, *ERG*) mit ihrem prominentesten Vertreter *TMPRSS2:ERG* sind in der Hälfte der lokalisierten Prostatakarzinome (PCa) nachweisbar und Basis für die molekulare Subtypisierung. Diese Subtypen zeigen auch Unterschiede in ihrer Genexpressionsmustern. Anhand von *in silico* Auswertungen publizierter Datensätze (TCGA; Taylor et al. 2010; Beltran et al. 2016) konnten wir zeigen, dass eine bisher nicht beschriebene Überexpression von *FABP5* (*fatty acid binding protein 5*) nahezu ausschließlich in Tumoren ohne *TMPRSS2:ERG*-Fusion nachweisbar war. Eigene Untersuchungen an Patienten einer Kohorte aus Mannheim zeigten eine Überexpression der *FABP5* RNA im lokalisierten und fortgeschrittenen PCa unabhängig von T-Stadium und Gleason-Score.

Weiterhin zeigten unsere *in vitro* Untersuchungen das Vorhandensein des *FABP5* Proteins auf extrazellulären Vesikeln (EV) des PCa und stellen somit die Nutzung von *FABP5* als nicht invasiven Biomarker in Aussicht.

Ein Teil der Ergebnisse publizierten wir mit dem Titel „Clinical relevance of gene expression in localized and metastatic prostate cancer exemplified by *FABP5*“ 2020 im World Journal of Urology.

2. Ausgangslage

Die 2005 erstmals beschriebenen Fusionsgene zwischen *TMPRSS2* und *ETS*-Transkriptionsfaktoren, wie *ERG* und *ETV1*, finden sich je nach Studie in 21 – 59% aller PCa und stellen damit die häufigsten genetischen Veränderungen dar (2,3). Es wird ihnen eine Assoziation mit einer schlechten Prognose zugeschrieben (3). Anhand dieser und anderer genetischer Veränderungen wurden in der TCGA-Kohorte (The Cancer Genome Atlas) eine Klassifikation des lokalisierten PCa in acht Subtypen vorgenommen (4). Drei dieser Subtypen sind durch das Vorhandensein von *ERG*- (46%), *ETV1*- (8%) bzw. *ETV4*-Fusionsgenen (4%) gekennzeichnet. Weitere Gruppen sind durch Mutationen in den Genen *SPOP* (11%), *FOXA1* (4%) und *IDH1* (1%) gekennzeichnet. Diese *ETS*-Fusionen gehen in der Regel mit einer Überexpression des in die Fusion involvierten und zumeist verkürzten *ETS*-Transkriptionsfaktors einher (3,5). Das Zusammenspiel zwischen diesen genetischen Veränderungen und den Veränderungen auf Transkriptionsebene und die daraus resultierenden Konsequenz für den Verlauf der einzelnen Tumorerkrankung sind weniger gut verstanden. Die Arbeiten des TCGA-Projektes und andere Studien konnten jedoch zeigen, dass das Vorhandensein von *ETS*-Fusionsgenen auch mit Änderungen auf transkriptioneller Ebene einhergeht.

Unsere *in silico* Analysen des initialen TCGA-Datensatzes (n=333) zeigten eine Überexpression für das *fatty acid binding protein 5* kodierenden Gens *FABP5* fast ausschließlich in Tumoren mit negativem ERG-Fusionsstatus. Diese Assoziation wurde erstmals von unserer Arbeitsgruppe beschrieben. Die Validierung an einem zweiten Datensatz primärer PCa (n=131, Taylor et al. MSKCC, Cancer Cell 2010) zeigte eine ähnliche Verteilung (6). Die *in silico* Analyse der Kohorte von Beltran et al. (7) weist darauf hin, dass dieser Zusammenhang zwischen negativem ERG-Fusionsstatus und erhöhter *FABP5* Expression auch in weit fortgeschrittenen Erkrankungsstadien zumindest in einem Teil der Tumore erhalten bleibt.

Bei der Aufteilung der TCGA-Kohorte entsprechend den genetischen Subtypen zeigte sich eine Überexpression von *FABP5* insbesondere in den Tumoren mit *SPOP* und *FOXA1* Mutationen sowie in der heterogenen Gruppe der Tumore mit anderen Mutationen.

Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) Analysen einer unabhängigen Kohorte von Patienten mit lokalisiertem PCa (n=59), die in der Klinik für Urologie und Urochirurgie der Universitätsmedizin Mannheim prostatektomiert wurden, zeigten, dass eine hohe *FABP5*-Expression mit einem kürzeren Rezidiv-freien Überleben assoziiert ist. Hierbei war die *FABP5*-Expression unabhängig vom Gleason Score und vom T-Stadium.

Andere Gruppen konnten bereits zeigen, dass *FABP5* auf Proteinebene im PCa überexprimiert ist (8). Immunhistochemische Untersuchungen belegen hierbei, dass sowohl die nukleäre als auch die zytoplasmatische Expression höher ist als bei einer benignen Prostatahyperplasie (BPH) (9). Forootan et al. zeigten eine Assoziation zwischen der Proteinexpression im Gewebe und dem Überleben der Patienten (10).

Auf molekularer Ebene ist *FABP5* eine Zielstruktur der Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren PPAR β/γ (10,11). Ein Knockdown von *FABP5* auf RNA-Ebene führte zu einer Reduktion des Tumorwachstums sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (8,12,11). Proteomische Analysen durch Pang et al. zeigten eine differentielle Expression von *FABP5* im Primärtumor in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus der Patienten (13). Diese Daten und unsere eigenen Untersuchungen legen eine potentielle Verwendung der *FABP5*-Expression als prädiktiven Marker im primären PCa nahe.

In eigenen Vorarbeiten konnten wir weiterhin auf EV der PCa-Zelllinie PC3 eine hohe Proteinexpression von *FABP5* nachweisen (14). Auf EV der benignen Prostatazelllinie PNT1A konnte *FABP5* hingegen nicht nachgewiesen werden.

3. Zielsetzung

Aufgrund der FABP5-Anreicherung auf EVs, der hohen und von etablierten klinischen Risikofaktoren unabhängigen Expression im Tumorgewebe sowie der Abwesenheit im Blut von gesunden Probanden (14) sollte FABP5 in dem zur Förderung beantragte Projekt auf seine Eignung als Gewebe- und EV-basierter Biomarker im lokalisierten PCa untersucht werden. Konkret war die Bearbeitung folgenden Fragestellungen geplant:

1. Können die *in silico* gefundenen Zusammenhänge zwischen der *FABP5* RNA-Expression und dem ERG-Fusionsstatus, der ERG-Expression und Mutationen in *SPOP*, *FOXA1* und *SPINK1* in einer unabhängigen Kohorte von Patienten mit lokalisiertem PCa validiert werden?
2. Eignet sich das FABP5 Protein als nicht invasiver EV-basierter Marker in der Diagnostik und Risikostratifizierung des lokalisierten PCa?

4. *In silico* Analysen

Unabhängig vom geplanten Arbeitsprogramm haben wir aufgrund der mittlerweile zur Verfügung stehenden weiteren großen PCa-Datensätze zusätzliche *in silico* Analysen durchgeführt. Die aktuelle Kohorte des TCGA-Projektes mit nunmehr 499 Patienten zeigte eine *FABP5*-Amplifikationsrate von 9%. In der Korrelationsanalyse zeigte sich eine hoch signifikante negative Korrelation zwischen der Expression von *FABP5* und *ERG* ($r=-0,539$, $p<0,0001$). In der noch größeren aktuellen MSKCC-Kohorte ($n=1013$) zeigte sich eine *FABP5*-Amplifikationsrate von 7%. In den 72 Patienten mit *FABP5*-Amplifikation zeigten nur 14 (19,4%) eine ETS-Fusion (*ERG*, *ETV1*, *ETV4*). RNA-Expressionsdaten liegen in dieser Kohorte leider nicht vor. In der Stand up to Cancer (SU2C) Kohorte mit 444 Proben von 429 metastasierten PCa zeigte sich eine deutliche Zunahme der von *FABP5*-Amplifikationen auf 25% der Fälle. 32 von 107 Patienten (29,9%) mit Amplifikationen zeigten eine ETS-Fusion. Auch in dieser Kohorte mit weit fortgeschrittenen Erkrankungen zeigte sich ebenfalls eine signifikante negative Korrelation ($r=-0,279$, $p<0,0001$) von *FABP5* mit *ERG*.

Es existieren vergleichsweise wenige gut annotierte Datenbanken, die Daten auf Gewebeebene von größeren Patientenkohorten öffentlich zur Verfügung stellen. Eine der wenigen Datenbanken ist der „Human Proteinatlas“ (www.proteinatlas.org). Hier sind für die *FABP5*-Proteinexpression Daten eines Gewebemicroarrays verfügbar. Diese zeigt interessanterweise entgegen unserer bisherigen Annahme eine schlechtere Prognose für diejenigen Tumore mit geringer Expression von *FABP5* (Abbildung 1).

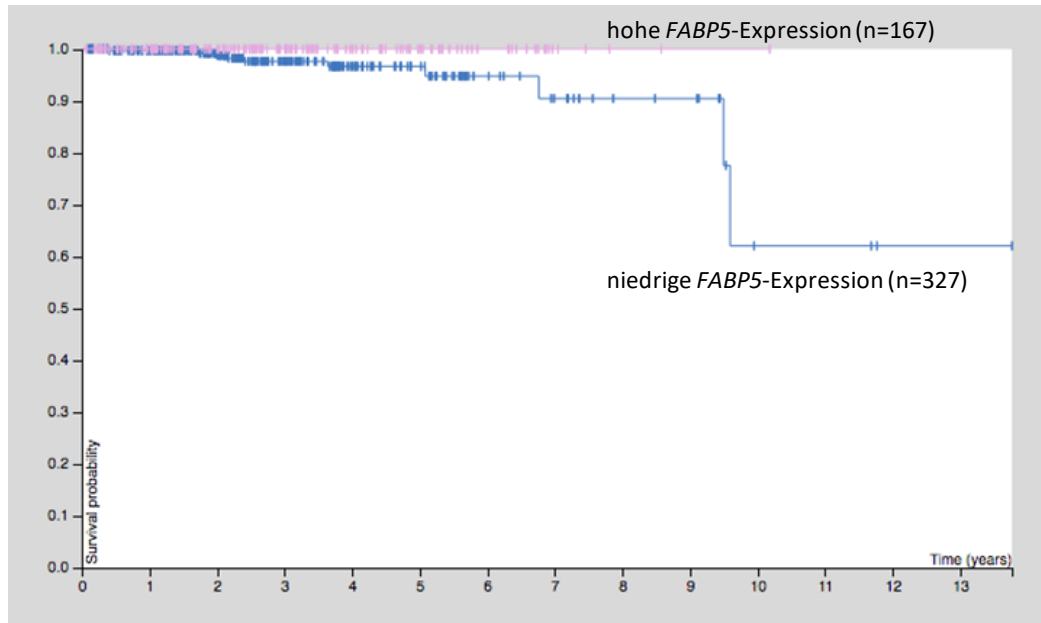


Abbildung 1: Kaplan-Meier-Kurve der Patienten mit hoher und niedriger *FABP5*-Expression (Analyse anhand der Daten des Human Proteinatlas)

5. Analyse der Genexpression von *FABP5* und *ERG* im Gewebe

In einer Kohorte mit 57 Patienten mit lokalisertem PCa und 50 Patienten mit einer palliativen transurethrale Resektion der Prostata (TUR-P) zeigte sich auf mRNA-Ebene eine Überexpression von *FABP5* (Abbildung 2A). Dies konnten wir durch Analyse einer unabhängigen Kohorte von 34 Patienten mit lokalisierten PCa bestätigen (Abbildung 2B). Weiterhin wurde eine Kaplan-Meier-Analyse für das biochemisch Rezidiv-freie Überleben (BCR, Abbildung 2C) durchgeführt.

Die initial geplante Analyse der unter Zielsetzung 1 aufgeführten genetischen Veränderungen gelang leider nicht. Es zeigte sich, dass die genetischen Veränderungen in den o.g. Genen für eine gezielte PCR-basierte Analyse oder eine konventionelle Sanger-Sequenzierung zu heterogen waren, kaum eine Mutations- oder Fusionsvariante trat mehr als einmal auf. Eine NGS-Analyse hingegen hätte bei der geplanten Fallzahl den finanziellen Rahmen des Projektes deutlich überstiegen. Wir fokussierten uns daher auf die Analyse der EV (siehe Abschnitt 6).

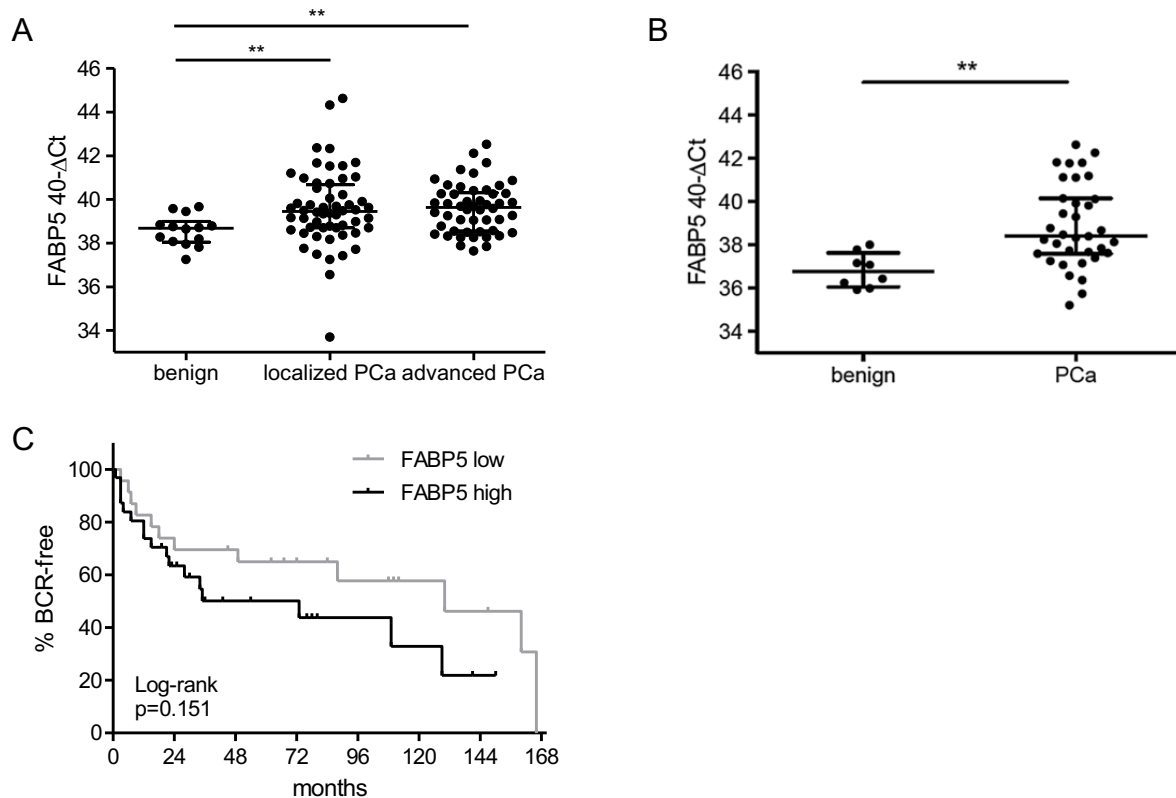


Abbildung 2: Überexpression von *FABP5* in 57 Patienten mit einem lokalisierten und 50 Patienten mit einem fortgeschrittenen PCa (A) sowie in einer zweiten Kohorte von 40 Patienten mit einem PCa (B). Zusätzlich wurde das Rezidiv-freie Überleben (C) in Abhängigkeit von der *FABP5*-Expression analysiert.

6. Analyse von FABP5 auf EV aus Plasma bzw. Serum

6.1. Vergleich verschiedener Isolationsmethoden von EV aus Plasma von Patienten

EVs aus Plasma von Probanden wurden mit zwei verschiedenen Methoden isoliert. Zum einen wurden die EVs mittels Ultrazentrifugation und zum anderen mit Hilfe eines käuflich erwerblichen Säulen-basierten Kits von Qiagen gewonnen. Im Anschluss wurden die Konzentrationen und die Größenverteilungen der EVs mittels Nanopartikel Tracking Assay (NTA) analysiert. Bei der Gewinnung der EVs mit dem Kit waren die Partikel höher konzentriert, allerdings auch etwas größer als bei der Aufreinigung mit der Ultrazentrifugation. Alle weiteren EV-Aufreinigungen führten wir mit dem Säulen-basierten Kit durch, um sicher zu stellen, dass für nachfolgende Analysen ausreichend Partikel verfügbar waren.

6.2. Qualitätskontrolle der EVs aus Plasmaproben von Patienten

EVs, die aus Plasma von Patienten mit PCa sowie altersgleichen Kontrollen (BPH) isoliert wurden, wurden mittels NTA (Abbildung 3A, F, K), Durchflusszytometrie (Abbildung 3B-D, G-I, L-N) und Elektronenmikroskopie (Abbildung 3E, J, O) untersucht. Zur Kontrolle wurden EVs aus der PCa-Zelllinie DU145 isoliert und ebenfalls charakterisiert. Sowohl bei den Patienten- als auch bei der Zellkulturprobe konnte die Struktur und die charakteristische Größenverteilung der EVs sowie die Expression der typischen Oberflächenmarker CD9 und CD63 gezeigt werden. CD81 war nur auf den EV der Zelllinie detektierbar, allerdings nicht auf den humanen EVs.

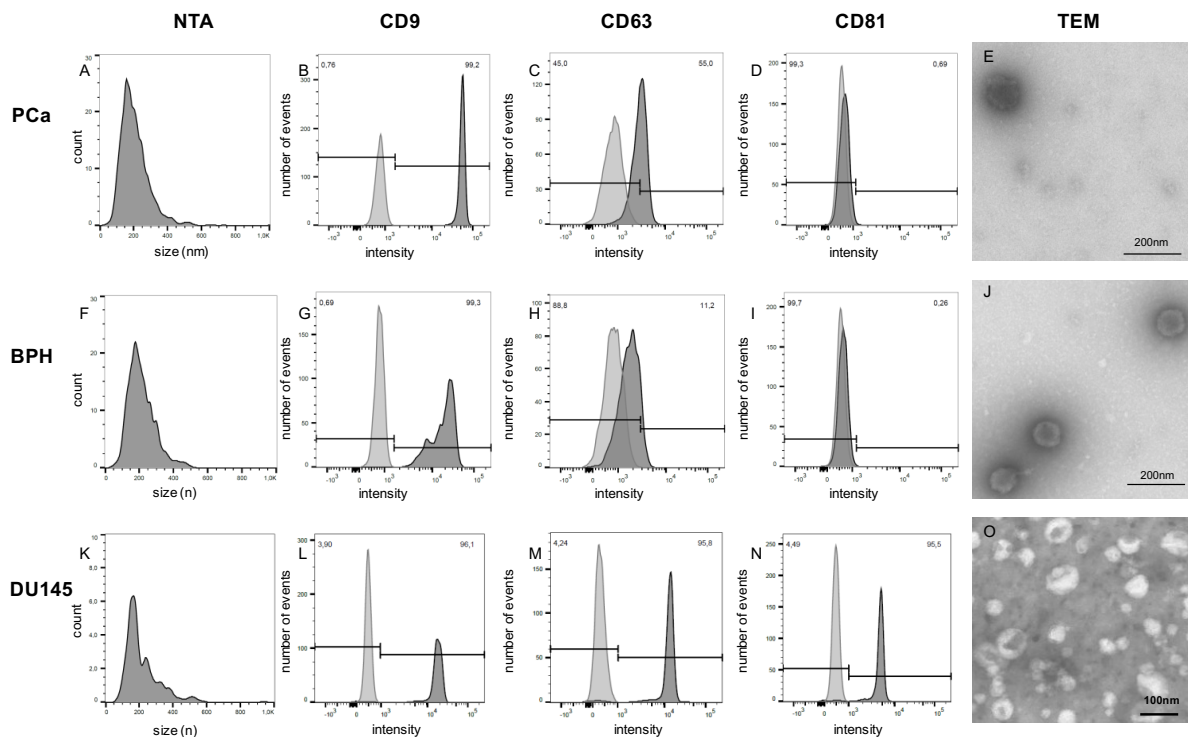


Abbildung 3: Charakterisierung extrazellulärer Vesikel (EV) eines Patienten mit PCa (A-E) und einer BPH-Kontrolle (F-J) sowie der PCa-Zelllinie DU145 (K-O) mittels Nanoparticle Tracking Analyse (NTA; A,F,K), Bead-basierter Durchflusszytometrie (B-D, G-I, L-N) und Elektronenmikroskopie (E,J,O).

Diese Ergebnisse zeigen die prinzipielle Möglichkeit der Analyse von FABP5 auf EV von Patienten mit PCa. Aufgrund der insgesamt eher geringen Expression von FABP5 in den mit ELISA analysierten EV-Proben und der geringen Unterschiede in der Expression in Proben verschiedener Tumorstadien scheint die Vesikel-basierte Analyse als Biomarkeransatz nicht geeignet. Die in den Zielen des Forschungsantrags formulierte Frage Nr. 2 muss daher mit „Nein“ beantwortet werden. Allerdings zeigte sich bei der Analyse von Plasma und Serum von

Patienten mit PCa eine deutlich bessere Korrelation mit dem klinischen Erkrankungsstadium. Wir entschieden uns daher für die weiteren Analysen ohne die vorherige Anreicherung von EVs fortzuführen. Zunächst galt dabei zu klären, ob sich Plasma oder Serum besser als Analyt eignen und ob die Proben vor der Analyse mit RIPA-Puffer lysiert werden müssen (Abbildung 4).

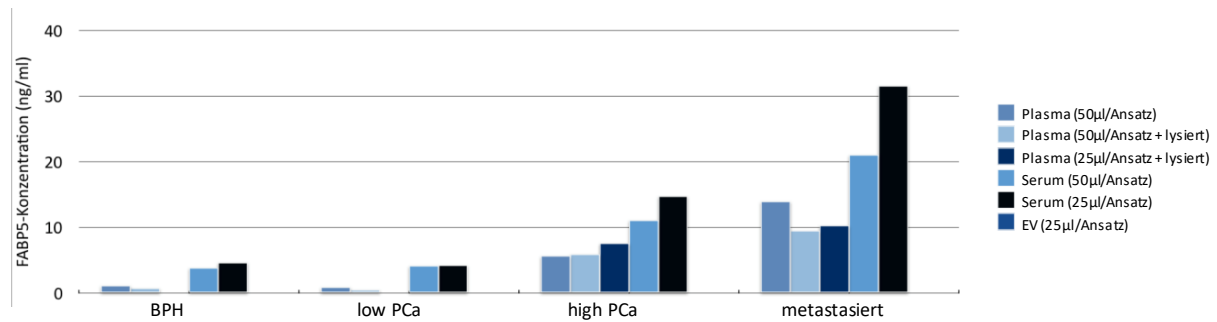


Abbildung 4: Vergleich von Plasma und Serum als Analyt bei der Bestimmung der FABP5-Konzentration mittels ELISA. Zusätzlich wurden verschiedenen Plasma- und Serumvolumen (25 µl/ 50 µl) sowie EV-Volumen (25 µl) analysiert, die in den ELISA eingesetzt wurden. Zusätzlich wurde ein Teil der Proben mittels RIPA-Puffer behandelt.

Aufgrund der höheren nachweisbaren FABP5-Proteinkonzentrationen in Serumproben, erfolgten alle weiteren ELISA-Analysen mit lysierten Serumproben.

6.3. Analyse einer Patientenkohorte

Die FABP5-Konzentration wurde in Serumproben von 27 BPH-Kontrollen, 63 Patienten mit einem lokalisierten PCa (low PCa n=39, intermediäres PCa n=48 und high PCa n=58) und 32 Patienten mit einem metastasierten PCa analysiert. Eine Korrelation zwischen der FABP5-Konzentration und dem PSA-Wert konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 5A). Jedoch zeigte sich eine signifikant stärkere Konzentration von FABP5 in Patienten mit einem high PCa im Vergleich zu einem low PCa ($p=0,0442$, Abbildung 5B).

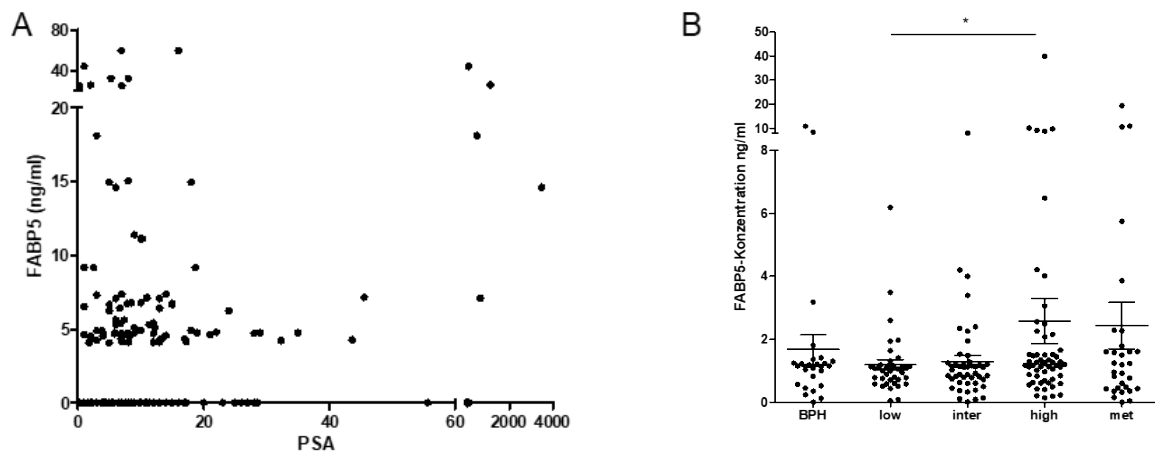


Abbildung 5: Analysen der FABP5-Konzentration aus Serum von Patienten mit einem lokalisierten (low, intermediär, high) oder metastasierten PCa sowie von BPH-Kontrollen. Es gab keine Korrelation zwischen den FABP5-Konzentrationen und den PSA-Werten (A). Die FABP5-Konzentration war in Patienten mit einem low PCa signifikant niedriger als in Patienten mit einem high PCa (B).

7. Wissenschaftlicher Ausblick

Durch Nutzung der öffentlich zugänglichen Datenbanken können auch Hypothesen in anderen urologischen Tumorerkrankungen postuliert werden. Hierbei ergeben sich Hinweise auf eine potenzielle Nutzung der Gewebeexpression von *FABP5* in Nierenzellkarzinomen (Abbildung 6A) und Urothelkarzinomen der Harnblase (Abbildung 6B). Unabhängige Validierungen wären jedoch erforderlich. Ebenso sollten Untersuchungen in Blutplasma oder -Serum erfolgen. Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit leitete aus Daten der TCGA-Kohorte mit Nierentumoren weiterhin eine Korrelation der mRNA-Expression von *FABP5* mit einem schlechten onkologischen Outcome ab (15).

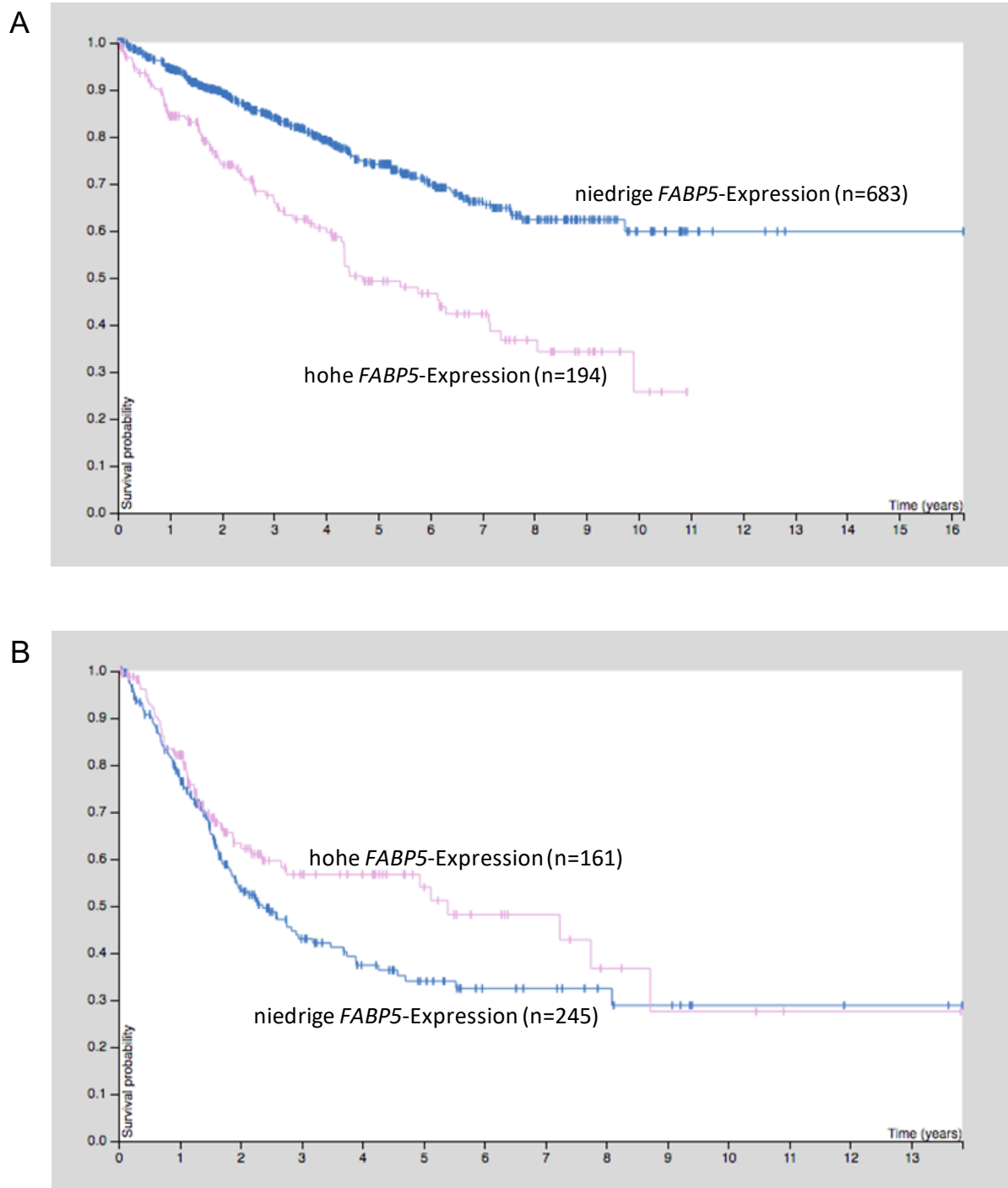


Abbildung 6: Postulierte prognostische Relevanz der Genexpression von FABP5 in Patienten mit Nierenzellkarzinom (A) und Urothelkarzinom der Harnblase (B) aus Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten Gewebeproben.

Anknüpfend an diese und unsere eigenen erhobenen Daten wird das Projekt im PCa und andere urologischen Tumorerkrankungen thematisch fortgeführt. Ein entsprechender Drittmittelantrag befindet sich in Vorbereitung.

8. Literaturverzeichnis

1. Nitschke K, Erben P, Waldbillig F, Abdelhadi A, Weis CA, Gottschalt M, et al. Clinical relevance of gene expression in localized and metastatic prostate cancer exemplified by FABP5. *World J Urol.* 2020 Mar;38(3):637–45.
2. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science.* 2005 Oct 28;310(5748):644–8.
3. Boström PJ, Bjartell AS, Catto JWF, Eggener SE, Lilja H, Loeb S, et al. Genomic Predictors of Outcome in Prostate Cancer. *Eur Urol.* 2015 Dec;68(6):1033–44.
4. Cancer Genome Atlas Research Network. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell.* 2015 Nov 5;163(4):1011–25.
5. Falzarano SM, Magi-Galluzzi C. ERG protein expression as a biomarker of prostate cancer. *Biomark Med.* 2013 Dec;7(6):851–65.
6. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell.* 2010 Jul 13;18(1):11–22.
7. Beltran H, Prandi D, Mosquera JM, Benelli M, Puca L, Cyrta J, et al. Divergent clonal evolution of castration-resistant neuroendocrine prostate cancer. *Nat Med.* 2016 Mar;22(3):298–305.
8. Adamson J, Morgan EA, Beesley C, Mei Y, Foster CS, Fujii H, et al. High-level expression of cutaneous fatty acid-binding protein in prostatic carcinomas and its effect on tumorigenicity. *Oncogene.* 2003 May 8;22(18):2739–49.
9. Morgan EA, Forootan SS, Adamson J, Foster CS, Fujii H, Igarashi M, et al. Expression of cutaneous fatty acid-binding protein (C-FABP) in prostate cancer: potential prognostic marker and target for tumourigenicity-suppression. *Int J Oncol.* 2008 Apr;32(4):767–75.
10. Forootan FS, Forootan SS, Malki MI, Chen D, Li G, Lin K, et al. The expression of C-FABP and PPAR γ and their prognostic significance in prostate cancer. *Int J Oncol.* 2014 Jan;44(1):265–75.
11. Morgan E, Kannan-Thulasiraman P, Noy N. Involvement of Fatty Acid Binding Protein 5 and PPAR β/δ in Prostate Cancer Cell Growth. *PPAR Res.* 2010;2010.
12. Forootan SS, Bao ZZ, Forootan FS, Kamalian L, Zhang Y, Bee A, et al. Atelocollagen-delivered siRNA targeting the FABP5 gene as an experimental therapy for prostate cancer in mouse xenografts. *Int J Oncol.* 2010 Jan;36(1):69–76.
13. Pang J, Liu WP, Liu XP, Li LY, Fang YQ, Sun QP, et al. Profiling protein markers associated with lymph node metastasis in prostate cancer by DIGE-based proteomics analysis. *J Proteome Res.* 2010 Jan;9(1):216–26.
14. Worst TS, von Hardenberg J, Gross JC, Erben P, Schnoelzer M, Hausser I, et al. A database-augmented, exosome-based mass spectrometry approach exemplarily identifies circulating claudin 3 as biomarker in prostate cancer. *Mol Cell Proteomics MCP.* 2017 Apr 9;

15. Lv Q, Wang G, Zhang Y, Han X, Li H, Le W, et al. FABP5 regulates the proliferation of clear cell renal cell carcinoma cells via the PI3K/AKT signaling pathway. *Int J Oncol.* 2019 Apr;54(4):1221–32.
16. Worst TS, Meyer Y, Gottschalt M, Weis CA, von Hardenberg J, Frank C, et al. RAB27A, RAB27B and VPS36 are downregulated in advanced prostate cancer and show functional relevance in prostate cancer cells. *Int J Oncol.* 2017 Mar;50(3):920–32.
17. Breyer J, Wirtz RM, Otto W, Erben P, Kriegmair MC, Stoehr R, et al. In stage pT1 non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC), high KRT20 and low KRT5 mRNA expression identify the luminal subtype and predict recurrence and survival. *Virchows Arch Int J Pathol.* 2017 Mar;470(3):267–74.

9. Erklärung und Unterschrift

„Wir versichern hiermit, dass alle Angaben zu eigenen und fremden Vorarbeiten, zu den durchgeführten Analysen und verwendeten Datenbanken, zu Kooperationen und zu allen anderen wesentlichen Tatsachen korrekt und nach bestem Wissen und Gewissen gemacht wurden.“

Mannheim, 28.06.2024



PD Dr. med. Thomas Worst



Dr. rer. nat. Katja Nitschke



PD Dr. med. Frank Waldbillig