

Aus der Klinik für Urologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Zirkuläre RNAs im klarzelligen Nierenzellkarzinom: Microarray-
basierte Identifikation, methodische Validierung und Evaluation
als klinische Prognosemarker

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Antonia Franz

aus Berlin

Datum der Promotion: 18.12.2020

Inhaltsverzeichnis

1. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	3
2. Abkürzungsverzeichnis	4
3. Zusammenfassung	5
4. Abstract	6
5. Einführung und Zielstellung	7
6. Methodik	8
6.1. Patienten und Gewebeproben	8
6.2. RNA-Isolierung und Charakterisierung	9
6.3. Microarray-Analysen	9
6.4. Divergente Primer und quantitative Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR)	10
6.5. Statistische Auswertung	11
7. Ergebnisse	12
7.1. Patientenkohorte	12
7.2. Microarray-basierte Identifikation differenziell exprimierter circRNAs und Auswahl relevanter circRNAs zur weiteren Evaluation	12
7.3. Analytische Validierung der ausgewählten circRNAs und Bewertung der RT-qPCR Assays	13
7.3.1. RNase-R-Behandlung der Gesamt-RNA	14
7.3.2. Sanger-Sequenzierung der circRNA <i>backsplice junction</i>	15
7.3.3. Verwendung <i>Random-Hexamer-Primer</i> vs. <i>Oligo(dt)</i> -Primer zur cDNA- Synthese	15
7.3.4. Gelelektrophorese spezifischer qPCR-Produkten unter Verwendung divergenter und konvergenter Primer	16
7.4. Differenzielle Expression der circRNAs und ihr Bezug zu klinischen und pathologischen Variablen	17
7.5. CircRNAs als prognostische Marker und Errechnung von RNA-Signaturen	19
7.6. Verbesserung der prognostischen Vorhersagekraft durch ein circRNA- basiertes klinisch-genomisches Modell	21
7.7. <i>In silico</i> -Analyse von circRNA-miRNA-Gen Interaktionen	23
8. Diskussion	25
9. Literaturverzeichnis	31
10. Appendix	36
11. Eidesstattliche Versicherung	38
12. Anteilserklärung an der erfolgten Publikation	39
13. Auszug aus der Journal Summary List	40
14. Ausgewählte Publikation	41
15. Curriculum Vitae	64
16. Publikationsliste	65
17. Danksagung	66

1. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Struktur einer circRNA.....	10
Abbildung 2: Volcano Plot der im Microarray detektierten circRNAs	13
Abbildung 3: RNase-R-Behandlung.....	14
Abbildung 4: Sanger-Sequenzierung	15
Abbildung 5: Gelelektrophorese verschiedener RT-qPCR-Produkte	16
Abbildung 6: Expression der circRNAs und linearen RNAs	18
Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurven	20
Abbildung 8: ROC-Kurven und Entscheidungskurvenanalyse	22
Abbildung 9: CircRNA-miRNA-Gen Netzwerk.....	24
Tabelle 1: Eigenschaften der untersuchten Patientenkohorte.....	36
Tabelle 2: Multivariate proportionale Hazardregression nach Cox der unterschiedlichen Vorhersage-Modelle für die Überlebensendpunkte.....	37

2. Abkürzungsverzeichnis

AUC	Fläche unter der Kurve (<i>area under the curve</i>)
bp	Basenpaare (<i>base pairs</i>)
ccRCC	klarzelliges Nierenzellkarzinom (<i>clear cell renal cell carcinoma</i>)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary DNA</i>)
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
circRNA	zirkuläre Ribonukleinsäure (<i>circular ribonucleic acid</i>)
Cq	<i>cycle quantification</i>
EGLN3	<i>Egl-9 family hypoxia-inducible factor 3</i>
et al.	et alia
FC	<i>Fold Change</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	genomische DNS
HIF α	<i>Hypoxia-inducible factor alpha</i>
linRNA	lineare RNS
miRNA	<i>microRNA</i>
NOX4	NADPH-Oxidase 4
NZK	Nierenzellkarzinom
o.g.	oben genannt(e)
PPIA	Peptidylprolylisomerase A
RHOBTB3	<i>Rho-related BTB domain containing 3</i>
RNAse R	Ribonuklease R
ROC	<i>receiver operating characteristic</i>
RT-qPCR	quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (<i>quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>)
TBP	<i>TATA-Box binding Protein</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TMEM	<i>Transmembrane Protein</i>
U	Einheiten (<i>Units</i>)
VCL	Vinculin
vs.	versus

3. Zusammenfassung

Hintergrund: Zirkuläre RNAs (circRNAs) wurden kürzlich als wichtige Einflussfaktoren auf die Karzinogenese und Tumorprogression beschrieben. Zusätzlich sind sie vielversprechende neue Biomarker zur Prognoseeinschätzung von Patienten mit Nierenzellkarzinom (NZK). Dies ist eine der ersten Studien, die circRNAs als Biomarker für das krankheitsspezifische, rezidivfreie und Gesamtüberleben von Patienten mit Nierenzellkarzinom untersucht hat.

Zielstellung: Das Ziel dieser Studie war die Identifikation und Validierung von circRNAs im NZK-Gewebe und die Evaluation von drei differenziell exprimierten circRNAs als prognostische Biomarker für die o.g. klinisch relevanten Endpunkte.

Methoden: Microarray-Analysen wurden zur genomweiten Identifikation der circRNAs verwendet. Anschließend wurden drei differenziell exprimierte circRNAs (circEGLN3, circNOX4 und circRHOBTB3) experimentell validiert und die Expression dieser circRNAs und der dazugehörigen mRNAs in 99 NZK-Tumorproben und 85 angrenzenden Normalgewebeproben mittels RT-qPCR gemessen. Das diagnostische und prognostische Potenzial wurde mittels C-Statistik, Kaplan-Meier-Analysen, univariater und multivariater Cox-Regression, Entscheidungskurven-Analyse, internem *Bootstrapping* und dem Akaike-Informationskriterium bestimmt.

Ergebnisse: Die Expression von circEGLN3 ermöglichte eine Unterscheidung zwischen Normal- und Tumorgewebe mit einer Genauigkeit von 97%. Ein prognostisches Modell wurde mittels multivariater Cox-Regression erstellt und beinhaltete circEGLN3, circRHOBTB3 und linRHOBTB3 für die drei Endpunkte. Ein kombiniertes Modell aus klinisch-pathologischen Variablen und der bestimmten RNA-Signatur verbesserte die prognostische Vorhersagegenauigkeit der Endpunkte im Vergleich zur separaten Anwendung. Anhand von internem *Bootstrapping* und dem Akaike-Informationskriterium wurde die statistische Signifikanz und Robustheit des Modells bestätigt.

Schlussfolgerungen: Diese Arbeit zeigte, dass circRNA-basierte Modelle die prognostische Genauigkeit im Hinblick auf die Endpunkte krankheitsspezifisches, rezidivfreies und Gesamtüberleben bei NZK-Patienten im Vergleich zu bisher angewendeten Modellen mit klinisch-pathologischen Standardvariablen verbessern können.

4. Abstract

Background: Circular RNAs (circRNAs) as important elements in cancer initiation and progression have been discovered recently. Furthermore, they are promising new biomarkers to assess the clinical outcome of patients with renal cell carcinoma (RCC). This is one of the first studies evaluating circRNAs as biomarkers for cancer-specific, recurrence-free and overall survival.

Objective: The aim of this study was to discover and validate circRNAs in clear cell RCC (ccRCC) tissue and evaluate three differentially expressed circRNAs as potential prognostic biomarkers for clinically relevant outcome endpoints.

Methods: Microarray analysis was used for genome-wide identification of circRNAs. Subsequently, three differentially expressed circRNAs (circEGLN3, circNOX4, and circRHOBTB3) were experimentally validated and the expression of these circRNAs and their linear counterparts measured in 99 malignant and 85 adjacent non-malignant ccRCC tissue samples using RT-qPCR. The diagnostic and prognostic potential was assessed using C-Statistics, Kaplan-Meier method, univariate and multivariate Cox regression, decision curve analysis, internal validation via bootstrapping and Akaike information criterion.

Results: Accuracy of circEGLN3 was 97% for differentiating between normal and malignant tissue. The prognostic model for the three endpoints was generated by multivariate Cox regression and included circEGLN3, circRHOBTB3 and linRHOBTB3. Predictive accuracy for the endpoints was significantly improved by applying a combined model of clinicopathological factors and RNA-signature rather than separated models. Statistical significance and robustness of the model was confirmed by internal bootstrapping.

Conclusion: This study demonstrated the benefit of combining circRNA signatures with standard clinicopathological factors to improve predictive accuracy of cancer-specific, recurrence-free and overall survival in ccRCC.

5. Einführung und Zielstellung

Im Jahr 2018 wurde weltweit bei schätzungsweise 400.000 Menschen ein Nierenzellkarzinom (NZK) diagnostiziert, davon verstarben 170.000 an dieser Erkrankung [1]. Der häufigste histologische Subtyp dieser Tumorentität ist, mit einem Anteil von 70-75 %, das klarzellige Nierenzellkarzinom [2].

Aufgrund der späten klinischen Manifestation werden 20-30 % der Patienten erst im metastasierten Stadium der Erkrankung diagnostiziert, wobei das 5-Jahresüberleben von Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung bei unter 10 % liegt [3]. Auch annähernd 25 % der primär nicht metastasierten Patienten entwickeln nach der therapeutischen Nephrektomie noch Metastasen [4].

Eine Vorhersage des klinischen Verlaufs der Erkrankung basiert bis zum heutigen Tag vor allem auf klinisch-pathologischen Kenngrößen, deren prognostischer Wert eingeschränkt ist (Übersicht in [5]). Molekulargenetische Biomarker sind bisher nicht als prognostische Marker im Nierenzellkarzinom etabliert. Um den Bestrebungen der modernen Medizin gerecht zu werden und Patienten künftig möglichst individualisierte Therapien mit Verbesserung des Langzeitüberlebens und der Heilungsrate anbieten zu können, sind Fortschritte bei der prognostischen Einordnung des Nierenzellkarzinoms dringend notwendig. Weiterhin können durch neue Erkenntnisse der molekularen Tumorbio­logie bisher unbekannte therapeutische Zielstrukturen ermittelt werden.

In den letzten Jahren wurde mit dem *Next-Generation-Sequencing* eine leistungsstarke Methode zur Analyse großer genetischer Datenmengen entwickelt. Im Zuge dessen konnten zahlreiche Gruppen nicht-kodierender Ribonukleinsäuren (RNAs) näher charakterisiert und neue Gruppen identifiziert werden. Zirkuläre RNAs (circRNAs), deren funktionelle Relevanz 2012 erstmals beschrieben wurde, stellen eine neue Gruppe nicht-kodierender RNA dar. Es wurde nachgewiesen, dass sie die Initiation und den Progress neoplastischer Erkrankungen steuern [6, 7].

CircRNAs sind kovalent geschlossene Ringstrukturen, welche weder die bei linearer RNA auffindbaren 5'-3'-Enden, noch einen Poly-(A)-Schwanz aufweisen [8]. In zahlreichen Studien konnte bereits eine spezifische Expression der circRNAs in verschiedenen Tumorarten nachgewiesen werden (Übersicht in [9]). Anhand der Expressionsprofile konnten diagnostische und prognostische Aussagen abgeleitet werden, was für die funktionelle Relevanz der circRNAs spricht [10, 11]. Insbesondere

ihre Funktion als "Schwämme" (*sponges*) für microRNA (miRNA) scheint bei der Entstehung von Tumorerkrankungen relevant zu sein [7].

Eine regulatorische Funktion einzelner circRNAs durch Bindung an funktionell bedeutsame miRNAs wurde im Nierenzellkarzinom bereits in mehreren Studien nachgewiesen [12-14]. Das prognostische Potenzial der circRNAs im Nierenzellkarzinom wurde bis zur Veröffentlichung der Publikation [15], die dieser Arbeit zugrunde liegt, jedoch nur in einer Studie berücksichtigt: Huang et al. [16] wiesen eine Assoziation zwischen der Expression von circABCB10 und der Gesamtüberlebensdauer der untersuchten Patienten nach. Seitdem wurden vier weitere Studien veröffentlicht, die den Zusammenhang zwischen Expressionsniveau der untersuchten circRNA und der Gesamtüberlebensdauer der Studienkohorte analysieren [17-20]. Chen et al. [20] untersuchten neben dem Einfluss der Expression von circRAPGEF5 auf das Gesamtüberleben auch das rezidivfreie Überleben.

Obwohl in diesen Studien auch zunehmend das prognostische Potenzial der circRNAs berücksichtigt wird, liegt ihr Schwerpunkt jedoch auf der Untersuchung funktioneller Zusammenhänge. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, eine umfassende Analyse mehrerer circRNAs als prognostische Marker zur Vorhersage der Endpunkte krankheitsspezifisches Überleben, rezidivfreies Überleben und Gesamtüberleben bei NZK-Patienten durchzuführen.

Diese Zielstellung wurde in drei Phasen bearbeitet: I) Die Microarray-basierte Identifikation des circRNA-Profiles in NZK-Proben; II) die analytische Validierung ausgewählter differenziell exprimierter circRNAs; III) die Evaluation der prädiktiven Aussagekraft der circRNAs allein und in einem kombinierten Modell mit konventionellen klinisch-pathologischen Variablen.

6. Methodik

6.1. Patienten und Gewebeproben

Die in dieser Arbeit verwendeten Gewebeproben wurden im Zeitraum von 2003 bis 2016 im Rahmen von radikalen oder partiellen Tumornephrektomien bei Patienten mit klarzelligem NZK entnommen (Appendix Tabelle 1). Im Anschluss an die Entnahme erfolgte die Klassifikation des Tumorgewebes (Tumorstadium nach den UICC TNM-Richtlinien von 2002 und 2012, Fuhrman-Grad gemäß WHO-Kriterien von 2004) durch zwei erfahrene Uropathologen. Die Proben wurden in einem RNA-Stabilisierungsreagenz asserviert und anschließend bei -80 °C gelagert.

Anamnestische, klinische und pathologische Daten der Patienten wurden zum Zeitpunkt der Operation und im Verlauf erfasst.

Die Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin stimmte der Untersuchung des humanen Gewebematerials im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit zu (EA1/134/12). Die Durchführung der Arbeit erfolgte entsprechend der Satzung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Charité – Universitätsmedizin Berlin in ihrer aktuellen Fassung vom 29.03.2018. Alle Patienten wurden mündlich und schriftlich über die Studienteilnahme aufgeklärt und stimmten schriftlich der Verwendung des entnommenen Gewebes im Rahmen dieser Forschungsarbeit zu.

6.2. RNA-Isolierung und Charakterisierung

Aus dem pathologisch bestätigten Tumorgewebe wurden Proben gleichen Gewichts entnommen und mittels TissueLyser (Qiagen, Hilden, Deutschland) homogenisiert. Anschließend erfolgte die Isolierung der Gesamt-RNA einschließlich der circRNAs mit dem miRNeasy-Mini-Kit (Qiagen). Zur Beurteilung der Reinheit und Konzentration der gewonnenen RNA erfolgte die Messung der Absorptionsquotienten (260 zu 280 nm und 230 zu 260 nm) mit dem NanoDrop-1000-Spektrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA). Die Qualität der isolierten RNA wurde anhand der RNA-Integritäts-Werte (RIN-Werte), die mit dem Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) bestimmt wurden, beurteilt. Es wurden ausschließlich RNA-Proben mit einem RIN-Wert ≥ 6 verwendet.

6.3. Microarray-Analysen

Die aufgereinigte Gesamt-RNA für die Microarray-Messung wurde aus sieben gepaarten Gewebeproben isoliert. Diese Paare bestanden jeweils aus einer Probe des klarzelligen NZK-Gewebes und einer Probe des angrenzenden Nierennormalgewebes desselben Patienten.

Die Microarray-Analysen wurden als Auftragsleistung durch ArrayStar Inc. (ArrayStar, Rockville, USA) durchgeführt. ArrayStar führte vor der Microarray-Analyse eine Anreicherung der circRNA-Konzentration mittels enzymatischer Verdauung von linearer RNA (linRNA) mit RNase R durch. Der ArrayStar-Microarray V2.0 besteht aus 13.617 spezifischen Sonden für humane circRNAs. Die Microarray-Rohdaten wurden gemeinsam mit der Abteilung Bioinformatik des Berlin Institute of Health (BIH)

analysiert und anschließend interdisziplinär beurteilt. Auf Grundlage der Fluoreszenzunterschiede zwischen Normal- und Tumorgewebe wurden Aussagen zur differentiellen Expression der circRNAs getroffen.

6.4. Divergente Primer und quantitative Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR)

Durch die Verbindung eines *downstream* 3'-Endes eines RNA-Abschnittes mit dem *upstream* 5'-Ende entsteht für jede circRNA eine individuelle sogenannte *backsplice junction* [8]. Anhand dieser spezifischen RNA-Sequenz können circRNAs identifiziert werden (Abb. 1).

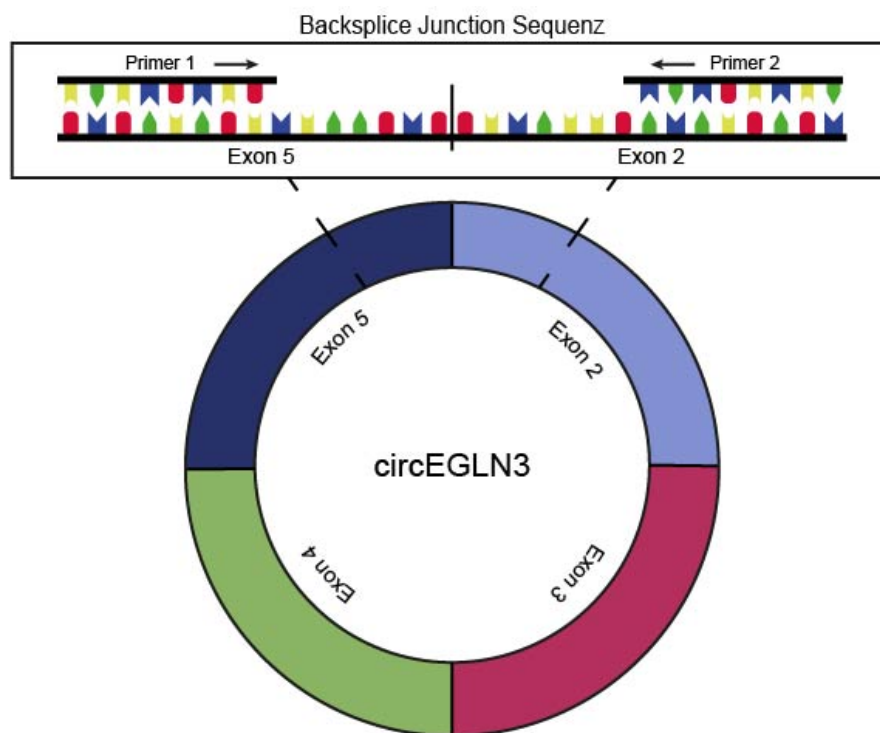


Abbildung 1: Struktur einer circRNA

Exemplarische Darstellung der Primerlokalisierung und Exonkomposition für circEGLN3. Eigene Darstellung.

Es wurden *backsplice junction* spezifische divergente Primer für die drei circRNAs entwickelt. Diese bilden in der RT-qPCR Amplicons mit einer Länge von 127bp (circEGLN3), 126bp (circNOX4) und 140bp (circRHOBTB3). Im Gegensatz zu

konvergenten Primerpaaren, wie bei der Amplifikation von linearer RNA verwendet, bewirken divergente Primer auf der linearen Form der RNA eine Amplifikation in entgegengesetzter Richtung.

Zur Messung von circRNAs in der RT-qPCR wurden divergente Primer mithilfe der Datenbank Primer3 entworfen und von TIB MolBiol (TIB MolBiol Berlin, Deutschland) hergestellt.

Die RT-qPCR-Messungen wurden nach den MIQE-Richtlinien durchgeführt [21]. Die circRNA-Expression im Gewebe wurde mit dem Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher, Waltham, USA) am LightCycler 480 (Roche, Mannheim, Deutschland) gemessen. Am Ende der RT-qPCR-Messung wurde die jeweilige Schmelzkurve des PCR-Produkts analysiert. Diese war bei allen gemessenen Produkten eingipflig. Die Analysen erfolgten als Dreifachbestimmung im 96-Mikrotiterplatten-Format. Bei jeder PCR-Messung wurden zwei interne Kontrollen sowie *No-template*-Kontrollen mitgeführt, um die Varianz der Messergebnisse der unterschiedlichen Platten quantifizieren zu können. Zur Normalisierung der gemessenen circRNA-Expression wurden die mRNAs der Gene GAPDH, PPIA und TBP bestimmt. Die mRNAs der Gene PPIA und TBP sind aufgrund ihrer hohen Expressionsstabilität geeignete Referenzgene im klarzelligen Nierenzellkarzinom [22]. GAPDH ist weithin als Haushaltsgen bekannt und wurde daher vornehmlich als Referenzgen in den Publikationen zur circRNA Expressionsanalyse verwendet [7]. Die differenzielle Expression wurde anhand der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode, normalisiert auf die o.g. Referenzgene, mit dem Programm qBase+ (Biogazelle, Gent, Belgien) durchgeführt.

6.5. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurden die Programme SPSS (Version 25, IBM Corp. Armonk, USA), GraphPad Prism (Version 8.1, La Jolla, USA) und MedCalc (Version 19.0.6, Ostende, Belgien) angewandt. Kontinuierliche Daten wurden mit nicht-parametrischen Tests (Mann-Whitney U-Test, Kruskal-Wallis Test, Spearman Korrelation) ausgewertet, kategoriale Daten mit dem Chi-Quadrat und Fisher-Test. Die Diskriminationsfähigkeit der Modelle und Variablen wurde durch *receiver operating characteristic* (ROC)-Kurven anhand der Fläche unter der Kurve (AUC) ermittelt. Die errechneten Modelle wurden mit dem Akaike-Informationskriterium bewertet [23]. Die Überlebenswahrscheinlichkeiten wurden anhand von Kaplan-Meier-Kurven, univariate und multivariate Cox-Regressionen mit den o.g. Programmen bestimmt. Die hierbei

verwendeten Trennwerte wurden mit der Software X-tile (Rimm Lab, New Haven, USA) errechnet [24]. Die *in silico*-Analyse der miRNA-circRNA-Bindungsstellen erfolgte mit dem Webtool CirclInteractome [25]. Für die darauffolgende miRNA-Gen-Interaktionsanalyse wurden die Datenbanken miRDB [26] und TargetScan [27] verwendet. Ein p-Wert <0.05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

7. Ergebnisse

7.1. Patientenkohorte

Für die Studie wurde Gewebe von 99 Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom verwendet (Appendix Tabelle 1). Zusätzlich wurde gepaartes, an das Tumorgewebe angrenzendes Normalgewebe von 85 Patienten eingesetzt.

7.2. Microarray-basierte Identifikation differenziell exprimierter circRNAs und Auswahl relevanter circRNAs zur weiteren Evaluation

In dem Microarray der NZK-Proben wurden 13.261, der insgesamt 13.617, circRNAs mit spezifischen Sonden detektiert.

Eine anschließende Analyse der Microarray-Rohdaten zusammen mit der Abteilung für Bioinformatik des Berlin Institute of Health ergab, dass 78 circRNAs in den Tumorgewebeproben signifikant höher exprimiert waren als im Nierennormalgewebe ($\text{Log}_2 \text{ Fold Change} \geq 1$, $p \leq 0.05$). 91 circRNAs waren im Tumorgewebe signifikant niedriger exprimiert ($\text{Log}_2 \text{ Fold Change} \geq -1$, $p \leq 0.05$).

Zur Auswahl relevanter circRNAs im Hinblick auf ihre Verwendung als potenzielle Biomarker wurden folgende Kriterien angewandt: $\text{Log}_2 \text{ Fold Change} \geq 2$, $p \leq 0.05$, Signalstärke auf dem Microarray ≥ 500 (gerätespezifisch) (Abb. 2). Es verblieben fünf erhöhte und elf erniedrigte circRNAs, die diese Kriterien erfüllten. Drei dieser circRNAs leiten sich von den Genen EGLN3, NOX4 und RHOBTB3 ab, deren Rolle bei der Initiation und Progression des NZK oder anderen Krebserkrankungen bereits beschrieben wurde [28-30]. Aufgrund ihrer ausgeprägten Expressionsdifferenz im Microarray und ihrer potenziellen funktionellen Relevanz wurden die drei circRNAs circEGLN3 (hsa_circ_0101692), circNOX4 (hsa_circ_0023984) und circRHOBTB3 (hsa_circ_000744) für die weitere Validierung ausgewählt. Die Nomenklatur der circRNAs ist bisher uneinheitlich (Übersicht in [9]). Die Identifikationsnummer der in dieser Arbeit untersuchten circRNAs ist der Datenbank circBase entnommen [31]. Aus

Gründen der besseren Lesbarkeit wurden diese im vorliegenden Text nach dem Ursprungsgen benannt.

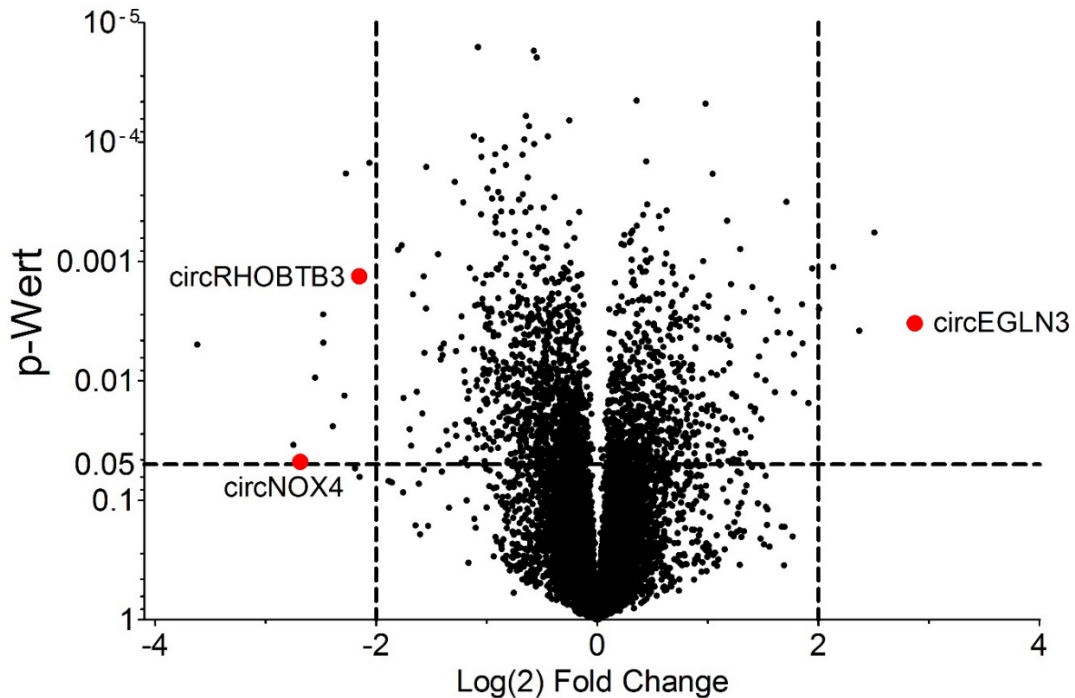


Abbildung 2: Volcano Plot der im Microarray detektierten circRNAs

Die ausgewählten circRHOBTB3, circNOX4 und circEGLN3 sind hervorgehoben. Die gestrichelten Linien grenzen $p=0.05$ und $\text{Log}_2 \text{ Fold Change} = |2|$ ab. Eigene Darstellung.

7.3. Analytische Validierung der ausgewählten circRNAs und Bewertung der RT-qPCR Assays

Es wurden spezifische RT-qPCR Assays für die circRNAs und den mRNAs der jeweiligen Ursprungsgene entwickelt. Die Spezifität der Produkte wurde anhand der PCR-Schmelzkurven und einer gelelektrophoretischen Auftrennung der Produkte überprüft. Darüber hinaus wurden weitere Experimente (siehe 6.3.1 – 6.3.4.) durchgeführt, deren Ergebnisse die Zirkularität und Spezifität der PCR-Produkte belegen. Des Weiteren wurde die Wiederholbarkeit (Intra-Assay Variation) und die Reproduzierbarkeit (Inter-Assay Variation) der RT-qPCR-Messungen überprüft. Diese erfüllten die Kriterien anwendungsbereiter RT-qPCR-Assays entsprechend der MIQE-Richtlinien.

7.3.1. RNase-R-Behandlung der Gesamt-RNA

CircRNAs werden aufgrund ihrer Zirkularität von der Exoribonuklease RNase R nicht abgebaut [7]. Im Gegensatz dazu kann lineare RNA mithilfe der RNase R degradiert werden. Wird RNase R in der Gesamt-RNA nach der RNA-Isolierung angewandt, führt dies zu einer relativen Anreicherung der circRNA. Diese Technik wird insbesondere vor Sequenzierung und RT-qPCR angewandt [32]. Für dieses Experiment wurde ein Reaktionsgemisch mit 1 µg isolierter Gesamt-RNA, 3 U RNase R (Epicenter, Illumina, San Diego, USA) und 10 U Ribonuklease Inhibitor (abm, Richmond, Canada) hergestellt. Das Gemisch wurde zusammen mit dem Reaktionspuffer und Wasser in einem Gesamtvolumen von 10 µl für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert [32]. Zur späteren Normalisierung wurde ein *spike-in* mit RNA von *C. elegans* durchgeführt. Als lineare Kontrollen dienten linEGLN3, linNOX4, linRHOBTB3, linGAPDH und linVCL. Memczak et al. [7] haben bereits Experimente zur circRNA-Anreicherung durch RNase-R-Behandlung an HEK-Zellen durchgeführt und eine Anreicherung der circ4 und circ9 beschrieben. Daher dienten diese beiden circRNAs ebenfalls als Kontrollen der Methodik. Die Expression von linearer und zirkulärer RNA wurde im Anschluss mittels RT-qPCR bestimmt und auf die *C. elegans* miR-39 normalisiert (Abb. 3). Die Behandlung der Gesamt-RNA mit RNase R führte zu einem Anstieg der Cq-Werte für alle linearen RNAs im Vergleich zu den unbehandelten Proben. Für die circRNAs ergab sich eine Reduktion des Cq-Wertes nach Behandlung mit RNase R, also eine relative Anreicherung.

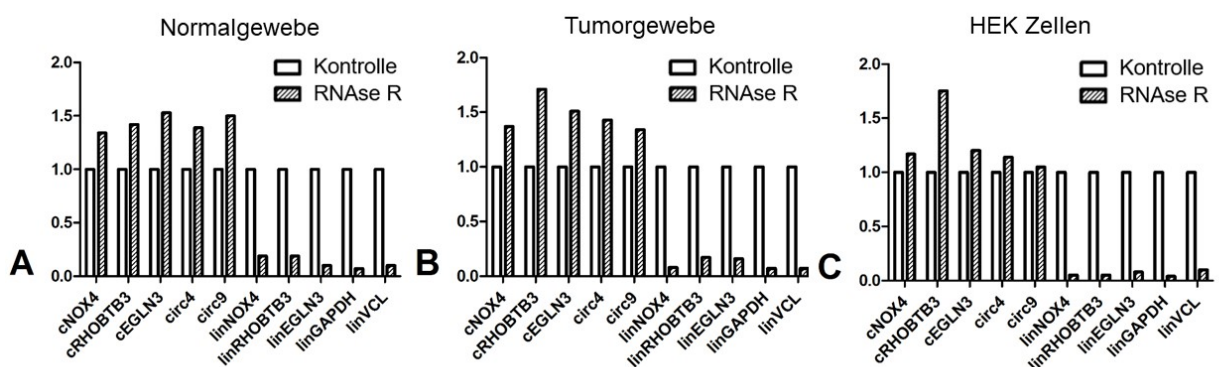


Abbildung 3: RNase-R-Behandlung

Relative Anreicherung der circRNAs nach RNase-R-Behandlung von (A) Nierennormalgewebe, (B) NZK-Tumorgewebe und (C) HEK-Zellen. Darstellung übersetzt und entnommen aus der zugrundeliegenden Originalpublikation [15].

7.3.2. Sanger-Sequenzierung der circRNA *backsplice junction*

Aufgrund der individuellen *backsplice junction* Sequenz kann eine circRNA durch Sequenzierung dieser Basenfolge identifiziert werden. Für die drei zu verifizierenden circRNA wurden entsprechende divergente Primer entwickelt und die Länge der in der RT-qPCR entstandenen Amplicons mittels Gelelektrophorese bestimmt. Die entstandenen Banden korrekter Länge wurden aufgereinigt und anschließend durch die Firma LGC (Berlin, Deutschland) mittels Sanger-Sequenzierung sequenziert (Abb. 4).

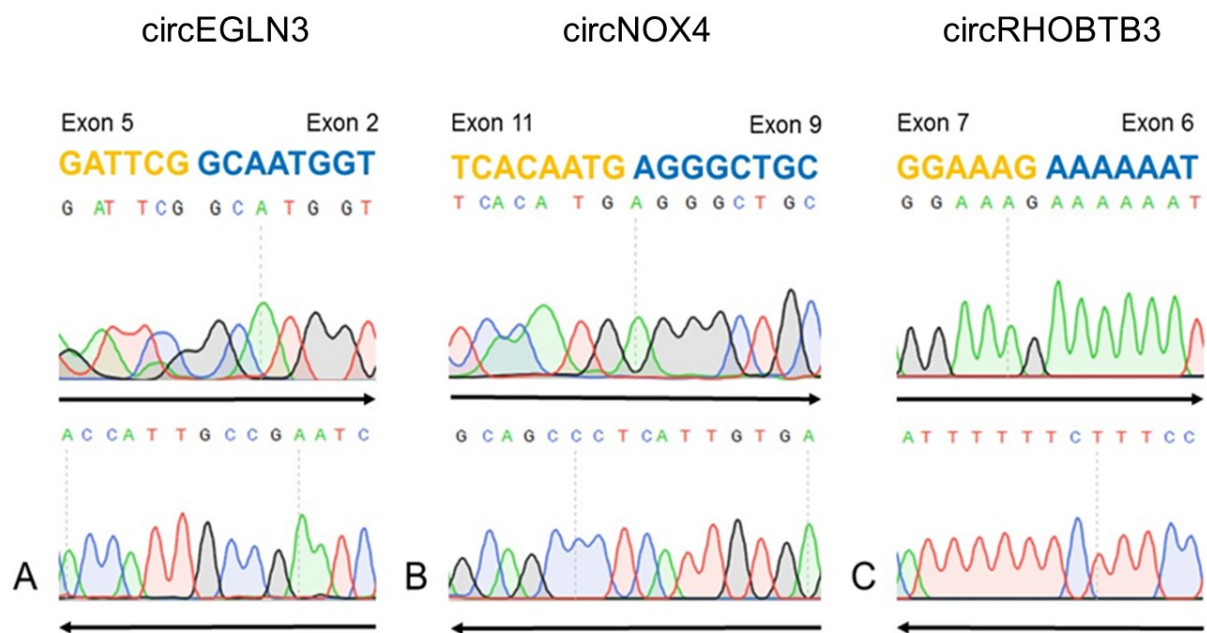


Abbildung 4: Sanger-Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde mit vorwärts (→) und rückwärts (←) gerichteten Primern durchgeführt. Darstellung der zugrundeliegenden Originalpublikation [15] entnommen.

7.3.3. Verwendung *Random-Hexamer-Primer* vs. *Oligo(dt)*-Primer zur cDNA-Synthese

Aufgrund ihrer kovalent geschlossenen Struktur besitzen circRNA keinen Poly-(A)-Schwanz [8]. Aus diesem Grund werden *Random-Hexamer-Primer* zur Amplifikation der circRNA während der cDNA-Synthese (*complementary DNA*) verwendet. *Oligo(dt)*-Primer, die eine Amplifikation linearer RNA beginnend am Poly-(A)-Schwanz ermöglichen, führen dementsprechend zu einer deutlich geringeren Amplifikation der circRNAs. Zum experimentellen Nachweis wurde die cDNA-Synthese sowohl mit *Random-Hexamer-Primern* (Roche, Mannheim, Deutschland) als auch mit *Oligo(dt)*-

Primern (Roche, Mannheim, Deutschland) durchgeführt und anschließend vergleichend die Expression mittels RT-qPCR der circRNA (EGLN3, NOX4, RHOBTB3) und mRNA (GAPDH, TMEM) bestimmt. Die Synthese der cDNA wurde mit dem Transcriptor First Strand Synthesis Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) mit isolierter Gesamt-RNA aus gepoolten NZK-Tumorgewebeproben durchgeführt.

7.3.4. Gelelektrophorese spezifischer qPCR-Produkten unter Verwendung divergenter und konvergenter Primer

CircRNAs entstehen bei ko- oder post-transkriptionellen *Backsplicing*-Prozessen [8]. Sie können dementsprechend erst nach reverser Transkription zu cDNA detektiert werden. Sie lassen sich, im Gegensatz zu mRNA, nicht in genomischer DNA (gDNA) nachweisen. Es wurden RT-qPCR Messungen mit divergenten Primern zur Amplifikation von circRNA in cDNA und in gDNA durchgeführt. Zur Kontrolle erfolgte das Design konvergenter Primer, die im Bereich der Exons binden, aus denen sich die circRNAs prä-transkriptionell zusammensetzen. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der RT-qPCR-Produkte konnten die Produkte erwarteter Länge für die circRNAs nur in der cDNA Probe nachgewiesen werden. Die Produkte, welche mittels konvergenter Primer gebildet wurden, waren sowohl in cDNA als auch in gDNA nachweisbar (Abb. 5).

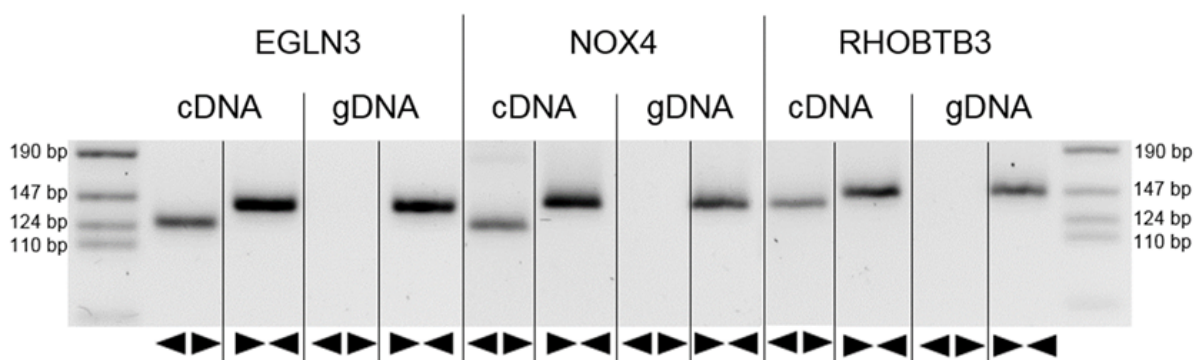


Abbildung 5: Gelelektrophorese verschiedener RT-qPCR-Produkte

Divergente (◄►) Primer zur Messung von circRNA amplifizieren die Sequenzen nur in cDNA. Konvergente (►◄) Primer bewirken eine Amplifikation der circRNA bildenden Exons in cDNA und gDNA. Darstellung der zugrundeliegenden Originalpublikation [15] entnommen.

7.4. Differenzielle Expression der circRNAs und ihr Bezug zu klinischen und pathologischen Variablen

Als erster Schritt der klinischen Evaluation wurde das Expressionsniveau der circRNAs und der dazugehörigen linRNAs in den 99 Tumorgewebeproben und gepaarten 85 Normalgewebeproben bestimmt.

Der in der Microarrayuntersuchung prognostizierte Expressionsunterschied zwischen Normal- und Tumorgewebe bestätigte sich. Zwischen der Expression der circRNAs bei Patienten ohne Metastasen (M0; n=82) und Patienten mit bekannten Fernmetastasen (M1, n=17) bestand jedoch kein signifikanter Unterschied (Abb. 6). Weiterhin zeigte sich für alle circRNAs und dazugehörigen linRNAs kein signifikanter Unterschied des Expressionsniveaus im Bezug auf Alter und Geschlecht der Patienten sowie bezüglich des TNM-Stadiums, des Fuhrman-Grades, der Größe oder des R-Status des Tumors. Lediglich für circEGLN3 und linEGLN3 konnte mit zunehmendem Fuhrman-Grad von 1 bis 4 eine signifikante Reduktion der Expression nachgewiesen werden (circEGLN3: 11.9, 9.1, 7.8, 0.7, $p=0.006$; linEGLN3: 6.5, 5.3, 4.5, 0.5, $p=0.004$; Kruskal-Wallis Test. Der Zusammenhang zwischen erhöhter linRHOBTB3 Expression und einem höheren TNM-Stadium war mit $p=0.051$ nicht statistisch signifikant.

Anhand der Expressionsdaten der circRNAs und linRNAs wurden ROC-Analysen zur Bewertung der RNAs als potenzielle Diskriminatoren zwischen Tumor- und Normalgewebeproben durchgeführt. Es zeigte sich, dass anhand des Expressionsunterschiedes der circRNAs bzw. linRNAs zwischen Normal- und Tumorgewebe eine eindeutige Zuordnung des jeweiligen Gewebes möglich ist. Die Beurteilung erfolgt anhand der AUC, diese war für alle untersuchten RNAs >0.81 ($p<0.0001$ für die Differenz zu $AUC=0.5$, Mann-Whitney U-Test). Für die circEGLN3 und linEGLN3 ergab sich sogar eine jeweilige AUC von 0.98 und für die Kombination dieser beiden RNAs eine AUC von 0.99.

Die Expression von circRNAs und ihren jeweiligen linRNAs wiesen sowohl im Normal- als auch im Tumorgewebe eine hohe lineare Korrelation auf (Spearman Korrelationskoeffizienten (r_s) zwischen 0.624 und 0.851). Das Verhältnis von circRNAs zu linRNAs im Normalgewebe war jedoch signifikant niedriger als im Tumorgewebe (circEGLN3/linEGLN3 0.68 vs. 1.57, $p<0.0001$; circNOX4/linNOX4 0.79 vs. 1.16, $p<0.0001$; circRHOBTB3/linRHOBTB3 0.95 vs. 0.99, $p=0.022$; Wilcoxon-Test).

Betrachtet man die drei verschiedenen circRNAs und linRNAs untereinander, ergeben sich zahlreiche signifikante Korrelationen (*Supplement Table S6A-C* [15]). Vergleicht

man die hier signifikanten Korrelationen im Normal- mit denen im Tumorgewebe, ist die Richtung der linearen Korrelation verschieden. Beispielsweise korrelieren circEGLN3 und linRHOBTB3 im Normalgewebe positiv miteinander ($r_s = 0.488$, $p < 0.0001$), wohingegen die Korrelation im Tumorgewebe negativ ist ($r_s = -0.261$, $p = 0.009$). Obwohl sich vergleichbare Korrelationen für circRNAs und linRNAs zeigten, weisen die Änderungen in den Verhältnissen und die verschiedenen Korrelationen auf eine – zumindest teilweise – voneinander unabhängige Regulation im Normal- und Tumorgewebe hin.

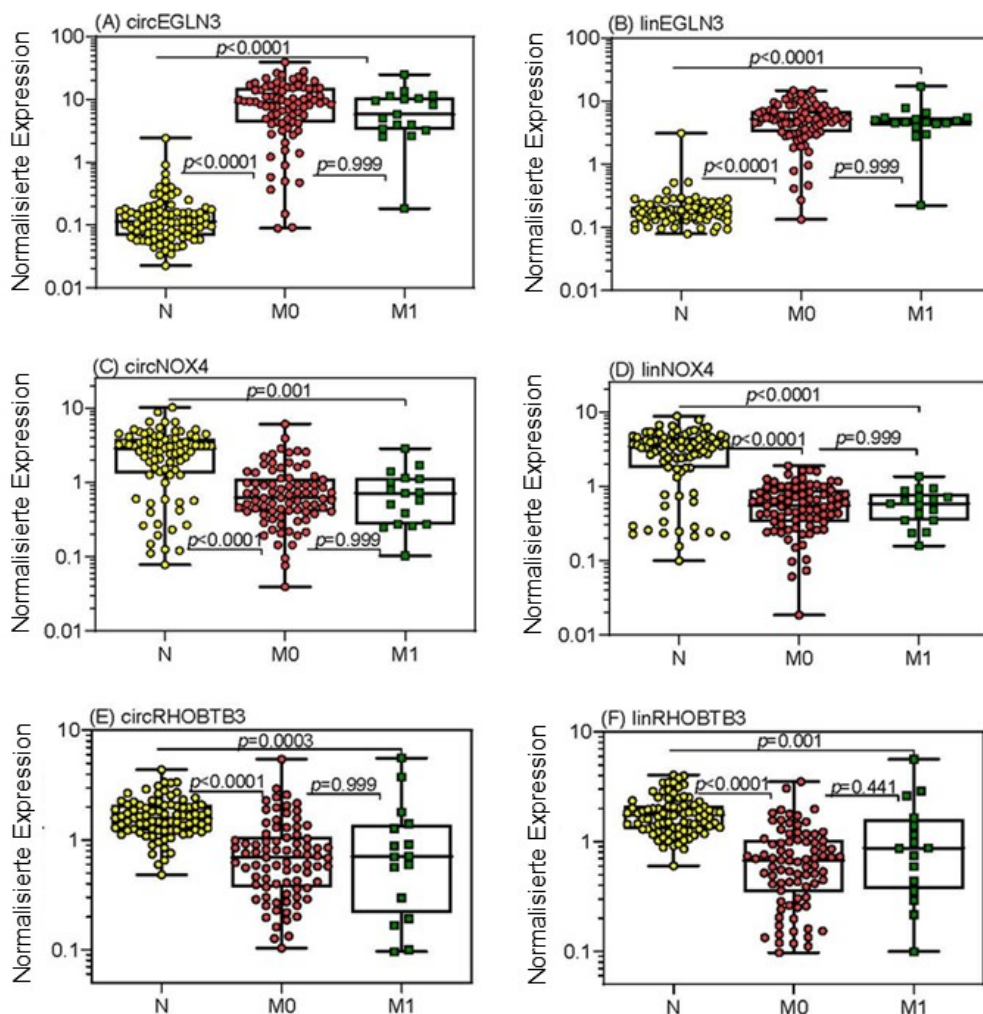


Abbildung 6: Expression der circRNAs und linearen RNAs

Die Expression wurde in NZK-Gewebeproben und Proben aus angrenzendem Nierennormalgewebe (N; $n=85$) gemessen. Die Tumorgewebeproben sind unterteilt in Patienten ohne bekannte Metastasen (M0; $n=82$) und Patienten mit Fernmetastasen (M1; $n=17$). Die p-Werte wurden mittels Kruskal-Wallis Tests ermittelt. Darstellung übersetzt und entnommen aus der zugrundeliegenden Originalpublikation [15].

7.5. CircRNAs als prognostische Marker und Errechnung von RNA-Signaturen

Zur Bewertung der prognostischen Aussagekraft der circRNAs wurde das krankheitsspezifische Überleben als primärer Endpunkt definiert. Sekundäre Endpunkte waren das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben. Die Endpunkte wurden als Zeitraum von der Nephrektomie bis zum Eintritt des jeweiligen endpunktdefinierenden Ereignisses bzw. bis zum letzten Nachverfolgungszeitpunkt festgelegt.

Zur Analyse des Zusammenhangs zwischen der Expression der RNAs und der Endpunkte wurden Kaplan-Meier-Analysen durchgeführt. Hierfür wurden mithilfe der Software X-tile [24] optimierte Trennwerte definiert.

Die erhöhte Expression von circEGLN3 und linEGLN3 war in den Kaplan-Meier-Überlebensanalysen bei einer Beobachtungszeit von 165 Monaten mit einem signifikant verbesserten krankheitsspezifischen Überleben assoziiert ($p=0.0001$, Logrank-Test; Abb. 7), obwohl die Expression dieser beiden RNAs im Tumorgewebe deutlich höher war als im Normalgewebe (Abb. 6). Für circNOX4 und linNOX4 ergaben sich keine signifikanten Assoziationen zum krankheitsspezifischen Überleben. Die Expressionsniveaus von circRHOBTB3 und linRHOBTB3 waren unterschiedlich mit dem krankheitsspezifischen Überleben assoziiert (Abb. 7). Eine erhöhte Expression von circRHOBTB3 war mit einer signifikanten Verlängerung des krankheitsspezifischen Überlebens assoziiert ($p=0.031$, Logrank-test), die Erhöhung der Expression von linRHOBTB3 hingegen mit einer signifikanten Verkürzung ($p=0.026$, Logrank-Test). Diese umgekehrten Assoziationen der beiden RNAs zeigten sich auch für die beiden sekundären Endpunkte (*Supplement Figure S2A-B [15]*). Die Hazard Ratio der univariaten Cox-Regression bestätigte dieses Ergebnis unter Anwendung der berechneten Trennwerte für alle Endpunkte.

Ein multivariates Vorhersage-Modell wurde mit allen circRNAs und linRNAs durch multivariate Cox-Regression mittels Rückwärtselimination (Einschluss: $p<0.050$, Ausschluss: $p>0.100$) erstellt. In diesem reduzierten RNA-Modell verblieben lediglich circEGLN3, circRHOBTB3 und linRHOBTB3 für alle definierten Endpunkte. Die C-Statistik-Daten der prognostischen Indices der Cox-Regression als Werte für die prädiktive Voraussagekraft für das Gesamt-RNA-Modell (alle RNAs) und das reduzierte RNA-Modell (circEGLN3, circRHOBTB3 und linRHOBTB3) wiesen dabei keine wesentlichen Unterschiede für die drei Endpunkte auf (Gesamt-RNA-Modell vs. reduziertes RNA-Modell, krankheitsspezifisches Überleben: 0.730 vs. 0.726, $p=0.863$;

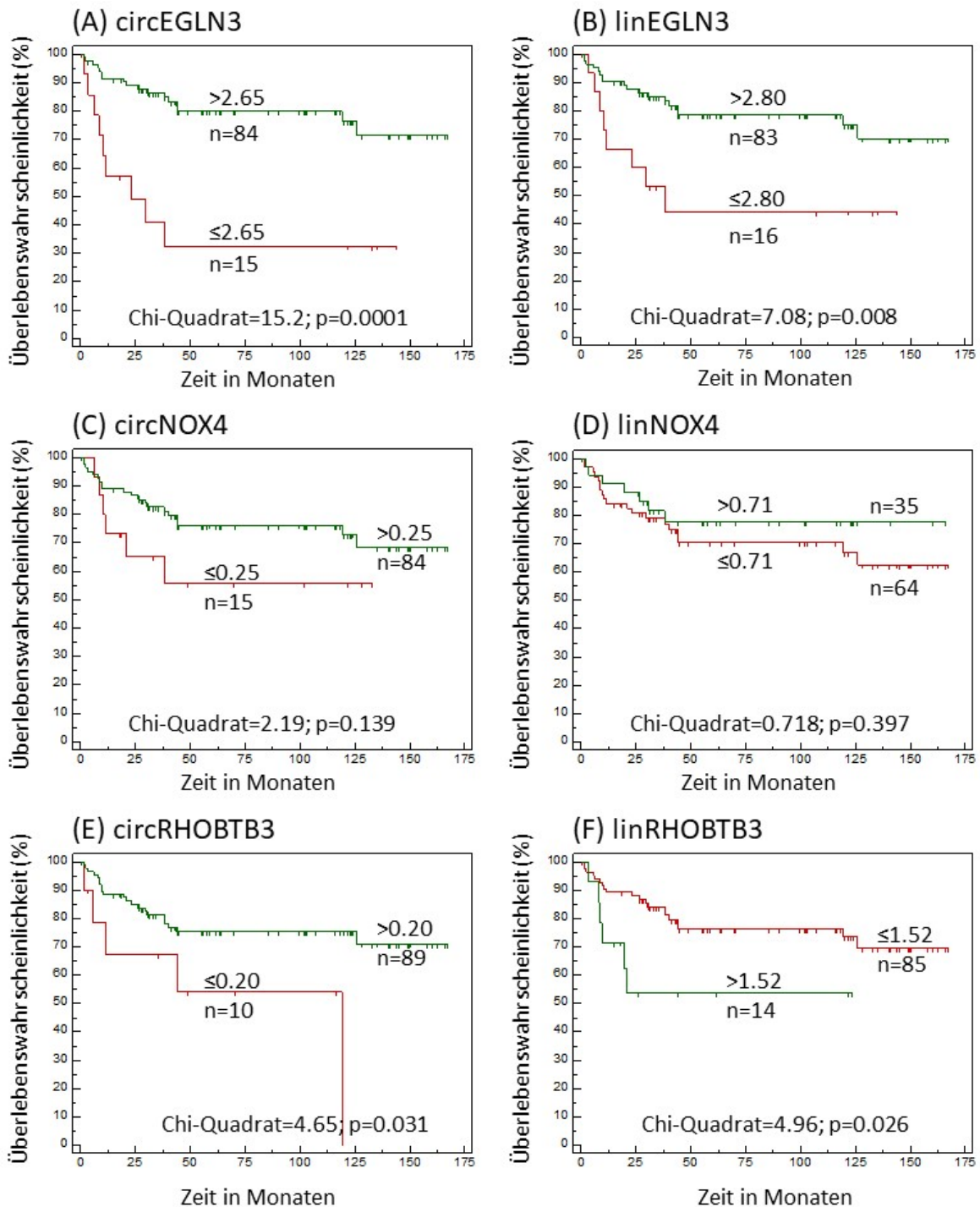


Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurven

Krankheitsspezifisches Überleben in Abhängigkeit der Expression von circRNAs und linearen RNAs. Die Ermittlung der Trennwerte erfolgte mit dem Programm X-tile [24]. Grüne Kurven bilden hier Patienten ab, deren Expression oberhalb des Trennwertes lag, rote Kurven eine Expression unterhalb des Trennwertes. Die p-Werte wurden mit dem Logrank-Test berechnet. Darstellung übersetzt und entnommen aus der zugrundeliegenden Originalpublikation [15].

rezidivfreies Überleben: 0.764 vs. 0.735, $p=0.478$; Gesamt-Überleben: 0.741 vs. 0.738, $p=0.897$, Angabe als AUC in der ROC-Analyse). Daher wurde das reduzierte RNA-Modell für die weitere Auswertung der Endpunkte verwendet und wird im Folgenden als RNA-Signatur bezeichnet.

7.6. Verbesserung der prognostischen Vorhersagekraft durch ein circRNA-basiertes klinisch-genomisches Modell

Bisher gelten klinisch-pathologische Kenngrößen als Goldstandard für die Vorhersage des krankheitsspezifischen, rezidivfreien und Gesamtüberlebens nach der operativen Tumorentfernung. Hierfür werden üblicherweise die Daten zur Tumorgröße, zum TNM-Stadium, zum Fuhrman-Grad und zum Tumorbefall des chirurgischen Absetzungsrandes (R-Status) herangezogen.

Auch in unseren Proben bestätigten sich diese Variablen als signifikante Prädiktoren für die drei Endpunkte sowohl in den Kaplan-Meier-Analysen als auch anhand der univariaten Cox-Regression (*Supplement Figures S4A-C* und *Table 8* [15]). Hierfür wurden die Variablen wie folgt dichotomisiert: Tumor-Stadium I+II vs. III+IV, Fuhrman-Grad 1+2 vs. 3+4, R-Status R0 vs. R1, Tumorgröße <7 cm vs. ≥ 7 cm. Die vier klinisch-pathologischen Variablen wurden kombiniert für die folgenden Auswertungen verwendet und als klinisches Modell bezeichnet.

Weiterhin ließ sich für diese Patientenkohorte feststellen, dass die klinischen Variablen Alter, Geschlecht und Art der gewählten Operation (radikale vs. partielle Nephrektomie) keinen signifikanten Zusammenhang mit den Überlebensendpunkten aufwiesen.

Für die beiden Modelle – klinisches Modell und RNA-Signatur – wurden ROC-Kurven basierend auf den prognostischen Indices der Cox-Regression erstellt. Die jeweiligen Flächen unter der Kurve waren statistisch nicht signifikant unterschiedlich (klinisches Modell vs. RNA-Signatur, krankheitsspezifisches Überleben: 0.779 vs. 0.726, $p=0.452$; rezidivfreies Überleben: 0.718 vs. 0.735, $p=0.837$; Gesamtüberleben: 0.657 vs. 0.738, $p=0.268$).

Eine weitere Vergleichsmöglichkeit stellt die Entscheidungskurven-Analyse dar, in der die prognostische Präzision der Modelle verglichen wird [33]. Diese Methodik gilt als empfindlicher als die C-Statistik [34]. Bei dieser Berechnung ergab sich ein Vorteil der RNA-Signatur gegenüber dem klinischen Modell für alle Endpunkte (Abb. 8).

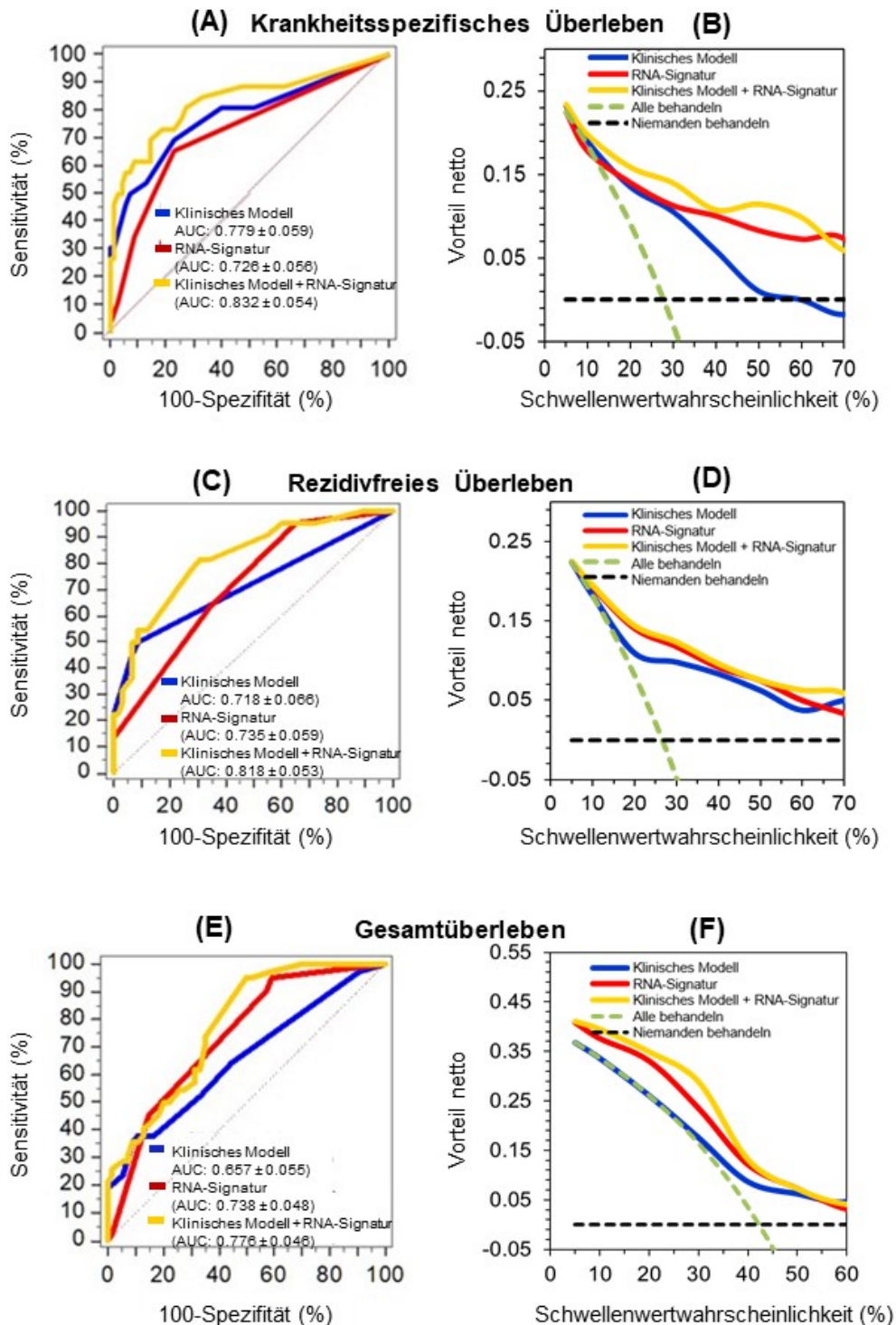


Abbildung 8: ROC-Kurven und Entscheidungskurvenanalyse

Abgebildet sind die drei Endpunkte krankheitsspezifisches, rezidivfreies und Gesamtüberleben. (A), (C) und (E) zeigen die C-Statistik-Kurven der drei prognostischen Modelle (klinisches Modell, RNA-Signatur, Gesamtmodell; siehe Appendix Tabelle 2) für die drei Endpunkte. (B), (D) und (F) zeigen die dazugehörigen Entscheidungskurven [33]. Darstellung übersetzt und entnommen aus der zugrundeliegenden Originalpublikation [15].

Wesentlich ist jedoch, dass sich der prognostische Index und damit die prognostische Präzision (C-Statistik und Entscheidungskurve) durch die Kombination des klinischen Modells mit der RNA-Signatur verbessert (Abb. 8E und F). Im Folgenden wird die Kombination beider Modelle als Gesamtmodell bezeichnet.

Die Hazard Ratio der multivariaten proportionalen Regression nach Cox bestätigten die Unabhängigkeit der Variablen des Gesamtmodells in Bezug auf die Vorhersage der Endpunkte. Auch nach Anwendung der Rückwärts-Elimination waren die verbleibenden Variablen unabhängig, im Folgenden als reduziertes Gesamtmodell bezeichnet (Appendix Tabelle 2).

Für dieses reduzierte Gesamtmodell nach Rückwärts-Elimination gab es keine signifikante Abnahme der prognostischen Vorhersagekraft (Gesamtmodell vs. reduziertes Gesamtmodell, krankheitsspezifisches Überleben: 0.832 vs. 0.821, $p=0.439$; rezidivfreies Überleben: 0.818 vs. 0.816, $p=0.740$; Gesamtüberleben: 0.776 vs. 0.768, $p=0.529$, Angabe als AUC in der ROC-Analyse).

Die berechnete Signifikanz des Gesamtmodells und des reduzierten Gesamtmodells wurden durch internes *Bootstrapping* bestätigt.

Des Weiteren wurde das Akaike-Informationskriterium angewendet, um das Modell zu beurteilen [23]. Auch hier bestätigte sich eine Verbesserung des klinischen Modells durch den Einschluss der RNA-Signatur. Die mit dem Akaike-Informationskriterium errechneten normalisierten Wahrscheinlichkeiten waren für das reduzierte Gesamtmodell (Kombination von vier klinischen Variablen mit der RNA-Signatur) für alle frei Endpunkte im Vergleich zum klinischen Modell wesentlich höher (krankheitsspezifisches Überleben: 0.886, rezidivfreies Überleben: 0.759, Gesamtüberleben: 0.991).

7.7. *In silico*-Analyse von circRNA-miRNA-Gen Interaktionen

Für die Analyse wurden zunächst miRNAs identifiziert, die mögliche Bindungsstellen mit den drei circRNAs circEGLN3, circNOX4 und circRHOBTB3 aufweisen. Für die Vorhersage wurde das Web-Tool CirInteractome genutzt, welches auf der Datenbank TargetScan beruht [27]. Die miRNAs wurden nach ihrem TargetScan *context+* score geordnet. Anschließend wurden die fünf miRNAs mit dem niedrigsten *context+* score (<-0.19) für jede circRNA ausgewählt. Für die anschließenden potenziellen miRNA-Gen-Interaktionen wurden mit Hilfe der Datenbanken miRDB [26] und TargetScan [27] entsprechende Gene für die gewählten miRNAs identifiziert ((Trennwerte *Target Score*

>90 (miRDB) und *total context++ score* <-0.5 (TargetScan)). In Abb. 9 sind die möglichen Interaktionen für die drei circRNAs dargestellt. Es wurden nur miRNA-Gen-Interaktionen abgebildet, die sowohl in der Datenbank miRDB als auch der Datenbank TargetScan gelistet waren.

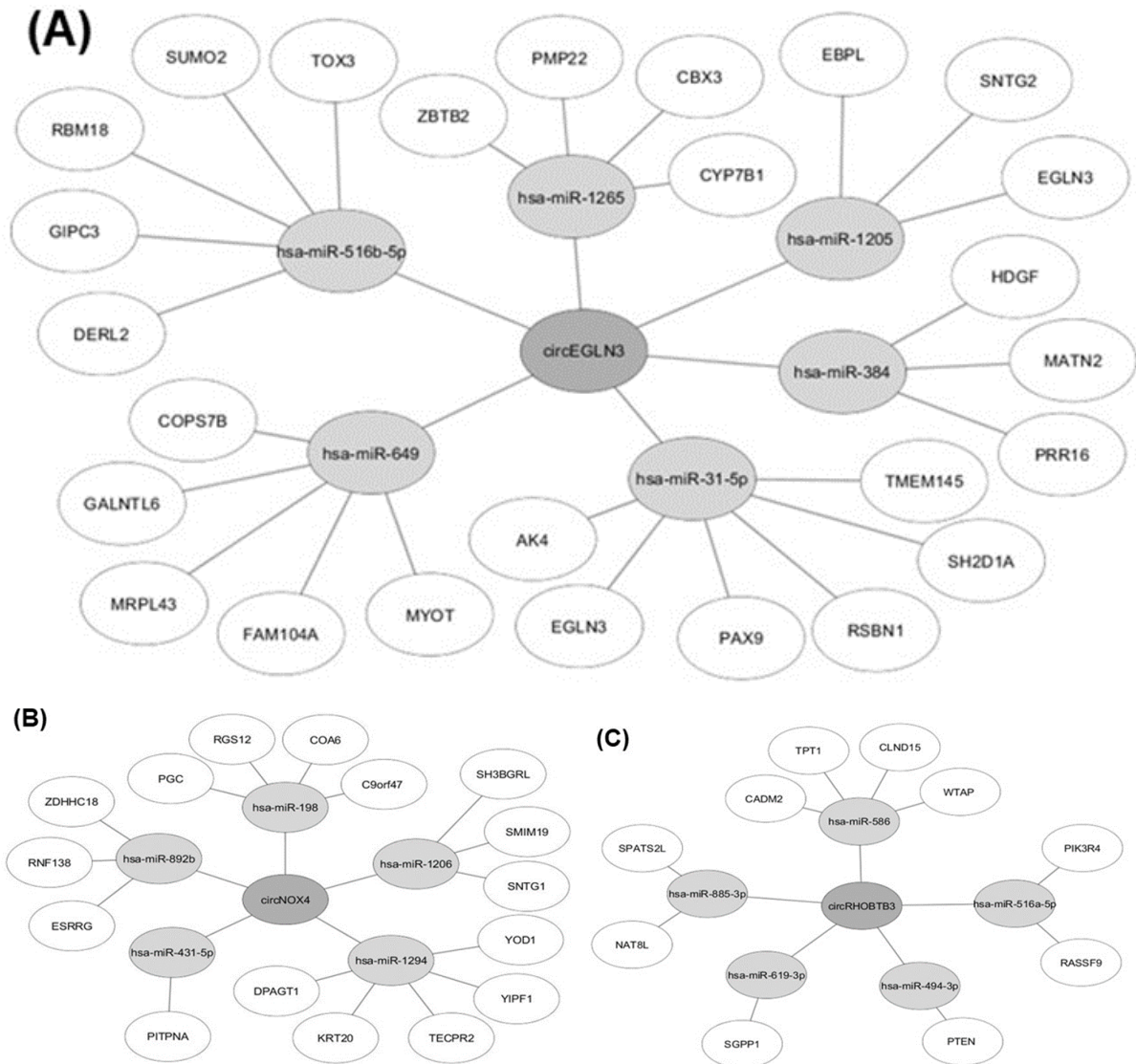


Abbildung 9: CircRNA-miRNA-Gen Netzwerk

Die Netzwerke wurden mittels *in silico*-Analyse für (A) circEGLN3, (B) circNOX4 und (C) circRHOBTB3 ermittelt. Darstellung der zugrundeliegenden Originalpublikation entnommen [15].

8. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde in einem Mehrschritt-Prozess das prognostische Potenzial von drei circRNAs im klarzelligen Nierenzellkarzinom untersucht. Das Vorgehen umfasste zunächst die (I) genomweite Identifikation von differenziell exprimierten circRNAs mittels Microarray. Anschließend erfolgten die (II) experimentelle Validierung der Zirkularität und der differentiellen Expression von drei ausgewählten circRNAs und die (III) Evaluation des diagnostischen und prognostischen Potenzials dieser circRNAs im Vergleich und in Kombination mit konventionellen klinisch-pathologischen Variablen.

Seit ihrer Erstbeschreibung als funktionell bedeutsame zelluläre Strukturen im Jahr 2012 wuchs das wissenschaftliche Interesse an circRNAs stetig [6]. Einen besonderen Schwerpunkt bildete hierbei die Erforschung des Einflusses von circRNAs auf die Karzinogenese verschiedener Organe und der Einsatz der circRNAs als potenzielle Biomarker.

Durch genomweite Analysen auf Grundlage von Microarray-Analysen oder RNA-Sequenzierung wurden circRNA-Expressionsprofile bereits in zahlreichen Tumorgeweben und -zellen ermittelt (Übersicht in [9, 35]).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Analyse des Expressionsprofils mittels Microarray-Technologie durch die Firma ArrayStar Inc. (ArrayStar, Rockville, USA) durchgeführt. Microarray-Analysen gelten als zuverlässige und effektive Instrumente zur Erstellung von circRNA-Profilen [36]. Aufgrund der spezifischen Sonden können nur circRNAs detektiert werden, die bereits vorher mithilfe von RNA-Sequenzierung identifiziert wurden. ArrayStar hat hierfür eine Datenbank mit 13.617 circRNAs auf Grundlage von hochrangig publizierten Studien erstellt [7, 8, 32]. In den resultierenden circRNA-Profilen bleiben einzelne circRNAs somit unter Umständen unerkannt, jedoch sind die Ergebnisse im Vergleich zu RNA-Sequenzierungen deutlich verlässlicher und besser standardisiert [36, 37]. Zusätzlich kann die Zuverlässigkeit des circRNA-Profiles mit der Anzahl verwendeter Gewebeproben im Microarray erhöht werden. In dieser Studie wurden sieben gepaarte Proben verwendet, im Gegensatz dazu wurden in bisher veröffentlichten vergleichbaren Studien lediglich drei gepaarte Proben analysiert [12, 13].

Andere Studien griffen auf Daten der *Gene Expression Omnibus* (GEO) Datenbank zurück [38, 39]. Diese Datenbank stellt genomische Datensätze basierend auf Microarray-Analysen und Sequenzierungen öffentlich zur Verfügung. Zukünftig wird

dies eine wertvolle Ressource zur Analyse großer Datensätze sein und somit auch die Verlässlichkeit der Ergebnisse erhöhen. Zu diesem frühen Zeitpunkt der circRNA-Forschung ist jedoch nur ein Microarray-Datensatz basierend auf vier gepaarten Gewebeproben für primär nicht-metastasierte circRNAs im Nierenzellkarzinom verfügbar (GSE100186, Stand 01.02.2020). Von den in diesem Datensatz aufgelisteten 250 differenziell exprimierten circRNAs ($\text{Log}_2 \text{FC} > |0.3|$, $p < 0.025$) wird circEGLN3 mit einer erhöhten Expression im Tumorgewebe ($\text{Log}_2 \text{FC} 2.36$, $p = 0.021$) aufgeführt, circNOX4 und circRHOBTB3 sind nicht aufgelistet.

Andere Studien, die seit der Publikation unserer Arbeit [15] veröffentlicht wurden, nehmen eine funktionelle Relevanz der untersuchten circRNA im Nierenzellkarzinom aufgrund von bereits veröffentlichter Literatur zu anderen Tumorentitäten an [20, 40-42].

Die vorliegende Arbeit stellt somit noch immer aufgrund der Verwendung sieben gepaarter Proben in der Microarray-Analyse eine deutlich zuverlässigere Erfassung des circRNA-Profiles im Nierenzellkarzinoms dar als sonstige bisher veröffentlichte Studien.

Aus dem sich ergebenden circRNA-Profil erfolgte als zweiter Teil dieser Arbeit die Auswahl und die technische Validierung von drei circRNAs.

Als Auswahlkriterien wurden die bioinformatischen Kriterien der Microarraydaten berücksichtigt und zusätzlich circRNAs bevorzugt, deren Ursprungsgene in der Literatur bereits in Zusammenhang mit dem Nierenzellkarzinom gebracht wurden.

In den Validierungsexperimenten (siehe 6.3.1 – 6.3.4) konnte erfolgreich die Zirkularität der untersuchten RNAs nachgewiesen und die Validität der entwickelten RT-qPCR-Assays bestätigt werden. Eine Kombination dieser Validierungsexperimente wird zum Nachweis der Zirkularität der Produkte als ausreichend erachtet (Übersicht in [9]).

Als nächster Schritt wurde die Expression der drei circRNAs und ihrer korrespondierenden linRNAs in 99 Nierenzellgewebeproben und 85 Nierennormalgewebeproben bestimmt.

Eine erhöhte Expression von EGLN3 (alias PHD3) wurde bereits in früheren Studien mit einem verkürzten Gesamtüberleben bei NZK-Patienten in Verbindung gebracht [43]. Funktionell wurde hierfür eine Einflussnahme auf den *Hypoxia-inducible factor α* (HIF α) und eine verringerte Stabilität des Tumorsuppressors p27 bei erhöhten linEGLN3-Expression beschrieben [28, 44]. Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie

bestätigte linEGLN3 als geeigneten diagnostischen Marker im Blut von Nierenzellkarzinom-Patienten [45].

In dieser Arbeit konnte eine signifikante Erhöhung von circEGLN3 und linEGLN3 im Tumorgewebe gegenüber der Expression im Normalgewebe nachgewiesen werden (Abb. 6). Interessanterweise ist eine erhöhte Expression über einem Trennwert von 2.35 jedoch mit verbessertem krankheitsspezifischen, rezidivfreien und Gesamtüberleben verbunden (Abb. 7). Dieses Ergebnis ist kohärent mit der signifikant umgekehrten Korrelation zwischen Fuhrman-Grad und Höhe des Expressionsniveaus von circEGLN3 und linEGLN3. Hierbei ist eine reduzierte Expression mit zunehmender Entdifferenzierung anzunehmen.

Hinsichtlich der funktionellen Relevanz von circEGLN3 wurden in einer *in silico*-Analyse mögliche circRNA-miRNA-Gen-Interaktionen ermittelt (Abb. 9). Hierbei fällt bei den fünf evaluierten miRNAs besonders die Bindungskapazität von miR-31-5p und miR-1205 an das Ursprungsgen EGLN3 auf. Diese Beziehung könnte Ausdruck für einen selbstregulierenden Mechanismus bei der Entstehung des Nierenzellkarzinoms sein. Diese Hypothese wird durch den Bericht von Li et al. [46] gestützt, welche eine verringerte Expression von miR-31-5p im Nierenzellkarzinom gemessen haben. Im Prostatakarzinom wurde die Regulation von EGLN3 durch miR-1205 bereits beschrieben [47], Studien hierzu im NZK liegen jedoch bisher nicht vor.

Nach der Veröffentlichung der dieser Arbeit zugrundeliegenden Publikation [15] erschien eine Arbeit von Lin et al. [18], die ebenfalls die Expression einer circEGLN3 im Nierenzellkarzinom untersuchten. Es wird die Transkriptvariante hsa_circ_0031594 untersucht, die sich aus zwei der fünf Exons zusammensetzt, aus denen die hier untersuchte hsa_circ_0101692 besteht. Lin et al. [18] beschreiben die Regulation von miR-1299 mittels *sponging* durch hsa_circ_0031594 und nehmen einen onkogenen Effekt über die hierdurch erhöhte Expression von *Interferon regulatory factor 7* (IRF7) an. Zusätzlich wurde der Einfluss der Expression von hsa_circ_0031594 auf das Gesamtüberleben analysiert. Die Auswertung von 80 Patientenproben zeigte ein signifikant kürzere Überlebensdauer bei erhöhter Expression von hsa_circ_0031594 in den Tumorgewebeproben.

Die mögliche Funktion von NOX4 bei der Onkogenese des Nierenzellkarzinoms wurde bereits beschrieben. Es wird angenommen, dass es durch eine erhöhte NOX4-Expression zur vermehrten Akkumulation von HIF α kommt und dadurch das Wachstum und die Invasivität des Nierenzellkarzinoms begünstigt wird [29]. Meitzler

et al. [48] untersuchten die Expression von NOX4 in unterschiedlichen Tumorgewebetypen und fanden im NZK durch Auswertung von Microarraydatensätzen aus der Datenbank *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) ebenfalls eine erhöhte Expression von NOX4.

Entgegen diesen Berichten haben wir eine signifikant verringerte Expression von circNOX4 und auch von linNOX4 in den 99 Tumorgewebeproben im Gegensatz zum Normalgewebe gemessen (Abb. 6). In den weiteren Untersuchungen zeigten die Expressionsniveaus von circNOX4 und linNOX4 keine Assoziation mit der Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf die definierten Endpunkte und waren auch nicht Teil der prognostischen RNA-Signatur. In einer Analyse unserer Arbeitsgruppe wurden Überlebensdaten der TCGA-Datenbank in Abhängigkeit der Expression von linNOX4 ausgewertet (*Supplement Figure S3B* [15]). Diese ergab, dass eine niedrigere Expression von linNOX4 mit einem verbesserten Überleben assoziiert war.

Die in dieser Arbeit ermittelte signifikante und reproduzierbare Reduktion der Expression von NOX4-RNA im NZK-Gewebe widerspricht zwar bisherigen Untersuchungen [29, 48]. Allerdings basieren die Ergebnisse von Gregg et al. [29] auf der NOX4-Expression in NZK-Zelllinien. Meitzler et al. [48] führten zudem keine experimentelle Validierung der TCGA-Datenanalyse durch. Zukünftig werden deshalb weitere Untersuchungen zur Expression von NOX4 im Nierenzellkarzinomgewebe und zu möglichen Einflussfaktoren auf die Expression notwendig sein.

RHOBTB3 nimmt ebenfalls über das Onkogen HIF α Einfluss auf die Entstehung des Nierenzellkarzinoms. Konkret wird durch RHOBTB3 die Ubiquitinierung und somit der Abbau von HIF α reguliert. Bei verminderter Expression von RHOBTB3 kommt es zu einer HIF α -Akkumulation, die die Nierenzellkarzinomentstehung begünstigt [30]. Bisher gibt es keine Studien zur Regulation von circRHOBTB3 im NZK, allerdings haben Ning et al. [10] in einer Studie eine verringerte Expression von circRHOBTB3 im Ovarialkarzinom bestimmt.

In dieser Arbeit konnte eine signifikante Reduktion von circRHOBTB3 und linRHOBTB3 im Tumorgewebe nachgewiesen werden (Abb. 6). Bezüglich der Überlebensprognosen in Abhängigkeit vom Expressionsniveau ergab sich interessanterweise ein umgekehrter Zusammenhang zwischen circRHOBTB3 und linRHOBTB3. Eine Erhöhung über den gesetzten Trennwert ergab für circRHOBTB3 eine verbesserte Überlebenswahrscheinlichkeit, während ein erhöhter Wert von linRHOBTB3 bei vergleichbarer Gruppengröße zu einer signifikanten Reduktion der

Überlebensdauer für alle drei Endpunkte führte (Abb. 7). Diese unterschiedlichen Überlebensendenzen könnten Ausdruck für verschiedene Regulationsmechanismen von circRNAs und linRNAs bei der Karzinogenese und dem Tumorprogress sein. Voneinander unabhängige Regulationen von circRNA und linRNA desselben Ursprungsgens wurden unter anderem im Prostatakarzinom berichtet [49]. Eine mögliche Erklärung für den Zusammenhang zwischen linRHOBTB3-Expression und Überlebensprognose könnte ebenfalls in einer Veränderung des Expressionsprofils bei zunehmender Entdifferenzierung liegen. Die Assoziation zwischen höherem TNM-Stadium und vermehrter linRHOBTB3-Expression zeigte eine Tendenz in diese Richtung ($p=0.051$) und sollte in zukünftigen Untersuchungen Beachtung finden.

CircRHOBTB3 und linRHOBTB3 wurden gemeinsam mit circEGLN3 in das RNA-Modell der Prognoseparameter für die drei Endpunkte einbezogen.

Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit untersuchte die Expression von circRHOBTB3 im Magenkarzinom und den Einfluss auf miR-654-3p. Hierbei konnte gezeigt werden, dass circRHOBTB3 im Magenkarzinom ebenfalls geringer exprimiert ist und über das fehlende *Sponging* von miR-654-3p die Expression des Tumorsuppressors p21 reduziert wird [50]. Ein ähnlicher Mechanismus kann für die circRHOBTB3/miR-494-3p/PTEN-Achse aus der *in silico*-Analyse dieser Arbeit angenommen werden (Abb. 9). Für das hepatozelluläre Karzinom und das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom wurden bereits erhöhte miR-494-3p-Expressionen und die daraus folgende verringerte Expression von PTEN beschrieben [51, 52]. Um die möglichen regulatorischen Funktionen und funktionelle Relevanz der circRNAs über die *in silico*-Analyse hinaus zu beurteilen werden in Zukunft weiterführende Experimente benötigt.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde das prognostische Potential dieser neu beschriebenen circRNAs im Nierenzellkarzinom evaluiert.

Auf Grundlage von klinischen Studien und retrospektiven multivariaten Analysen wurden zahlreiche klinisch-pathologische Modelle entwickelt, die eine Einteilung in die Prognosegruppen gut, intermediär und schlecht zulassen (Übersicht in [5]). Mit einem wachsenden Verständnis der Tumorbilogie und Subtypisierung des Nierenzellkarzinoms ist die Erweiterung der prognostischen Modelle um molekulare Biomarker jedoch notwendig, um den Therapiestandard auch zukünftig verbessern zu können.

Es wurden bereits zahlreiche Arbeiten zu molekularen und genomischen Biomarkern im Nierenzellkarzinom veröffentlicht. In der dieser Arbeit zugrunde liegenden

Publikation [15] wurde jedoch erstmals eine umfassende Analyse der neuen circRNA-Marker im Nierenzellkarzinom durchgeführt und mit diesen ein klinisch-genomisches Modell mit verbesserter prognostischer Aussagekraft erstellt.

Die Bedeutung der RNAs in diesem Modell wird dadurch gestützt, dass circEGLN3, circRHOBTB3 und linRHOBTB3 auch in Kombination mit den klinischen Variablen nach Rückwärtselimination als unabhängige Variable in dem Modell verbleiben. Die Ergebnisse der C-Statistik, der Entscheidungskurven-Analyse, des internen *Bootstrap*-Verfahrens und des Akaike-Informationskriteriums belegten die verbesserte Vorhersagekraft des neuen kombinierten Modells. Insbesondere die Entscheidungskurven-Analyse wird als verlässliches Bewertungskriterium eines prognostischen Modells empfohlen [33].

Der explorative Ansatz dieser Arbeit ist jedoch mit einigen Limitationen verbunden. Die Auswahl der Patienten erfolgte ausschließlich retrospektiv und basierte im Wesentlichen auf der Verfügbarkeit geeigneten Gewebematerials. Durch eine anfängliche Fallzahlberechnung ($\alpha=5\%$, $\beta=80\%$) konnten Fehler erster und zweiter Art, jedoch weitgehend ausgeschlossen werden. Ferner wurde zwar die Rolle als prognostischer Marker exploriert, die Untersuchung möglicher molekularer Mechanismen beschränkte sich jedoch auf *in silico*-Analysen. Zusätzlich fehlt eine externe Validierung der Ergebnisse, welche die positive interne Validierung der vorliegenden Studie durch *Bootstrapping* und das Akaike-Informationskriterium in zukünftigen Untersuchungen bestätigen sollten.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde die Grundlage für einen translationalen Forschungsansatz geschaffen. In einem künftigen Projekt können etablierte, in ihrer prognostischen Aussagekraft bestätigte circRNAs in einem größeren Patientenkollektiv prospektiv untersucht werden. Des Weiteren wurden aussichtsreiche Ansatzpunkte zur Erforschung der funktionellen Relevanz von circRNAs in der Tumorbologie des klarzelliges Nierenzellkarzinoms aufgedeckt.

9. Literaturverzeichnis

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
2. Shuch B, Amin A, Armstrong AJ, Eble JN, Ficarra V, Lopez-Beltran A, Martignoni G, Rini BI, Kutikov A. Understanding pathologic variants of renal cell carcinoma: distilling therapeutic opportunities from biologic complexity. *Eur Urol.* 2015;67(1):85-97.
3. Stadler WM. Targeted agents for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Cancer.* 2005;104(11):2323-33.
4. Dabestani S, Marconi L, Kuusk T, Bex A. Follow-up after curative treatment of localised renal cell carcinoma. *World J Urol.* 2018;36(12):1953-9.
5. Klatte T, Rossi SH, Stewart GD. Prognostic factors and prognostic models for renal cell carcinoma: a literature review. *World J Urol.* 2018;36(12):1943-52.
6. Salzman J, Gawad C, Wang PL, Lacayo N, Brown PO. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types. *PLoS One.* 2012;7(2):e30733.
7. Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, Torti F, Krueger J, Rybak A, Maier L, Mackowiak SD, Gregersen LH, Munschauer M, Loewer A, Ziebold U, Landthaler M, Kocks C, le Noble F, Rajewsky N. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature.* 2013;495(7441):333-8.
8. Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, Slevin MK, Burd CE, Liu J, Marzluff WF, Sharpless NE. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA.* 2013;19(2):141-57.
9. Franz A, Rabien A, Stephan C, Ralla B, Fuchs S, Jung K, Fendler A. Circular RNAs: a new class of biomarkers as a rising interest in laboratory medicine. *Clin Chem Lab Med.* 2018;56(12):1992-2003.
10. Ning L, Long B, Zhang W, Yu M, Wang S, Cao D, Yang J, Shen K, Huang Y, Lang J. Circular RNA profiling reveals circEXOC6B and circN4BP2L2 as novel prognostic biomarkers in epithelial ovarian cancer. *Int J Oncol.* 2018;53(6):2637-46.

11. Li Z, Chen Z, Hu G, Zhang Y, Feng Y, Jiang Y, Wang J. Profiling and integrated analysis of differentially expressed circRNAs as novel biomarkers for breast cancer. *J Cell Physiol.* 2020; doi: 10.1002/jcp.29449. [Epub ahead of print].
12. Xue D, Wang H, Chen Y, Shen D, Lu J, Wang M, Zebibula A, Xu L, Wu H, Li G, Xia L. Circ-AKT3 inhibits clear cell renal cell carcinoma metastasis via altering miR-296-3p/E-cadherin signals. *Mol Cancer.* 2019;18(1):151.
13. Zhou B, Zheng P, Li Z, Li H, Wang X, Shi Z, Han Q. CircPCNXL2 sponges miR-153 to promote the proliferation and invasion of renal cancer cells through upregulating ZEB2. *Cell Cycle.* 2018;17(23):2644-54.
14. Wang K, Sun Y, Tao W, Fei X, Chang C. Androgen receptor (AR) promotes clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) migration and invasion via altering the circHIAT1/miR-195-5p/29a-3p/29c-3p/CDC42 signals. *Cancer Lett.* 2017;394:1-12.
15. Franz A, Ralla B, Weickmann S, Jung M, Rochow H, Stephan C, Erbersdobler A, Kilic E, Fendler A, Jung K. Circular RNAs in clear cell renal cell carcinoma: Their microarray-based identification, analytical validation, and potential use in a clinico-genomic model to improve prognostic accuracy. *Cancers (Basel).* 2019;11(10):1473.
16. Huang Y, Zhang Y, Jia L, Liu C, Xu F. Circular RNA ABCB10 promotes tumor progression and correlates with pejorative prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *Int J Biol Markers.* 2019;34(2):176-83.
17. Wang G, Xue W, Jian W, Liu P, Wang Z, Wang C, Li H, Yu Y, Zhang D, Zhang C. The effect of Hsa_circ_0001451 in clear cell renal cell carcinoma cells and its relationship with clinicopathological features. *J Cancer.* 2018;9(18):3269-77.
18. Lin L, Cai J. Circular RNA circ-EGLN3 promotes renal cell carcinoma proliferation and aggressiveness via miR-1299-mediated IRF7 activation. *J Cell Biochem.* 2020; doi: 10.1002/jcb.29620. [Epub ahead of print].
19. Chen Z, Xiao K, Chen S, Huang Z, Ye Y, Chen T. Circular RNA hsa_circ_001895 serves as a sponge of microRNA-296-5p to promote clear cell renal cell carcinoma progression by regulating SOX12. *Cancer Sci.* 2019; doi: 10.1111/cas.14261. [Epub ahead of print].
20. Chen Q, Liu T, Bao Y, Zhao T, Wang J, Wang H, Wang A, Gan X, Wu Z, Wang L. CircRNA cRAPGEF5 inhibits the growth and metastasis of renal cell carcinoma via the miR-27a-3p/TXNIP pathway. *Cancer Lett.* 2020;469:68-77.

21. Bustin SA, Wittwer CT. MIQE: A Step Toward More Robust and Reproducible Quantitative PCR. *Clin Chem*. 2017;63(9):1537-8.
22. Jung M, Ramankulov A, Roigas J, Johannsen M, Ringsdorf M, Kristiansen G, Jung K. In search of suitable reference genes for gene expression studies of human renal cell carcinoma by real-time PCR. *BMC Mol Biol*. 2007;8:47.
23. Wagenmakers EJ, Farrell S. AIC model selection using Akaike weights. *Psychon Bull Rev*. 2004;11(1):192-6.
24. Camp RL, Dolled-Filhart M, Rimm DL. X-tile: a new bio-informatics tool for biomarker assessment and outcome-based cut-point optimization. *Clin Cancer Res*. 2004;10(21):7252-9.
25. Dudekula DB, Panda AC, Grammatikakis I, De S, Abdelmohsen K, Gorospe M. CircInteractome: A web tool for exploring circular RNAs and their interacting proteins and microRNAs. *RNA Biol*. 2016;13(1):34-42.
26. Wong N, Wang X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(Database issue):D146-52.
27. Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife*. 2015;4:e05005.
28. Hogel H, Miikkulainen P, Bino L, Jaakkola PM. Hypoxia inducible prolyl hydroxylase PHD3 maintains carcinoma cell growth by decreasing the stability of p27. *Mol Cancer*. 2015;14:143.
29. Gregg JL, Turner RM, Chang G, Joshi D, Zhan Y, Chen L, Maranchie JK. NADPH oxidase NOX4 supports renal tumorigenesis by promoting the expression and nuclear accumulation of HIF2alpha. *Cancer Res*. 2014;74(13):3501-11.
30. Zhang CS, Liu Q, Li M, Lin SY, Peng Y, Wu D, Li TY, Fu Q, Jia W, Wang X, Ma T, Zong Y, Cui J, Pu C, Lian G, Guo H, Ye Z, Lin SC. RHOBTB3 promotes proteasomal degradation of HIFalpha through facilitating hydroxylation and suppresses the Warburg effect. *Cell Res*. 2015;25(9):1025-42.
31. Glazar P, Papavasileiou P, Rajewsky N. circBase: a database for circular RNAs. *RNA*. 2014;20(11):1666-70.
32. Salzman J, Chen RE, Olsen MN, Wang PL, Brown PO. Cell-type specific features of circular RNA expression. *PLoS Genet*. 2013;9(9):e1003777.
33. Vickers AJ, Elkin EB. Decision curve analysis: a novel method for evaluating prediction models. *Med Decis Making*. 2006;26(6):565-74.

34. Steyerberg EW, Pencina MJ, Lingsma HF, Kattan MW, Vickers AJ, Van Calster B. Assessing the incremental value of diagnostic and prognostic markers: a review and illustration. *Eur J Clin Invest.* 2012;42(2):216-28.
35. Lei B, Tian Z, Fan W, Ni B. Circular RNA: a novel biomarker and therapeutic target for human cancers. *Int J Med Sci.* 2019;16(2):292-301.
36. Li S, Teng S, Xu J, Su G, Zhang Y, Zhao J, Zhang S, Wang H, Qin W, Lu ZJ, Guo Y, Zhu Q, Wang D. Microarray is an efficient tool for circRNA profiling. *Brief Bioinform.* 2019;20(4):1420-33.
37. Hansen TB, Veno MT, Damgaard CK, Kjems J. Comparison of circular RNA prediction tools. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(6):e58.
38. Zhang D, Yang XJ, Luo QD, Fu DL, Li ZL, Zhang P, Chong T. Down-regulation of circular RNA_000926 attenuates renal cell carcinoma progression through miRNA-411-dependent CDH2 inhibition. *Am J Pathol.* 2019;189(12):2469-86.
39. Ma C, Qin J, Zhang J, Wang X, Wu D, Li X. Construction and analysis of circular RNA molecular regulatory networks in clear cell renal cell carcinoma. *Mol Med Rep.* 2020;21(1):141-50.
40. Dong Z, Liu Y, Wang Q, Wang H, Ji J, Huang T, Khanal A, Niu H, Cao Y. The circular RNA-NRIP1 plays oncogenic roles by targeting microRNA-505 in the renal carcinoma cell lines. *J Cell Biochem.* 2020;121(3):2236-46.
41. Chen T, Yu Q, Shao S, Guo L. Circular RNA circFNDC3B protects renal carcinoma by miR-99a downregulation. *J Cell Physiol.* 2019; doi: 10.1002/jcp.29316. [Epub ahead of print].
42. Xiong Y, Zhang J, Song C. CircRNA ZNF609 functions as a competitive endogenous RNA to regulate FOXP4 expression by sponging miR-138-5p in renal carcinoma. *J Cell Physiol.* 2019;234(7):10646-54.
43. Garcia-Donas J, Leandro-Garcia LJ, Gonzalez Del Alba A, Morente M, Alemany I, Esteban E, Arranz JA, Climent MA, Gallardo E, Castellano DE, Bellmunt J, Mellado B, Puente J, Moreno F, Font A, Hernando S, Robledo M, Rodriguez-Antona C. Prospective study assessing hypoxia-related proteins as markers for the outcome of treatment with sunitinib in advanced clear-cell renal cell carcinoma. *Ann Oncol.* 2013;24(9):2409-14.
44. Miikkulainen P, Hogel H, Seyednasrollah F, Rantanen K, Elo LL, Jaakkola PM. Hypoxia-inducible factor (HIF)-prolyl hydroxylase 3 (PHD3) maintains high HIF2A

- mRNA levels in clear cell renal cell carcinoma. *J Biol Chem.* 2019; doi: 10.1074/jbc.RA118.004902. [Epub ahead of print].
45. Kim KH, Lee HH, Yoon YE, Na JC, Kim KS, Han WK. Prolyl hydroxylase-3 is a novel renal cell carcinoma biomarker. *Investig Clin Urol.* 2019;60(6):425-31.
 46. Li Y, Quan J, Chen F, Pan X, Zhuang C, Xiong T, Zhuang C, Li J, Huang X, Ye J, Zhang F, Zhang Z, Gui Y. MiR-31-5p acts as a tumor suppressor in renal cell carcinoma by targeting cyclin-dependent kinase 1 (CDK1). *Biomed Pharmacother.* 2019;111:517-26.
 47. Wang Y, Li X, Liu W, Li B, Chen D, Hu F, Wang L, Liu XM, Cui R, Liu R. MicroRNA-1205, encoded on chromosome 8q24, targets EGLN3 to induce cell growth and contributes to risk of castration-resistant prostate cancer. *Oncogene.* 2019;38(24):4820-34.
 48. Meitzler JL, Konate MM, Doroshov JH. Hydrogen peroxide-producing NADPH oxidases and the promotion of migratory phenotypes in cancer. *Arch Biochem Biophys.* 2019;675:108076.
 49. Chen S, Huang V, Xu X, Livingstone J, Soares F, Jeon J, Zeng Y, Hua JT, Petricca J, Guo H, Wang M, Yousif F, Zhang Y, Donmez N, Ahmed M, Volik S, Lapuk A, Chua MLK, Heisler LE, Foucal A, Fox NS, Fraser M, Bhandari V, Shiah YJ, Guan J, Li J, Orain M, Picard V, Hovington H, Bergeron A, Lacombe L, Fradet Y, Tetu B, Liu S, Feng F, Wu X, Shao YW, Komor MA, Sahinalp C, Collins C, Hoogstrate Y, de Jong M, Fijneman RJA, Fei T, Jenster G, van der Kwast T, Bristow RG, Boutros PC, He HH. Widespread and functional RNA circularization in localized prostate cancer. *Cell.* 2019;176(4):831-43.
 50. Deng G, Mou T, He J, Chen D, Lv D, Liu H, Yu J, Wang S, Li G. Circular RNA circRHOBTB3 acts as a sponge for miR-654-3p inhibiting gastric cancer growth. *J Exp Clin Cancer Res.* 2020;39(1):1.
 51. Lin H, Huang ZP, Liu J, Qiu Y, Tao YP, Wang MC, Yao H, Hou KZ, Gu FM, Xu XF. MiR-494-3p promotes PI3K/AKT pathway hyperactivation and human hepatocellular carcinoma progression by targeting PTEN. *Sci Rep.* 2018;8(1):10461.
 52. Wang J, Chen H, Liao Y, Chen N, Liu T, Zhang H, Zhang H. Expression and clinical evidence of miR-494 and PTEN in non-small cell lung cancer. *Tumour Biol.* 2015;36(9):6965-72.

10. Appendix

Tabelle 1: Eigenschaften der untersuchten Patientenkohorte

Charakteristika	Insgesamt	NZK, nicht metastasiert ^a	NZK, metastasiert ^a	p-Wert ^b
Patienten, Anzahl	99	82	17	
Geschlecht, ♂/♀; Anzahl (%)	30/69	25/57 (30/70)	5/12 (29/70)	1.000
Alter, Jahre, Median (Spanne)	65 (36-87)	65 (36-87)	65 (37-78)	0.982
Patholog. Stadium, Anzahl (%)				
pT1	43	40 (49)	3 (18)	0.004
pT2	8	8 (10)	0 (0)	
pT3	47	34 (41)	13 (76)	
pT4	1	0 (0)	1 (6)	
TNM-Stadium, Anzahl (%) ^c				
I	40	40	-	
II	8	8	-	
III	34	34	-	
IV	17	0	17	
Tumgröße, Median mm (Spanne)	57 (20-220)	50 (20-220)	75 (35-150)	0.029
R-Klassifikation, Anzahl (%)				
R0	85	73 (89)	12 (71)	0.138
R1/2	11	7 (9)	4 (23)	
RX	3	2 (2)	1 (6)	
Fuhrman-Grad, Anzahl (%)				
G1	9	8	1	0.025
G2	68	60	8	
G3	20	12	8	
G4	2	2	0	
Morbidität/Mortalität, Anzahl (%)				
Metastasen	-	22 (27)	-	
Krankheitsspezif. Tod	26 (26)	14 (17)	12 (71)	<0.0001
Tod insgesamt	42 (42)	30 (37)	12 (71)	0.014
Überleben, Monate, Median/Mittelwert (95% CI) ^d				
Krankheitsspezifisch	125 (111-139)	140 (127-153)	27.2 (14.1-40.4)	
Rezidivfrei	-	127 (113-141)	-	
Gesamtüberleben	126 (90.4-166)	160 (103-160)	11.8 (8.2-39.9)	

Abkürzungen: NZK, Nierenzellkarzinom; G, histopathologischer Fuhrman-Grad; pT, pathologische Tumorklassifikation; R, Residualtumor.

Tabelle übersetzt und entnommen aus der zugrundeliegenden Originalpublikation [15].

^a Vor der Operation wurde das Metastasierungsstadium bildmorphologisch überprüft.

^b Errechnet mit dem Fisher Test, Chi-Quadrat Test oder Mann-Whitney Test zwischen beiden Gruppen.

^c Die TNM Stadieneinteilung erfolgte anhand des UICC Klassifikationssystems.

^d Die Überlebensdaten wurden den Kaplan-Meier-Analysen entnommen. Das mediane Überleben (Gesamtüberleben) entspricht dem Zeitpunkt zu dem die Überlebenswahrscheinlichkeit ≤50% beträgt. Für die beiden Endpunkte krankheitsspezifisches Überleben und rezidivfreies Überleben wurde dieser Wert in der Gruppe der nicht-metastasierten NZK nicht erreicht. Daher wurde der Mittelwert der Überlebenszeit (als Areal unter der Überlebenskurve) berechnet.

Tabelle 2: Multivariate proportionale Hazardregression nach Cox der unterschiedlichen Vorhersage-Modelle für die Überlebensendpunkte

Variable ^a	Krankheitsspezifisches Überleben		Rezidivfreies Überleben		Gesamtüberleben	
	HR (95% CI)	p-Wert	HR (95% CI)	p-Wert	HR (95% CI)	p-Wert
<i>RNA-Signatur^{b,c,d}</i>						
circEGLN3	0.24 (0.10–0.57)	0.001	0.53 (0.18–1.03)	0.074	0.49 (0.23–0.95)	0.037
circRHOBTB3	0.26 (0.09–0.73)	0.010	0.14 (0.04–0.49)	0.003	0.15 (0.05–0.49)	0.002
linRHOBTB3	2.57 (0.95–6.90)	0.062	11.1 (2.79–43.8)	0.001	4.46 (1.52–13.0)	0.006
<i>Klinisches Modell</i>						
Tumorstadium gruppiert (III+IV/I+II)	3.54 (1.16–10.8)	0.027	0.79 (0.25–2.48)	0.685	2.02 (0.95–4.27)	0.064
Fuhrman-Grad (3+4/1+2)	2.68 (1.03–7.02)	0.044	13.4 (4.06–44.3)	<0.0001	3.00 (1.32–6.82)	0.009
R-Status (R1/R0)	2.82 (1.05–7.59)	0.040	7.09 (1.75–28.7)	0.006	2.26 (0.91–5.59)	0.078
Tumorgröße (≥7 cm<)	1.10 (0.42–2.87)	0.838	1.03 (0.35–2.97)	0.963	0.99 (0.46–2.14)	0.988
<i>Gesamtmodell (Klinisches Modell + RNA-Signatur)</i>						
Tumorstadium gruppiert (III+IV/I+II)	3.16 (0.93–10.8)	0.066	0.67 (0.19–2.37)	0.536	2.81 (1.23–6.42)	0.014
Fuhrman-Grad (3+4/1+2)	2.04 (0.73–5.74)	0.177	9.98 (2.99–33.4)	0.0002	2.25 (0.99–5.12)	0.053
R-Status (R1 vs. R0)	3.97 (1.28–12.3)	0.017	3.48 (0.76–15.9)	0.109	2.12 (0.87–5.18)	0.099
Tumorgröße (≥7 cm<)	1.16 (0.44–3.11)	0.762	1.22 (0.36–4.13)	0.746	0.76 (0.36–1.64)	0.490
circEGLN3	0.33 (0.13–0.79)	0.014	0.69 (0.22–2.19)	0.532	0.51 (0.24–1.09)	0.084
circRHOBTB3	0.25 (0.08–0.80)	0.019	0.21 (0.05–0.94)	0.041	0.16 (0.05–0.53)	0.003
linRHOBTB3	3.84 (1.35–10.9)	0.012	7.71 (1.55–38.3)	0.013	5.26 (1.74–15.9)	0.003
<i>Reduziertes Gesamtmodell (Klinisches Modell + RNA-Signatur nach Rückwärtselimination)</i>						
Tumorstadium gruppiert (III+IV/I+II)	3.98 (1.32–12.0)	0.014	–	–	2.89 (1.39–5.99)	0.005
Fuhrman-Grad (3+4/1+2)	–	–	8.53 (3.08–23.6)	<0.0001	2.52 (1.15–5.53)	0.021
R-Status (R1 vs. R0)	5.68 (2.09–15.4)	0.0007	3.54 (1.02–12.3)	0.047	–	–
Tumorgröße (≥7 cm<)	–	–	–	–	–	–
circEGLN3	0.28 (0.12–0.68)	0.005	–	–	0.50 (0.24–1.05)	0.067
circRHOBTB3	0.21 (0.07–0.65)	0.007	0.18 (0.04–0.75)	0.018	0.17 (0.05–0.56)	0.004
linRHOBTB3	3.59 (1.28–10.0)	0.015	8.19 (1.81–37.1)	0.006	5.37 (1.80–16.1)	0.003

Abkürzungen: CI, Konfidenzintervall (confidence interval); G, histopathologischer Fuhrman-Grad; HR, Hazard Ratio; R, R-Status.

Tabelle übersetzt und entnommen aus der zugrundeliegenden Originalpublikation [15].

^a Die RNAs wurden mit dem Programm X-tile dichotomisiert [24]. Die sich ergebenden Trennwerte sind in den Fußnoten c, d und e angegeben. ^b Trennwerte für das krankheitsspezifische Überleben: circEGLN3 (2.65), circRHOBTB3 (0.20), linRHOBTB3 (1.52). ^c Trennwerte für das rezidivfreie Überleben: circEGLN3 (2.10), circRHOBTB3 (0.50), linRHOBTB3 (0.72). ^d Trennwerte für das Gesamtüberleben: circEGLN3 (2.73), circRHOBTB3 (0.27), linRHOBTB3 (0.60).

11. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Antonia Franz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Zirkuläre RNAs im klarzelligen Nierenzellkarzinom: Microarray-basierte Identifikation, methodische Validierung und Evaluation als klinische Prognosemarker – Circular RNAs in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Their Microarray-Based Identification, Analytical Validation, and Potential Use in a Clinico-Genomic Model to Improve Prognostic Accuracy“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Ort, Datum

Antonia Franz

12. Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Antonia Franz hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Franz A, Ralla B, Weickmann S, Jung M, Rochow H, Stephan C, Erbersdobler A, Kilic E, Fendler A, Jung K. Circular RNAs in clear cell renal cell carcinoma: Their microarray-based identification, analytical validation, and potential use in a clinico-genomic model to improve prognostic accuracy. *Cancers (Basel)*. 2019;11(10):1473.

Beitrag im Einzelnen:

- Klinische Datenerhebung und -überprüfung, Vervollständigung einer bereits bestehenden Patientendatenbank
- Isolation und Qualitätsprüfung der Gesamt-RNA aus Gewebeproben für die RT-qPCR-Analysen
- Auswertung der Microarraydaten und Auswahl der circRNAs in Kooperation mit der Abteilung Bioinformatik des Berlin Institute of Health, Erstellen der entsprechenden Abbildungen in der Publikation
- Primerdesign und Etablierung der RT-qPCR-Assays nach den MIQE-Richtlinien mit Unterstützung von Frau Sabine Weickmann
- Auswahl geeigneter Tumor- und Normalgewebeproben für die RT-qPCR-Messungen
- Durchführung und Auswertung der Validierungsexperimente mit Ausnahme der der Gelelektrophorese (S. Weickmann) und Erstellen der entsprechenden Abbildungen für die Publikation
- Statistische Berechnung und Auswertung (differenzielle Expression, Kaplan-Meier-Kurven, ROC-Kurven) der Ergebnisse mit der Unterstützung von Prof. Dr. med. Klaus Jung
- *In silico*-Analyse der circRNA-miRNA-Gen-Interaktionen und Erstellen der Abbildung
- Literaturrecherche und Verfassen des Textentwurfs, Abstimmung mit allen Autoren

Ort, Datum

PD Dr. med. Jonas Busch

Klinikstempel

Antonia Franz

13. Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2018** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: "ONCOLOGY" Selected Category Scheme: WoS

Gesamtanzahl: 229 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Citas	Journal Impact Factor	Eigentfactor Score
1	CA-A CANCER JOURNAL FOR CLINICIANS	32,410	223.679	0.077370
2	NATURE REVIEWS CANCER	50,529	51.848	0.074080
3	LANCET ONCOLOGY	48,822	35.386	0.146770
4	Nature Reviews Clinical Oncology	9,626	34.106	0.031890
5	JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY	154,029	28.245	0.281750
6	Cancer Discovery	13,715	26.370	0.064810
7	CANCER CELL	36,056	23.916	0.091050
8	JAMA Oncology	9,488	22.416	0.048340
9	ANNALS OF ONCOLOGY	40,751	14.196	0.103620
10	Journal of Thoracic Oncology	16,601	12.460	0.038810
11	Molecular Cancer	11,626	10.679	0.021350
12	JNCI-Journal of the National Cancer Institute	36,790	10.211	0.051650
13	NEURO-ONCOLOGY	11,858	10.091	0.029150
14	LEUKEMIA	24,555	9.944	0.054750
15	SEMINARS IN CANCER BIOLOGY	6,992	9.658	0.010730
16	CLINICAL CANCER RESEARCH	78,171	8.911	0.134870
17	Trends In Cancer	1,420	8.884	0.006040
18	Journal of Hematology & Oncology	5,366	8.731	0.013620
19	Journal for ImmunoTherapy of Cancer	2,716	8.676	0.011350
20	Cancer Immunology Research	5,420	8.619	0.025380
21	CANCER RESEARCH	130,932	8.378	0.123870
22	CANCER TREATMENT REVIEWS	8,419	8.332	0.016930
23	Blood Cancer Journal	2,247	7.895	0.009060
24	Journal of the National Comprehensive Cancer Network	5,746	7.570	0.019940
25	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-REVIEWS ON CANCER	5,226	6.887	0.008260
26	EUROPEAN JOURNAL OF CANCER	30,731	6.680	0.055220
27	CANCER AND METASTASIS REVIEWS	6,011	6.667	0.006220
28	ONCOGENE	63,249	6.634	0.074600
29	CANCER LETTERS	30,146	6.508	0.043780
30	INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION ONCOLOGY BIOLOGY PHYSICS	45,833	6.203	0.046810
31	Cancers	5,196	6.162	0.011780
32	CANCER	67,408	6.102	0.071820
33	Oncogenesis	2,016	5.995	0.006360
34	Molecular Oncology	5,016	5.962	0.013590
35	Liver Cancer	769	5.944	0.002210

14. Ausgewählte Publikation



Article

Circular RNAs in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Their Microarray-Based Identification, Analytical Validation, and Potential Use in a Clinico-Genomic Model to Improve Prognostic Accuracy

Antonia Franz ^{1,2}, Bernhard Ralla ¹, Sabine Weickmann ¹, Monika Jung ¹, Hannah Rochow ^{1,2}, Carsten Stephan ^{1,2}, Andreas Erbersdobler ³, Ergin Kilic ⁴, Annika Fendler ^{1,2,5,†} and Klaus Jung ^{1,2,*,†}

¹ Department of Urology, Charité—Universitätsmedizin Berlin, 10117 Berlin, Germany; antonia.franz@charite.de (A.F.); bernhard.ralla@charite.de (B.R.); sabine.weickmann@charite.de (S.W.); mchjung94@gmail.com (M.J.); hannah.rochow@charite.de (H.R.); carsten.stephan@charite.de (C.S.)

² Berlin Institute for Urologic Research, 10115 Berlin, Germany

³ Institute of Pathology, University of Rostock, 18055 Rostock, Germany; andreas.erbersdobler@med.uni-rostock.de

⁴ Institute of Pathology, Hospital Leverkusen, 51375 Leverkusen, Germany; e.kilic@pathologie-leverkusen.de

⁵ Max Delbrueck Center for Molecular Medicine in the Helmholtz Association, Cancer Research Program, 13125 Berlin, Germany; annika.fendler@mdc-berlin.de

* Correspondence: klaus.jung@charite.de; Tel.: +49-450-515041

† These authors share senior authorship.

Received: 9 August 2019; Accepted: 23 September 2019; Published: 30 September 2019

Abstract: Circular RNAs (circRNAs) may act as novel cancer biomarkers. However, a genome-wide evaluation of circRNAs in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) has yet to be conducted. Therefore, the objective of this study was to identify and validate circRNAs in ccRCC tissue with a focus to evaluate their potential as prognostic biomarkers. A genome-wide identification of circRNAs in total RNA extracted from ccRCC tissue samples was performed using microarray analysis. Three relevant differentially expressed circRNAs were selected (circEGLN3, circNOX4, and circRHOBTB3), their circular nature was experimentally confirmed, and their expression—along with that of their linear counterparts—was measured in 99 malignant and 85 adjacent normal tissue samples using specifically established RT-qPCR assays. The capacity of circRNAs to discriminate between malignant and adjacent normal tissue samples and their prognostic potential (with the endpoints cancer-specific, recurrence-free, and overall survival) after surgery were estimated by C-statistics, Kaplan-Meier method, univariate and multivariate Cox regression analysis, decision curve analysis, and Akaike and Bayesian information criteria. CircEGLN3 discriminated malignant from normal tissue with 97% accuracy. We generated a prognostic for the three endpoints by multivariate Cox regression analysis that included circEGLN3, circRHOBTB3 and linRHOBTB3. The predictive outcome accuracy of the clinical models based on clinicopathological factors was improved in combination with this circRNA-based signature. Bootstrapping as well as Akaike and Bayesian information criteria confirmed the statistical significance and robustness of the combined models. Limitations of this study include its retrospective nature and the lack of external validation. The study demonstrated the promising potential of circRNAs as diagnostic and particularly prognostic biomarkers in ccRCC patients.

Keywords: clear cell renal cell carcinoma; identification of circular RNAs; experimental validation of circular RNA; diagnostic and prognostic markers; circular RNAs in a clinico-genomic predictive model; cancer-specific survival; recurrence-free survival; overall survival

1. Introduction

Partial and radical nephrectomy is considered the standard of care for patients with localized clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) [1]. Nevertheless, approximately 25% of patients experience recurrence after surgery with poor prognostic outcome within 5 years [2]. Consequently, precise stratification of recurrence risk after nephrectomy is necessary for personalized follow-up and treatment strategies. Existing prognostic models are based on conventional parameters such as tumor stage, grade, size, and resection status [1], all of which offer limited predictive accuracy for clinical outcomes [3]. Moreover, there is a broad consensus that molecular markers have, in addition to their diagnostic potential, the capacity to improve risk assessment when combined with clinicopathological factors [1,4]. At present, there are no recommended prognostic biomarkers in routine clinical use for ccRCC patients [1], though many have been evaluated experimentally [5–10].

In this regard, circular RNAs (circRNAs) are interesting potential novel biomarkers in ccRCC. CircRNAs are single-stranded, covalently closed RNA molecules without 3'- and 5'-ends and the poly(A) tail of linear RNA (linRNA). They were first identified in 2012 and are expressed widely throughout the human genome [11]; previously, they were regarded as transcriptional debris. Meanwhile, numerous studies identified their differential expression patterns in various cancers compared to normal tissue (reviewed in [12]). These expression patterns were found to be generally connected with their diagnostic, prognostic, and predictive potentials, highlighting a possible functional relevance in disease development [13,14].

Since circRNAs are a relatively new topic of scientific interest, the results of circRNA exploration in ccRCC remain limited [15–18]. Three recent reports focused on single circRNAs, which were mainly identified by database search for circRNAs fulfilling specific characteristics [15,16,18]. Only one report used three paired malignant and non-malignant kidney samples in a microarray screening for circRNAs [17]. However, with regard to the prognostic potential of circRNAs, subsequent analyses were restricted on overall survival and did not exceed the univariate Kaplan-Meier analysis. Thus, evaluation of the true prognostic potential of circRNAs in ccRCC based on genome-wide evaluation is of particular interest to apply circRNAs as biomarkers in clinical decision-making. Therefore, this study aimed to: (I) detect genome-wide differential expression patterns of circRNAs in ccRCC tissue using microarray analysis; (II) identify and validate promising circRNA candidates; and (III) evaluate the diagnostic and prognostic potentials of three circRNAs in 99 ccRCC samples and 85 adjacent normal tissue samples. Applying a combined model of both circRNA levels and clinical features, this study demonstrates the potential of circRNAs to improve prognostic value for cancer-specific (CSS), recurrence-free (RFS), and overall survival (OS).

2. Results

2.1. Patient Characteristics and Study Design

The study included ccRCC tumor samples from 99 patients and adjacent normal renal tissue samples from 85 patients undergoing radical or partial nephrectomy between 2003 and 2016 (Table 1). Samples were obtained retrospectively, and sample size was determined by a power-adapted calculation ($\alpha = 5\%$, power = 80%; Supplementary Information S1). The study was performed in three phases (Figure 1): I) the discovery phase to identify differentially expressed circRNAs using a microarray screening approach; II) the analytical validation phase to confirm the molecular characteristics of selected circRNAs and to establish “fit-for-purpose” RT-qPCR assays; and III) the clinical assessment to evaluate the predictive value of these novel markers when applied alone and in combination with conventional clinicopathological factors.

Table 1. Characteristics of the ccRCC patients.

Characteristics	Total	ccRCC, Non-Metastatic ^a	ccRCC, Metastatic ^a	<i>p</i> -value ^b
Patients, no.	99	82	17	
Sex, female/male; n (%)	30/69	25/57 (30/70)	5/12 (29/70)	1.000
Age, yrs, median (range)	65 (36–87)	65 (36–87)	65 (37–78)	0.982
Pathological stage, no. (%)				
pT1	43	40 (49)	3 (18)	0.004
pT2	8	8 (10)	0 (0)	
pT3	47	34 (41)	13 (76)	
pT4	1	0 (0)	1 (6)	
TNM stage grouping, no. (%) ^c				
I	40	40	-	
II	8	8	-	
III	34	34	-	
IV	17	0	17	
Tumor size, median mm (range)	57 (20–220)	50 (20–220)	75 (35–150)	0.029
Surgical margin, no. (%)				
R0	85	73 (89)	12 (71)	0.138
R1/2	11	7 (9)	4 (23)	
Unclassified	3	2 (2)	1 (6)	
Fuhrman grade, no. (%)				
G1	9	8	1	0.025
G2	68	60	8	
G3	20	12	8	
G4	2	2	0	
Events during follow-up, n. (%)				
Metastasis	-	22 (27)	-	
Cancer-specific death	26 (26)	14 (17)	12 (71)	<0.0001
Overall death	42 (42)	30 (37)	12 (71)	0.014
Survival, months, median/mean (95% CI) ^d				
Cancer-specific	125 (111–139)	140 (127–153)	27.2 (14.1–40.4)	
Recurrence-free	-	127 (113–141)	-	
Overall	126 (90.4–166)	160 (103–160)	11.8 (8.2–39.9)	

Abbreviations: ccRCC, clear cell renal cell carcinoma; G, histopathological grading according to Fuhrman; pT, pathological tumor classification; R, surgical margin classification; CI, confidence interval. ^a Imaging was used to assess the presence/non-presence of metastases before surgery. ^b Calculated with Fisher's exact test, Chi-squared test or Mann-Whitney *U* test between the two groups. ^c TNM stage grouping according to UICC classification system. ^d Survival data obtained from the Kaplan-Meier analyses using the software MedCalc. The median survival (overall survival) corresponds to the time at which the survival probability reaches 50% or below. As the cancer-specific survival and recurrence-free survival did not reach this value in the non-metastatic cohort, the mean survival time was calculated (as area under the survival curve in the total follow-up interval) for both groups for comparison purposes.

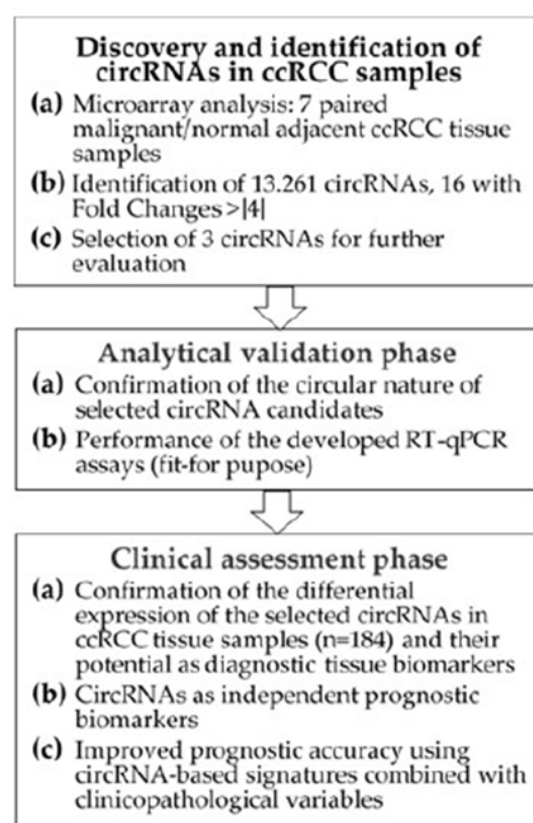


Figure 1. Flowchart of the study. Abbreviations: circRNA, circular RNA; ccRCC, clear cell renal cell carcinoma; RT-qPCR, reverse-transcription quantitative real-time polymerase chain reaction.

2.2. Discovery of circRNAs in ccRCC Tissue Using Microarray Analysis

2.2.1. Identification of Differentially Expressed circRNAs

A total of 13,261 circRNAs out of 13,617 distinct probes on the array were detected in seven matched ccRCC samples using the ArrayStar microarray approach (Supplemental Microarray Excel File). The number of circRNAs that derive from a single host gene forming multiple circRNA isoforms can vary [19]. Our microarray data revealed that approximately 50% of the detected circRNAs originated from ~75% of the 6271 host genes that produce only one or two circRNAs. However, some host genes accounted for up to 32 different circRNAs; approx. 15% of the detected circRNAs derived from host genes (3.8% of all host genes) that generate more than five circRNAs (Figure 2A). Exonic, intronic, antisense, and intergenic genomic regions can serve as sources for circRNAs. In ccRCC, 85% of the detected circRNAs derived from exonic gene sequences (Figure 2B) corresponding to data found in other human tissues [20]. Exonic circRNAs are generally assembled by one to five exons [20,21]. Analyzing the microarray data, we found 78 up-regulated and 91 down-regulated circRNAs with a higher than two-fold change ($p < 0.05$) in malignant compared to adjacent normal tissue samples (Figure 2C). This expression pattern resulted in a clear clustering of malignant vs. adjacent normal tissue using principal component analysis (Figure 2D).

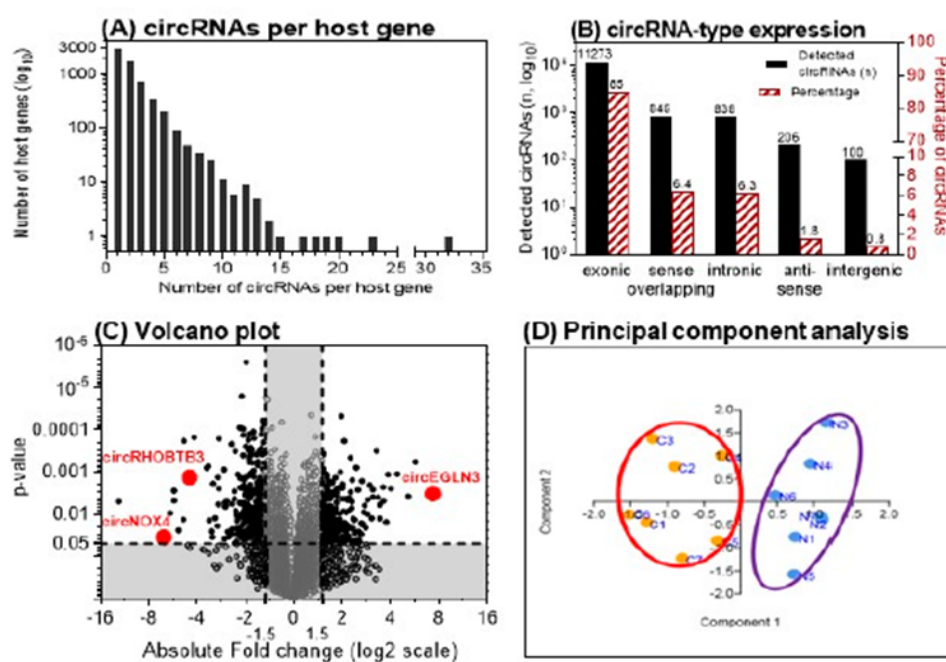


Figure 2. Microarray analysis results of matched clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) tissue samples. (A) Number of circular RNAs (circRNAs) expressed per host gene in 7 matched ccRCC tissue samples. (B) Genomic origin of the detected circRNAs. (C) Volcano plot showing the up- and down-regulated circRNAs in malignant vs. adjacent normal tissue samples. Vertical and horizontal dashed lines indicate the thresholds of the 1.5-fold changes and the p -values of 0.05 in the t -test. The positions of the three detailed examined circRNAs in this study are marked. (D) Principal component analysis with the left cluster of tumor samples (C1–C7) and the right cluster with the paired adjacent normal tissue samples (N1–N7). (A and B adapted from [12]).

2.2.2. Selection of Three circRNAs for Further Evaluation

We further evaluated the differentially expressed circRNAs according to the following criteria: fold-change >4 with $p < 0.05$ and raw intensity above 500 on the microarray. Five up-regulated and eleven down-regulated circRNAs matched these ArrayStar microarray-related criteria. The nomenclature of circRNAs has not been standardized until now. In literature, different names occur depending on the reference database [12]. ArrayStar also uses its own designations. For the mentioned five up- and eleven down-regulated circRNAs, the circRNA IDs used in the databases ArrayStar and circBase [22] are summarized in Table 2. To identify circRNAs with a putative function in ccRCC initiation/progression, we selected circRNAs from host genes with putative roles in angiogenesis and hypoxia in ccRCC and other cancers including *EGLN3*, *NOX4*, and *RHOBTB3* [23–27]. Thus, corresponding circRNAs of the three host genes that are named according to the database circBase hsa_circ_0101692, hsa_circ_0023984, and hsa_circ_000744 were selected for further validation (Figure 2C). For greater clarity, the terms circEGLN3, circNOX4, and circRHOBTB3 are used hereafter for these circRNAs.

Table 2. List of circular RNAs (circRNAs) with at least a fourfold differential expression between the matched malignant vs. adjacent normal tissue samples ($n = 7$) in the microarray discovery study phase. The three circRNAs selected for further examination in this study are marked in bold letters.

circRNA in Manuscript	circRNA ID in ArrayStar ^{a,b}	circRNA ID in circBase ^{a,c}	Fold Change Expression in Tumor vs. Normal Tissue (p -value)	Best Transcript	Official Gene Symbol
Up-regulated circRNAs					
circEGLN3	circRNA_405198	circ_0101692	7.32 (0.0033)	NM_022073	EGLN3
-	circRNA_101202	circ_0029340	5.68 (0.0006)	NM_005505	SCARB1
-	circRNA_101341	circ_0031594	5.16 (0.0038)	NM_022073	EGLN3
-	circRNA_101803	circ_0003520	4.39 (0.0011)	NM_018092	NETO2
-	circRNA_103980	circ_0006528	4.01 (0.0024)	NM_138492	PRELID2
Down-regulated circRNAs					
-	circRNA_103093	circ_0060937	-12.3 (0.0049)	NM_000782	CYP24A1
-	circRNA_101120	circ_0027821	-6.73 (0.0342)	NR_024037	RMST
circNOX4	circRNA_100933	circ_0023984	-6.44 (0.0475)	NM_016931	NOX4
-	circRNA_100562	circ_0006577	-5.87 (0.0093)	NM_012425	RSU1
-	circRNA_031282	circ_0031282	-5.58 (0.0028)	NM_012244	SLC7A8
-	circRNA_103091	circ_0060927	-5.58 (0.0048)	NM_000782	CYP24A1
-	circRNA_023983	circ_0008350	-5.26 (0.0239)	NM_016931	NOX4
-	circRNA_1011001	circ_0025135	-4.89 (0.0132)	NM_001038	SCNN1A
-	circRNA_035435	circ_0035435	-4.84 (0.0002)	NM_032866	CGNL1
circRHOBTB3	circRNA_007444	circ_0007444	-4.45 (0.0013)	NM_014899	RHOBTB3
-	circRNA_101528	circ_0035436	-4.18 (0.0001)	NM_032866	CGNL1

^a The obligatory prefix hsa_ was omitted to facilitate the readability. ^b More detailed annotations including source, chromosome localization, strand, circRNA type, and sequences are listed for all detected circRNAs in the Supplemental Microarray Excel File. ^c <http://www.circbase.org> and [22].

2.3. Analytical Validation of Selected circRNAs

2.3.1. Experimental Confirmation of the Circularity of Transcripts

We developed RT-qPCR assays for the three selected circRNAs and their linear counterparts on the basis of SYBRGreen I. The analytical specificity of all RT-qPCR products was verified by melting curve analysis and gel electrophoresis (with Supplemental Tables S1–S3 and Figure S1). Detection of circRNAs by sequencing or microarray analysis, as in our case, needs additional experimental confirmation of the circular nature of the identified transcripts to avoid false-positive results by measurement of non-circular RNA molecules with sequences similar to the specific backsplice junction [28]. Therefore, different molecular biology-based tests are recommended to validate circRNA-specific backsplice junctions [13,21,28,29]. Figure 3 summarizes our validation results based on the characteristics of circRNAs with regard to their resistance to the RNase R [13], their lack of a poly-A-tail [30], the amplification results in complementary DNA (cDNA) and genomic DNA (gDNA) using divergent and convergent primers, and the proof of the backsplice junctions by Sanger sequencing.

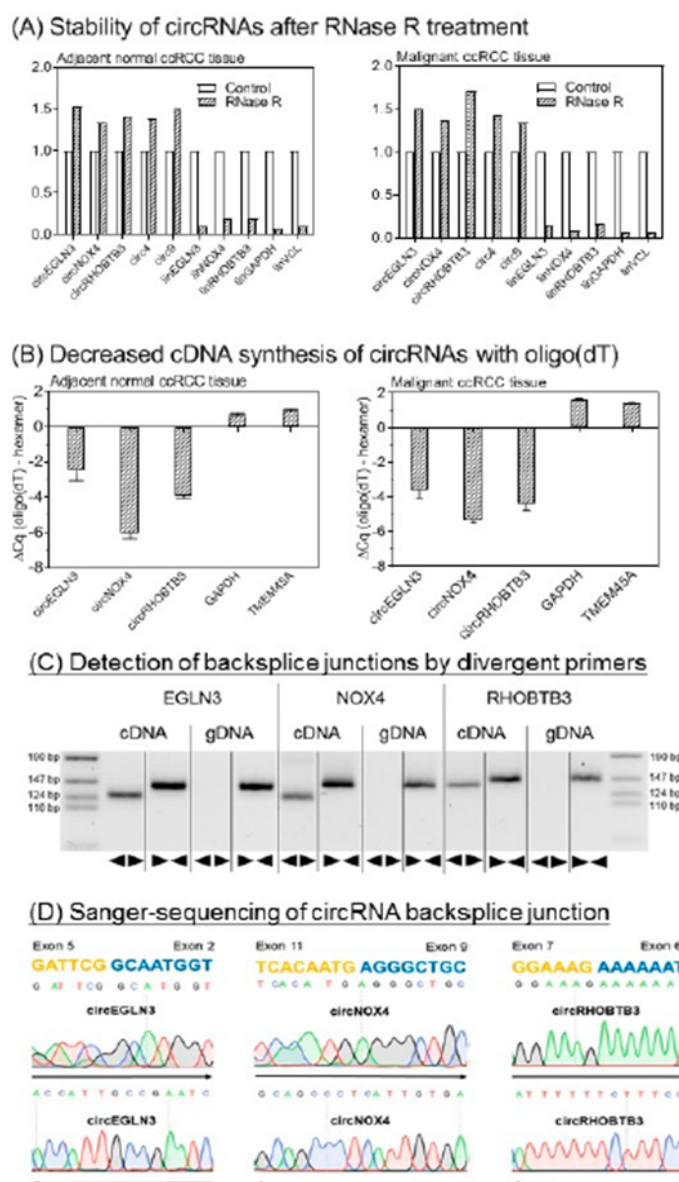


Figure 3. Analytical validation of the circular nature of circEGLN3, circNOX4, and circRHOBTB3. (A) Stability of circular RNAs (circRNAs) after RNase R treatment. CircRNAs are stable while linear mRNAs are degraded when treated with RNase R. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), VNL mRNA (vinculin), circ4, and circ9 were used as additional controls [13,31]. Data of triplicate experiments normalized to controls without RNase treatment are presented. (B) Random hexamer vs. oligo(dT) primers for cDNA synthesis. Random hexamer primers are used for amplification during cDNA synthesis of circRNAs as covalently closed structures of circRNAs lack a poly-A-tail. The binding capacity of oligo(dT) primers is therefore reduced without polyadenylated binding sites. In consequence, quantitation cycle (ΔCq) values in RT-qPCR are distinctly reduced when using random hexamer primers in comparison to oligo(dT) primers for circRNA cDNA synthesis. GAPDH and TMEM45A (transmembrane protein 45A) were used as mRNA controls. Significantly different mean values between the six circRNA samples and four mRNAs of GAPDH and TMEM45A as mRNA controls (mean values: -4.33 vs. 1.18 , $p < 0.0001$) confirmed this characteristic feature of circRNAs. Different mean values of the circRNAs between the tissues were not observed ($p > 0.799$). (C) Gel electrophoresis of PCR products obtained from cDNA and genomic DNA (gDNA). Divergent ($\blacktriangleleft\blacktriangleright$) primers used for circRNA measurements amplify sequences only in cDNA. Convergent ($\blacktriangleright\blacktriangleleft$) primers show amplification of circRNA composing exons in cDNA and gDNA. (D) Base sequence of circRNA backsplice junction pictured by Sanger sequencing. Sanger sequencing was performed with forward (\rightarrow) and reverse (\leftarrow)

primers. Methodical details for all here listed experiments are described in section “Material and Methods” and in Supplementary Information with Supplemental Table S4.

2.3.2. Analytical Performance of RT-qPCR Assays

In addition to the analytical specificity of the established assays, the repeatability (intra-assay variation) and reproducibility (inter-assay variation) of the measurements should be characterized as decisive indicator for the performance and robustness of quantitative tests. Data in Table 3 prove that the assays and measurements are suitable for “fit-for-purpose” RT-qPCR in first clinical studies.

Table 3. Repeatability and reproducibility of RT-qPCR measurements.

RNA	Repeatability ^a		Reproducibility ^b	
	Cq Value	Concentration (AU)	Cq Value	Concentration (AU)
	Mean (%RSD)	Mean (%RSD)	Mean ± SD (%RSD)	Mean ± SD (%RSD)
circEGLN3	23.47 (0.284)	1.185 (4.51)	22.49 ± 0.138 (0.62)	2.132 ± 0.199 (9.33)
circNOX4	24.16 (0.493)	0.808 (9.35)	22.77 ± 0.108 (0.47)	1.118 ± 0.082 (7.30)
circRHOBTB3	25.64 (0.459)	0.0268 (9.27)	24.81 ± 0.190 (0.76)	0.036 ± 0.005 (14.2)
linEGLN3	20.83 (0.521)	32.72 (7.00)	23.93 ± 0.042 (0.18)	1.658 ± 0.046 (2.75)
linNOX4	27.65 (0.405)	0.204 (7.67)	25.50 ± 0.046 (0.18)	0.483 ± 0.015 (3.10)
linRHOBTB3	24.90 (0.214)	1.901 (3.43)	23.43 ± 0.147 (0.63)	3.791 ± 0.386 (10.2)
PPIA	19.33 (0.329)	32.01 (4.16)	19.18 ± 0.081 (0.42)	33.36 ± 1.745 (5.23)
TBP	25.18 (0.331)	2.330 (5.07)	24.99 ± 0.104 (0.42)	2.423 ± 0.156 (6.44)

Abbreviations: Cq, quantitation cycle; AU, arbitrary units; %RSD, percent relative standard deviation; SD, standard deviation; PPIA, peptidylprolyl isomerase A; TBP, TATA-box binding protein. PPIA and TBP served as reference genes [32]. ^a $n = 21$; %RSD was calculated from duplicate measurements using the root mean square method based on Cq values and calculated concentrations, respectively. ^b $n =$ at least 8; %RSD (Cq) corresponds to the percent relative standard deviation calculated on the basis of the Cq values. %RSD (Concentration) corresponds to the percent relative standard deviation calculated on the basis of the normalized relative quantities (arbitrary units).

2.4. Clinical Assessment

2.4.1. Differential Expression of circRNAs in Relation to Clinicopathological Factors

In this first step of the clinical assessment phase, the expression data of the three circRNAs and their linear transcripts were measured and evaluated in all samples of the studied cohort. In Figure 4, the RT-qPCR normalized expression data of these three circRNAs and their corresponding linear transcripts (named in the following with the prefix “lin”) in normal tissue and non-metastatic and metastatic primary tumor samples are shown. While the expression differences between tumor samples and adjacent normal tissue samples were significant for all circular and linear transcripts, no significant expression differences were found in primary tumors without (M0) and with (M1) metastasis.

The expression data of all three circRNAs and their linear transcripts in the tumor samples were not associated with age, sex, TNM stage, TNM-stage grouping, Fuhrman grade, surgical margin, tumor size, or metastatic status (Spearman rank correlation, Mann-Whitney U-test or Kruskal-Wallis test; $p > 0.10$; Supplementary Information with Table S5). Only EGLN3 showed a significant progressive down-regulation from Fuhrman grade 1 to grade 4 for circEGLN3 (from 11.9 to 9.07, 7.76, and 0.742; $p = 0.006$, Kruskal-Wallis test with Jonckheere-Terpstra trend test) and for linEGLN3, respectively (from 6.47 to 5.25, 4.51, and 0.461; $p = 0.004$).

The expression levels of the circRNAs and their linear transcripts correlated closely with each other, showing similar correlation coefficients in both malignant and adjacent normal tissue samples (circEGLN3 and linEGLN3, $r_s = 0.742$ and 0.624 ; circNOX4 and linNOX4, $r_s = 0.849$ and 0.851 ; circRHOBTB3 and linRHOBTB3, $r_s = 0.749$ and 0.849 ; $p < 0.0001$ in all cases). However, the ratios of the circRNAs to their linear transcripts were significantly lower (Wilcoxon test with paired samples)

in the adjacent normal tissue samples than in the tumor samples (median circEGLN3/linEGLN3 of 0.68 vs. 1.57, $p < 0.0001$; circNOX4/linNOX4 of 0.79 vs. 1.16, $p < 0.0001$; circRHOBTB3/linRHOBTB3 of 0.95 vs. 0.99, $p = 0.022$).

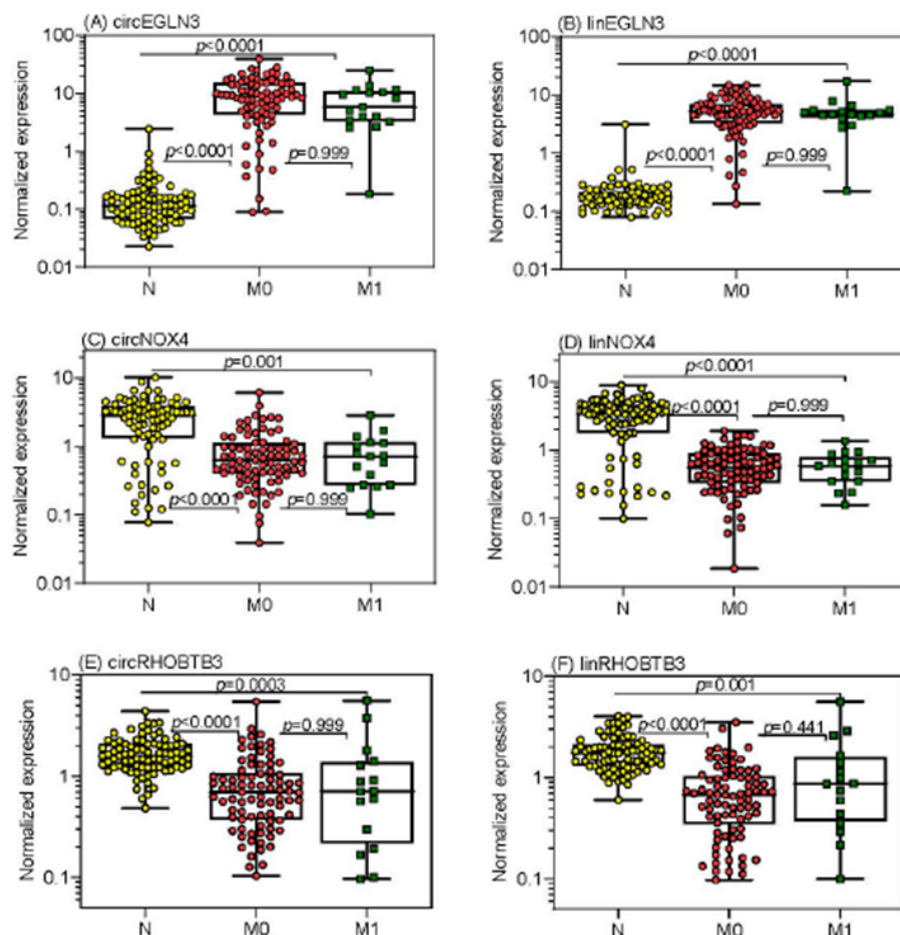


Figure 4. Expression of circular RNAs (circRNAs) and the linear transcripts of their host genes in tissue samples from patients suffering from clear cell renal cell carcinoma. Expression data of (A) circEGLN3, (C) circNOX4, and (E) circRHOBTB3 as well as the corresponding linear transcripts of the host genes (B) EGLN3, (D) NOX4, and (F) RHOBTB3 are shown in adjacent normal tissue distant from tumor ($n = 85$), in tissue from non-metastatic (M0, $n = 82$) and metastatic primary tumors (M1, $n = 17$) of patients with clear cell renal cell carcinoma at the time of surgery. CircRNA and linRNA expression ratios of M0 ($n = 60$) and M1 ($n = 16$) tissue samples in relation to their paired adjacent normal tissue samples did not statistically differ (p values between 0.302 to 0.712). PPIA (peptidylprolyl isomerase A) mRNA and TBP (TATA-box binding protein) mRNA were used as normalizers. Boxes in the box-and whisker plots represent the lower and upper quartiles with medians, whiskers illustrate the entire range of the samples. Significant differences between the study groups were estimated by the Kruskal-Wallis test with multiple comparisons corrected according to Holm-Sidak.

These ratio changes and numerous significantly different correlations for each of the circRNAs with the three linear transcripts (Tables S6A–C) support the hypothesis of differential regulatory mechanisms in normal and cancer tissue. These data encouraged us to always include the corresponding linear transcripts in subsequent investigations.

Based on the expression data, receiver-operating characteristics curve (ROC) analysis was performed to test the discriminative ability of circRNAs and the linear transcripts in differentiating between malignant and adjacent normal ccRCC tissue (Table 4). The strong discriminative potential

of both circEGLN3 and linEGLN3 with regard to sensitivity, specificity, and overall accurate classification of ~95% of tissues is remarkable.

Table 4. Receiver-operating characteristic curve analyses of circRNAs and their linear transcripts to discriminate between adjacent normal and malignant tissue.

RNAs	AUC (95% CI)	<i>p</i> -value Different to AUC = 0.5	Differentiating Ability at the Youden Index ^a		% Overall Correct Classification
			Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	
circEGLN3	0.98 (0.95–0.99)	<0.0001	95 (89–99)	95 (88–99)	94.6
circNOX4	0.81 (0.74–0.86)	<0.0001	91 (83–96)	71 (60–80)	80.4
circRHOBTB3	0.82 (0.76–0.87)	<0.0001	72 (62–80)	91 (82–96)	69.0
linEGLN3	0.98 (0.96–0.99)	<0.0001	96 (89–98)	99 (94–100)	95.7
linNOX4	0.85 (0.79–0.90)	<0.0001	99 (95–100)	78 (67–86)	88.0
linRHOBTB3	0.86 (0.81–0.91)	<0.0001	72 (62–80)	94 (87–98)	75.0
circEGLN3 +linEGLN3 ^b	0.99 (0.96–1.00)	<0.0001	95 (89–98)	99 (94–100)	95.7

Abbreviations: AUC, area under the receiver-operating characteristics curve; CI, confidence interval.

^a The Youden index as a measure of overall diagnostic effectiveness is calculated by [(sensitivity + specificity) – 1]. When equal weight is given to sensitivity and specificity of a test, the cutoff at the maximum value of this index, which graphically corresponds to the maximum vertical distance between the ROC curve and the diagonal line, is referred to as optimal criterion. ^b Calculated by binary logistic regression.

2.4.2. CircRNAs as Prognostic Markers and Elaboration of RNA Signatures

To assess the prognostic value of the new markers, we defined prediction accuracy of CSS as primary and RFS and OS as secondary endpoints. The endpoints were defined as the time from the surgery until the time of the corresponding event or the last follow-up.

Kaplan-Meier analysis was used to assess the association of the expression data of the three circRNAs and linear transcripts with the outcome endpoints. For that purpose, X-tile software [33] was applied to define optimized cutoff-points (Figure 5; Supplementary Information with Table S7 and Figures S2A–B).

For the primary CSS endpoint (Figure 5), increased expression values of both circEGLN3 and linEGLN3 were associated with better survival rates even though both transcripts were increased in malignant tissue in comparison to normal tissue (Figures 5A,B). Both circNOX4 and linNOX4 were not correlated to CSS (Figures 5C,D). Furthermore, circRHOBTB3 and linRHOBTB3 showed differing impacts on cancer-specific survival (Figures 5E,F). While high expression levels of circRHOBTB3 were associated with improved outcome, high levels of linRHOBTB3 were associated with reduced survival rates. The results were comparable using the two secondary endpoints (Figures S2A–B). The results for the linear transcripts were validated using the The Cancer Genome Atlas Kidney Renal Clear Cell Carcinoma (TCGA-KIRC) dataset, as this data collection does not contain circRNAs. Low expression of linEGLN3 and linNOX4 as well as high expression of linRHOBTB3 were associated with shorter overall survival of TCGA ccRCC specimens (Figures S3A–C).

In univariate Cox regression analysis, the hazard ratios of RNAs corresponded with the results from Kaplan-Meier curves (Table S7, Supplemental Figures S2A–B, and Figure 5). Subsequently, multivariate Cox regression analysis was performed including all circRNAs and linRNAs and a backward elimination approach (entry: $p < 0.05$, removal: $p > 0.100$) was used. Only circEGLN3, circRHOBTB3, and linRHOBTB3 remained in the reduced models for all three endpoints (Table 5).

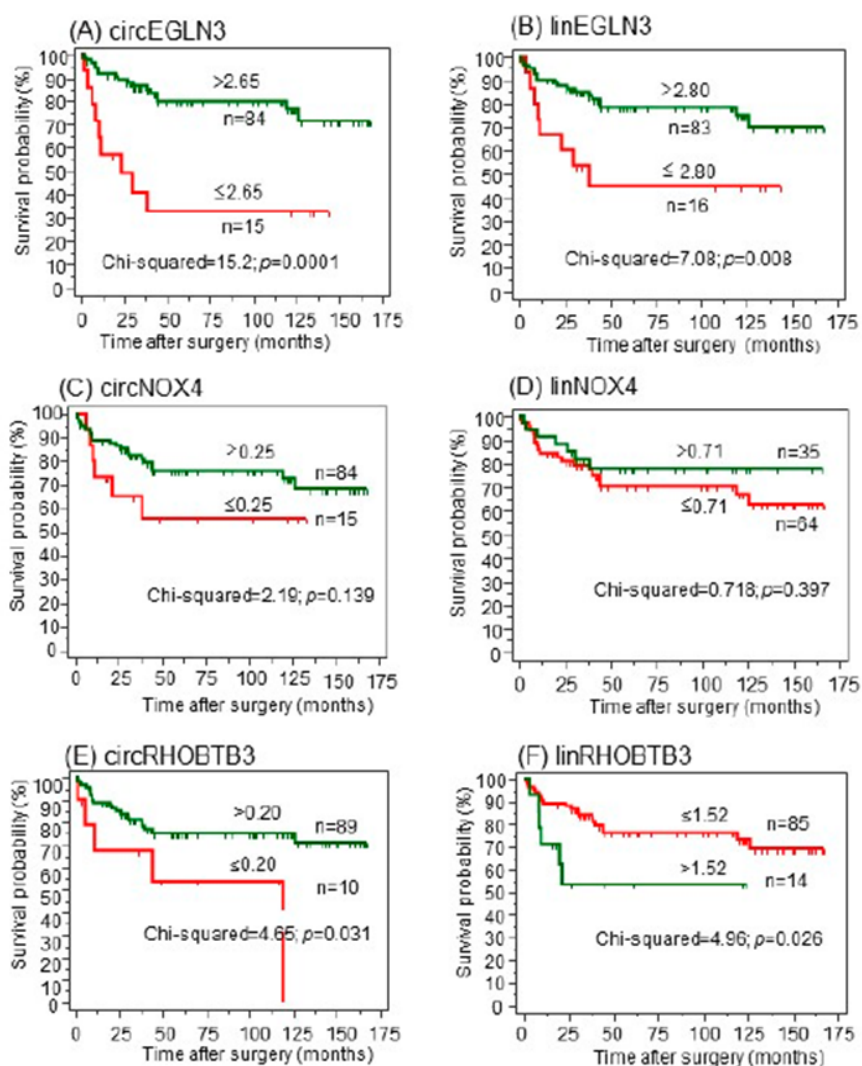


Figure 5. (A–F) Kaplan-Meier analysis of circular RNAs (circRNAs) and their linear transcripts with regard to cancer-specific survival after surgery. CircRNAs were dichotomized using the optimized cutoffs indicated by software X-tile [33] to discriminate between deceased and alive. Green curves represent patients with expression values above the cutoff; red curves represent patients with values equal or below the cutoff. The number of patients in the dichotomized groups and the cutoffs are indicated at the curves. The log-rank test was used to confirm significant differences between the survival probabilities.

C-statistics data for the models including all six RNA variables (“full model”) compared with those obtained after backward elimination (“reduced model”), were not different (full vs. reduced model; CSS: 0.730 ± 0.060 vs. 0.726 ± 0.056 , $p = 0.863$; RFS: 0.764 ± 0.057 vs. 0.735 ± 0.059 , $p = 0.478$; OS: 0.741 ± 0.048 vs. 0.738 ± 0.046 , $p = 0.897$; values given as AUC \pm SE of the prognostic indices calculated in Cox regression analyses). We therefore used the reduced models with circEGLN3, circRHOBTB3, and linRHOBTB3 for the three outcome endpoints in the further evaluation and termed them “RNA signatures” (Table 5).

Table 5. Multivariate Cox Proportional Hazard Regression Analyses of Different Prediction Models for Outcome after ccRCC Nephrectomy ^a.

Variable ^b	Cancer-specific survival		Recurrence-free survival		Overall survival	
	HR (95% CI)	p-value	HR (95% CI)	p-value	HR (95% CI)	p-value
RNA signature ^{c,d,e}						
circEGLN3	0.24 (0.10–0.57)	0.001	0.53 (0.18–1.03)	0.074	0.49 (0.23–0.95)	0.037
circRHOBTB3	0.26 (0.09–0.73)	0.010	0.14 (0.04–0.49)	0.003	0.15 (0.05–0.49)	0.002
linRHOBTB3	2.57 (0.95–6.90)	0.062	11.1 (2.79–43.8)	0.001	4.46 (1.52–13.0)	0.006
Clinical model						
Tumor stage grouping (III+IV/I+II)	3.54 (1.16–10.8)	0.027	0.79 (0.25–2.48)	0.685	2.02 (0.95–4.27)	0.064
Fuhrman grading (3+4/1+2)	2.68 (1.03–7.02)	0.044	13.4 (4.06–44.3)	<0.0001	3.00 (1.32–6.82)	0.009
Surgical margin (R1/R0)	2.82 (1.05–7.59)	0.040	7.09 (1.75–28.7)	0.006	2.26 (0.91–5.59)	0.078
Tumor size (≥7 cm<)	1.10 (0.42–2.87)	0.838	1.03 (0.35–2.97)	0.963	0.99 (0.46–2.14)	0.988
Clinical model + RNA signature						
Tumor stage grouping (III+IV/I+II)	3.16 (0.93–10.8)	0.066	0.67 (0.19–2.37)	0.536	2.81 (1.23–6.42)	0.014
Fuhrman grading (3+4/1+2)	2.04 (0.73–5.74)	0.177	9.98 (2.99–33.4)	0.0002	2.25 (0.99–5.12)	0.053
Surgical margin (R1 vs. R0)	3.97 (1.28–12.3)	0.017	3.48 (0.76–15.9)	0.109	2.12 (0.87–5.18)	0.099
Tumor size (≥7 cm<)	1.16 (0.44–3.11)	0.762	1.22 (0.36–4.13)	0.746	0.76 (0.36–1.64)	0.490
circEGLN3	0.33 (0.13–0.79)	0.014	0.69 (0.22–2.19)	0.532	0.51 (0.24–1.09)	0.084
circRHOBTB3	0.25 (0.08–0.80)	0.019	0.21 (0.05–0.94)	0.041	0.16 (0.05–0.53)	0.003
linRHOBTB3	3.84 (1.35–10.9)	0.012	7.71 (1.55–38.3)	0.013	5.26 (1.74–15.9)	0.003
Clinical model + RNA signature after backward elimination						
Tumor stage grouping (III+IV/I+II)	3.98 (1.32–12.0)	0.014	–	–	2.89 (1.39–5.99)	0.005
Fuhrman grading (3+4/1+2)	–	–	8.53 (3.08–23.6)	<0.0001	2.52 (1.15–5.53)	0.021
Surgical margin (R1 vs. R0)	5.68 (2.09–15.4)	0.0007	3.54 (1.02–12.3)	0.047	–	–
Tumor size (≥7 cm<)	–	–	–	–	–	–
circEGLN3	0.28 (0.12–0.68)	0.005	–	–	0.50 (0.24–1.05)	0.067
circRHOBTB3	0.21 (0.07–0.65)	0.007	0.18 (0.04–0.75)	0.018	0.17 (0.05–0.56)	0.004
linRHOBTB3	3.59 (1.28–10.0)	0.015	8.19 (1.81–37.1)	0.006	5.37 (1.80–16.1)	0.003

Abbreviations: ccRCC, clear cell renal cell carcinoma; CI, confidence interval; G, histopathological grading according to Fuhrman; HR, hazard ratio; R, surgical margin classification. ^a The multivariate analysis included the RNA signature combination of circEGLN3, circRHOBTB3, and linRHOBTB3 after univariate analysis with a backward elimination approach of the six RNA and all clinicopathological factors of univariate analysis with *p* values <0.05 (Supplementary Information 5, Supplemental Tables S7 and S8). ^b RNAs were dichotomized using the X-tile program [33] at the best threshold to discriminate between dead and alive in cancer-specific and overall survival, respectively as well as between recurrence and recurrence-free situation. These outcome-specific thresholds are indicated in the footnotes c, d, and e and correspond to those in the Kaplan-Meier curves. Clinicopathological variables are given with their categorized criteria in brackets. ^c Cutoffs for cancer-specific survival: circEGLN3 (2.65), circRHOBTB3 (0.20), and linRHOBTB3 (1.52). ^d Cutoffs for recurrence-free survival: circEGLN3 (2.10), circRHOBTB3 (0.50), and linRHOBTB3 (0.72). ^e Cutoffs for overall survival: circEGLN3 (2.73), circRHOBTB3 (0.27), and linRHOBTB3 (0.60).

2.4.3. A circRNA-Based Predictive Clinico-Genomic Model to Improve Prognostic Accuracy

Until now, clinicopathological variables are the basis to estimate the prediction of CSS, RFS, and OS after surgery and serve for benchmarking analysis of newly established tools. TNM-stage grouping including metastatic status, Fuhrman grading, tumor size, and surgical margin comprised significant clinicopathological predictors for all three outcome endpoints in Kaplan-Meier curves and univariate Cox regression analyses (Figures S4A–C, Table S8). These four variables were used combined in all outcome analyses and were called the “clinical model” (Table 5).

C-statistics data of the prognostic indices calculated in Cox regression analyses for the three endpoints using the “clinical model” and “RNA signature” were then compared and the results were not significantly different (Figure 6, legend: *p* values between 0.268 and 0.837). However, the results of the decision curve analysis show that the curves of the RNA-signature are always located above the curves of the “clinical model” and indicate a better accuracy. This is consistent with the

recommendation that the decision curve analysis is the most informative metrics to demonstrate an incremental prognostic benefit [34]. Furthermore, the predictive outcome accuracy of the clinical models was improved upon combination with corresponding RNA signatures as shown by C-statistics and decision curve analysis (Figure 6).

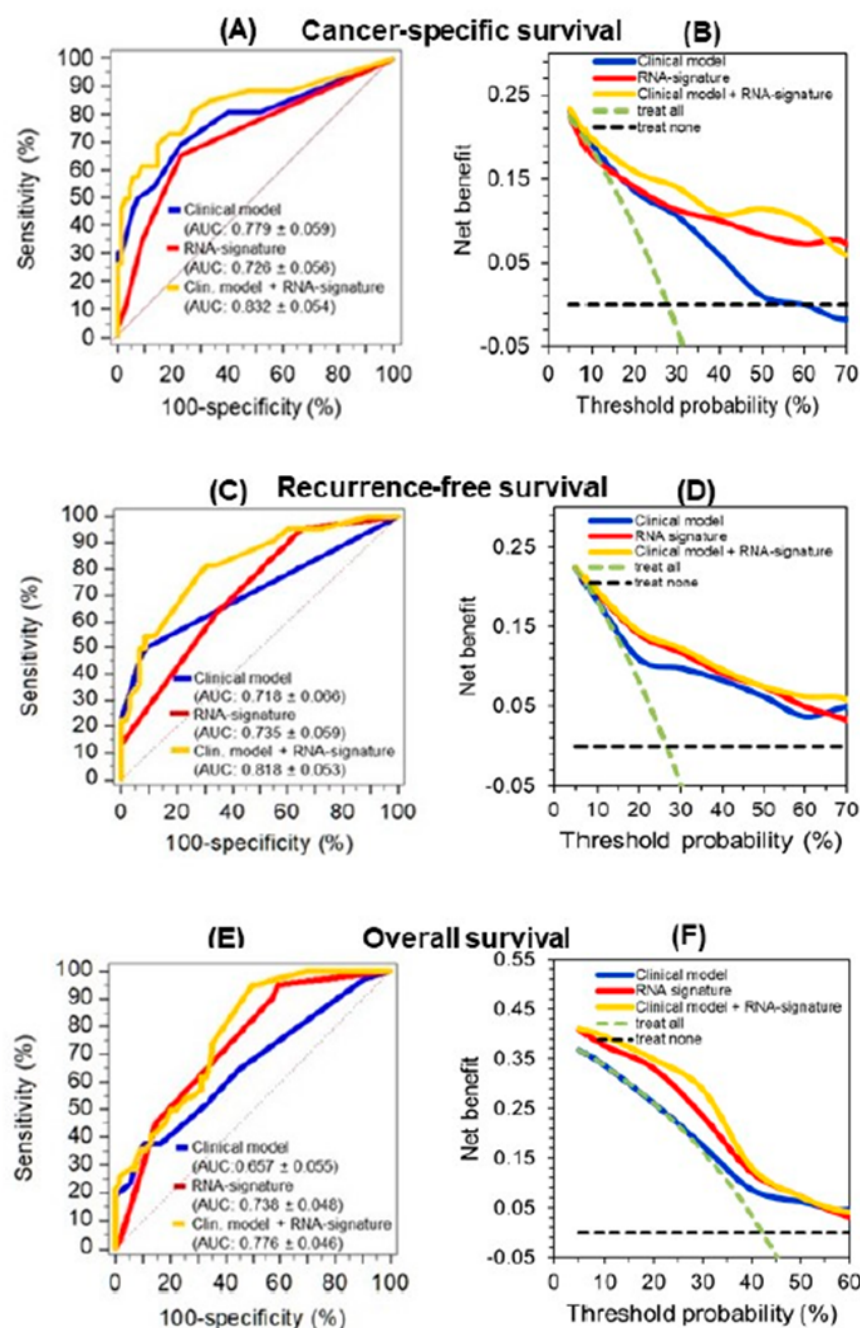


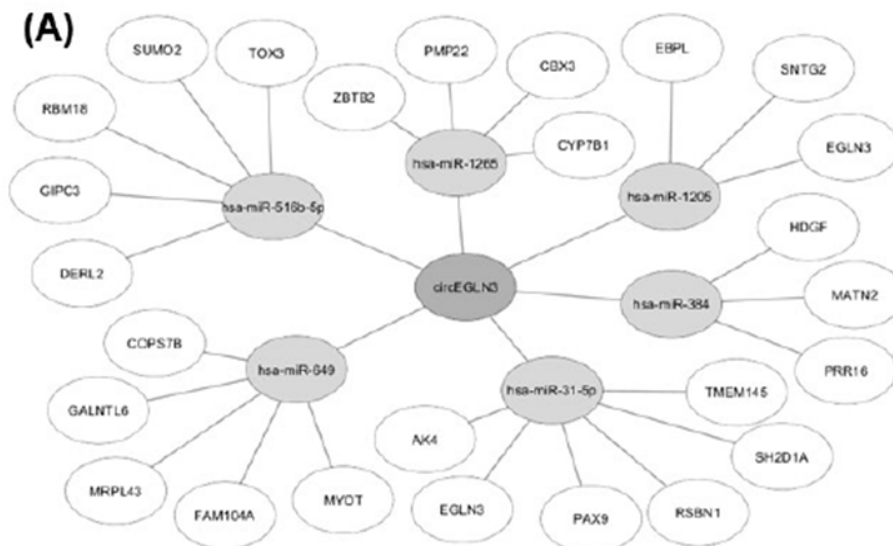
Figure 6. Improved predictive accuracy of cancer-specific (CSS), recurrence-free (RFS), and overall survival (OS) in a model with clinicopathological variables by including a circular RNA (circRNA) based signature. (A, C, and E) C-statistics curves of the prognostic indices of Cox regression analysis for the three endpoints using the models indicated in Table 5 (“clinical model”, “RNA signature”, and the combination of both (“clinical model + RNA signature”) as well as (B, D, and F) the corresponding curves of decision curve analysis are shown here. The AUC values were not significantly different between the clinical model and the RNA signature for CSS ($p = 0.452$), RFS ($p = 0.837$), and OS ($p = 0.268$). The improved predictive accuracy of combining the “RNA signature” with

the pure “clinical model” is shown by the increased AUC values indicated in parentheses next to the models in the subfigures. Curves in the decision curve analysis confirmed the benefit of combining the RNA signatures with the “clinical model.”.

Furthermore, hazard ratios of the multivariate Cox regression analysis of the clinical model variables and those of the RNA signature confirmed that the RNA signature variables remained independent factors for the prediction of the corresponding outcomes in the full combined models, but also in the reduced models after backward elimination (Table 5). The robustness of this combined classifier was supported by the fact that backward elimination of the full model “clinical model + RNA signature” did not result in a loss of predictive accuracy (full vs. reduced model; CSS: 0.832 ± 0.054 vs. 0.821 ± 0.052 , $p = 0.449$; RFS: 0.818 ± 0.053 vs. 0.816 ± 0.053 , $p = 0.740$; OS: 0.776 ± 0.046 vs. 0.768 ± 0.047 , $p = 0.529$; values given as AUC \pm SE of the prognostic indices calculated in Cox regression analyses). Furthermore, internal bootstrapping validation confirmed the statistical significance and robustness of the combined models (Table S9). The improvement of the clinical model by including the corresponding RNA signatures was further demonstrated using the weight approach of the Akaike and Bayesian information criteria [35]. The final model including the four clinicopathological factors and the RNAs performed better than the “clinical model” with normalized probabilities of the Akaike and Bayesian criterion for CSS with 0.886 and 0.901, for RFS with 0.759 and 0.853, and for OS with 0.991 and 0.971, respectively.

2.5. In-silico Analysis of circRNA-miRNA-gene Interaction

We identified potential miRNAs binding to the three circRNA candidates circEGLN3, circNOX4, and circRHOBTB3 with an algorithm provided by the CircInteractome tool [36], which is based on the database TargetScan [37]. MiRNAs were ranked according to the TargetScan context+ score. The five top-ranked miRNAs for each circRNA (all context + scores < -0.19) were chosen. Furthermore, potential gene interactions were identified for the miRNAs using the databases miRDB and TargetScan [37,38]. As cut-off values we chose a target score >90 (miRDB) and a total context++ score < -0.5 . In Figure 7, only miRNA-gene interactions listed by both miRDB and TargetScan are shown.



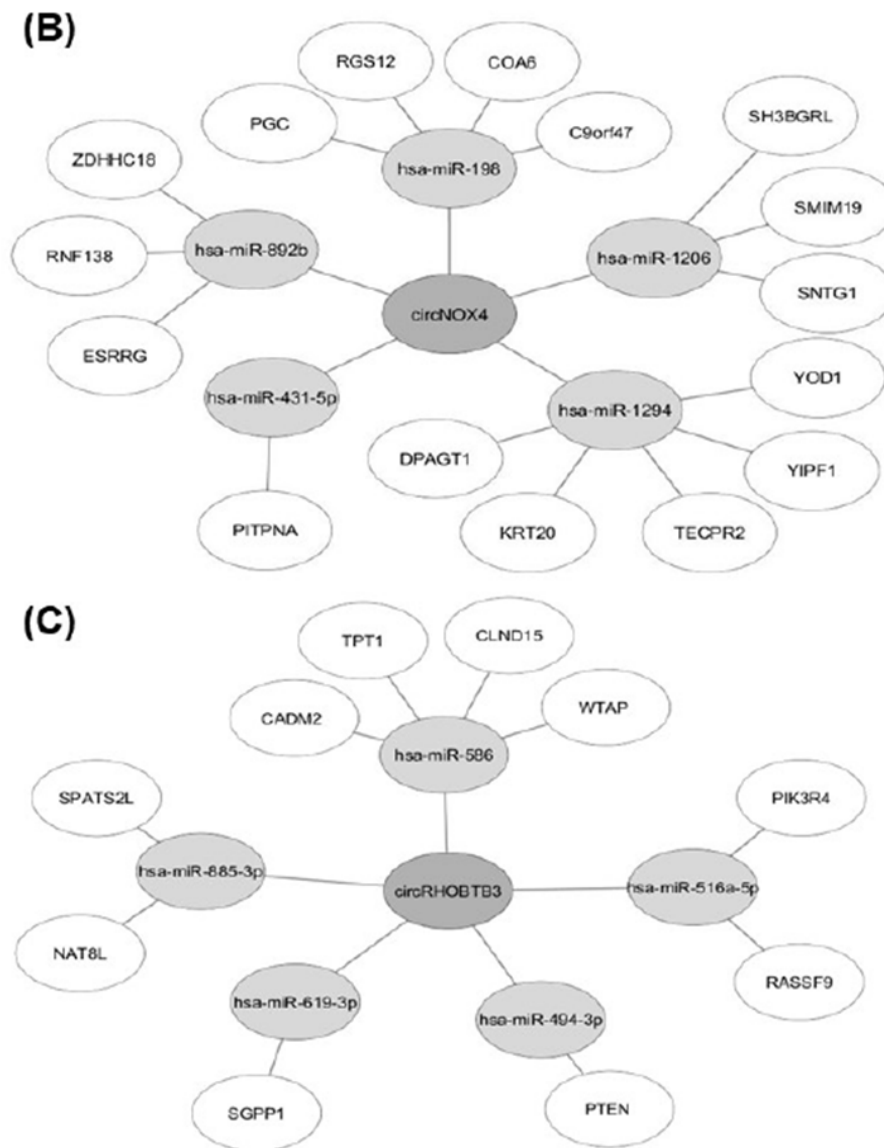


Figure 7. Results of in-silico analysis of circRNA-miRNA-gene interaction. MiRNAs with potential binding sites to (A) circEGLN3, (B) circNOX4, and (C) circRHOBTB3 were identified using CircInteractome [36] and subsequent miRNA-gene interactions were analyzed with the databases miRDB [38] and TargetScan [37].

3. Discussion

The current study represents hypothesis-generating research using a discovery-driven global approach [39]. We performed a genome-wide search for differentially expressed circRNAs in ccRCC tissue samples by microarray technology, the analytical and clinical validation of the three selected circRNAs circEGLN3, circNOX4, and circRHOBTB3 by RT-qPCR measurements, and successfully validated them as prognostic biomarkers in combination with conventional clinicopathological variables.

Numerous prognostic tools for ccRCC patients based exclusively on clinicopathological factors exist that have limited predictive accuracy of clinical outcome endpoints [40]. This supports the intention to include molecular markers to improve existing models [1,4]. Reports of various tools based on “omics”-markers alone or combined with clinicopathological variables have been published with promising results [1,3,4]. However, to the best of our knowledge, this study is the

first to evaluate the prognostic potential of circRNAs in ccRCC tissue samples for the three clinically relevant survival endpoints of CSS, RFS, and OS.

In the discovery phase, we used microarray technology—considered to be more efficient in detecting circRNA molecules in comparison to RNA-sequencing methods [41]. The microarray contained 13 617 distinct probes, out of which 97.5% were detected in renal tissue and the principal component analysis of circRNAs clearly clustered between normal and tumor tissue. Differential expression analysis revealed 0.59% ($n = 78$) at least twofold up-regulated and 0.69% ($n = 91$) down-regulated circRNAs. These changes correspond to results observed in other solid tumors [20].

As briefly outlined in the Introduction, there have so far been few studies on circRNAs in ccRCC [15–18], which mostly focused on single circRNAs [15,16,18]. One working group investigated, based on database and literature searches, the effects of the androgen receptor and estrogen receptor beta via circHIAT1 and circATP2B1, respectively on the progression of ccRCC [15,16]. Another study examined the possible role of circABC10 in ccRCC etiology [18]. These three circRNAs are not part of the up-/down-regulated circRNA list in our study obtained by microarray analysis. Although these studies provided interesting insights into functional aspects of circRNAs in ccRCC, their prognostic information was limited. A fourth study by Zhou et al. [17] provided a list of the top 10 up- and down-regulated circRNAs based on a microarray search of three paired ccRCC tissue samples. Four of these 20 circRNAs are identical with four of the 17 top differentially expressed circRNAs, including the circEGLN3, listed in Table 2 (circBase ID: circ_0025135, circ_00331594, circ_0029340, and circ_0101692). However, circPCNXL2, which the authors reported as the circRNA with the highest up-regulation in the examined tissue samples, was not identified in our microarray analysis. This might be due to the different amount of tissue samples used for the microarray analysis or to a differing probe set on the microarray.

Despite the interesting details regarding differential expression and the ensuing discriminative potential between adjacent normal and malignant tissue (Table 4), our focus was directed at the prognostic potential of the three selected circRNAs from the circRNA profiles we obtained. In this context, the following expression particularities of the circRNAs and their linear transcripts are noteworthy: (I) we found no statistically different expression levels of circRNAs between the primary non-metastatic and metastatic tumors (Figure 4); (II) only Fuhrman grade as one relevant clinicopathological variable was associated with RNA expression (e.g., circEGLN3 and linEGLN3); and (III) we found differing and partly inverse correlations as well as changes in the abundance between circRNAs and their linear transcripts. Although the expression of most circRNAs is obviously in-line with the expression of their host genes [42], the host gene-independent expression of circRNAs, reflected in our study exemplarily in the inverse Kaplan-Meier curves of circRHOBTB3 and linRHOBTB3 (Figure 5) is of special interest. Similar findings have recently been reported also in prostate cancer and heart diseases [43,44]. We have considered these findings in the clinical assessment process by including the expression data of the linear transcripts from RNase R untreated total RNA samples in the analysis and clinical evaluation. This fact is also considered by the recently published MiOncoCirc database that includes circRNAs identified by a special capture exome RNA-sequencing protocol [45]. Using this sequencing protocol without RNase R pretreatment [46], the ratio between circular and the linear transcripts is preserved—comparable with the tissue sample—and allows a definite downstream analysis as mRNAs are not removed [45].

Thus, all these expression particularities and further the characteristics of uncorrelated differential expression in relation to conventional clinicopathological factors are specific for orthogonal biomarkers [47]. Consequently, new information can arise from the application of such biomarkers in clinical practice [48]. Indeed, multivariate Cox regression analysis showed that the RNA signatures developed with circEGLN3, circRHOBTB3, and linRHOBTB3 proved their hypothesized prognostic value for all three clinical endpoints (Table 5). Furthermore, in combination with the conventional risk factors of the clinical model, all three RNAs generally remained independent factors, also in the backward models (Table 5). Moreover, C-statistics and decision curve analysis data (Figure 6) as well as the Akaike and Bayesian information criteria and the internal bootstrap validation support the improved predictive accuracy of the combined model. We

used bootstrapping for the internal validation as it is recommended as efficient method for internal validation of predictive models in favor of split-sample validation and cross-validation [49]. As already mentioned in the Results, we laid particular emphasis on the evaluation of the models using decision curve analysis as recently recommended standard to validate diagnostic/prognostic benefit [34]. Thus, the data allow us to consider circRNAs as potential prognostic biomarkers in the future to improve risk stratification of ccRCC patients after nephrectomy.

In addition to their role as promising new biomarkers in cancer and other diseases, circRNAs are also currently evaluated regarding their functional role in cancer initiation and progression (reviewed in [50]). In this context, miRNA sponging and consequential impact on the expression of cancer key genes is one of the most relevant features of circRNAs [14,51]. For example, elevated expression of circTP63 in lung squamous cell carcinoma was shown to be associated with accelerated tumor progression by sponging miR-873-3p and thus increased levels of FOXM1 [52]. In contrast, over-expression of circRNAs can also be protective against tumor progression as shown by the example of circSLCA1, which promotes the tumor suppressor PTEN via miR-130b/miR-494 sponging in bladder cancer [53]. With an in-silico analysis of the circRNA-miRNA-gene interactions of circEGLN3, circNOX4 and circRHOBTB3, we identified potential target genes of the circRNAs that might influence ccRCC development and progression (Figure 7). Interestingly, the in-silico analysis for circEGLN3 predicted a potential binding of miR-31-5p and miR-1205 to circEGLN3 and the corresponding linear RNA of EGLN3. EGLN3 is known to contribute to ccRCC initiation [25,26,54] by targeting HIF. The up-regulation of both circEGLN3 and linRNA of EGLN3 in ccRCC and the predicted interaction via miR-31-5p and miR-1205 could reflect a self-sustaining mechanism of the oncogene EGLN3. This hypothesis is supported by new reports that miRNA-31-5p acts as tumor suppressor and is down-regulated in renal cell carcinoma [55].

Furthermore, an interesting interaction was revealed for the down-regulated circRHOBTB3, which could be able to down-regulate the tumor-suppressor PTEN via absence of miR-494 sponging. The oncogenic effect of miR-494 up-regulation and subsequent PTEN inactivation is reported for many different cancers [53,56,57]. In our study, down-regulation of circRHOBTB3 is associated with poor survival outcome (Figure 6). This is especially interesting since the inverse survival outcome of circRHOBTB3 and linRHOBTB3 expression suggests a functional independency.

Nevertheless, the functional relevance of the interactions we identified based on in-silico data (Figure 7) remains to be experimentally confirmed, but this was beyond the scope of this hypothesis-generating study.

Despite the abovementioned statistical measures for bias-free analyses including the internal bootstrap-based validation and the confirmation by the Akaike and Bayesian information criteria, there are inherent limitations of this study. These include the retrospective nature of the study involving a limited number of patients selected solely based on available tissue samples, the focus on the application of biomarkers without exploring their possible molecular mechanisms, and the lack of external validation.

4. Materials and Methods

4.1. Patients and Tissue Samples

The study was approved by the local Ethics committee of the University Hospital Charité (Charité - Universitätsmedizin Berlin: EA1/134/12; approval date: 22nd June 2012) and an informed consent was obtained from patients. The study was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki and considered the MIQE, REMARK, and STARD guidelines [58–60].

The study included ccRCC tumor samples from 99 patients and adjacent normal renal tissue samples from 85 patients undergoing radical or partial nephrectomy between 2003 and 2016 (Table 1). The patients were selected according to the availability of cryo-preserved tissue samples and the completeness of follow-up databased on the sample size calculation with $\alpha = 5\%$ and a power of 80% (Supplementary Information). Tumors were classified by two experienced uro-pathologists (A.E., E.K.) according to the 2010 TNM classification system and the Fuhrman grading system. In total, 17

patients exhibited metastases at the time of diagnosis and 22 developed metastases within the follow-up period until November 2018 (Table 1). None of the patients received systemic therapy prior to nephrectomy. Tissue specimens were sampled immediately after nephrectomy, either snap frozen in liquid nitrogen or immersed in RNAlater solution (Qiagen, Hilden, Germany), and stored at -80°C until analysis as described in our previous publications [61–63].

4.2. Analytical Methods

4.2.1. Total RNA Samples and Their Characteristics

Total RNA was isolated from 30 to 98 mg tissue pieces. The isolation procedure from preserved tissue specimens using the miRNeasy Mini Kit (Qiagen) including an on-column DNA digestion step according to the producer's instructions, the spectrophotometric quantification (NanoDrop 1000 Spectrophotometer; NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA), and the quality assessment of the total RNA samples (ratio of the absorbance at 260 nm to that at 280 nm and RNA integrity number on a Bioanalyzer 21000 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) were detailed described in our previous publications [61–63]. The median ratio of 260 nm to 280 nm of the isolated RNA samples was 2.04 (95% CI, 2.03 to 2.04) and the median RNA integrity number was 7.70 (95% CI, 7.52 to 7.88). The median RNA concentration in the isolates of 30 μL nuclease-free water was 1118 (95% CI, 1029 to 1209) ng/ μL . Isolated RNA samples were stored at -80°C .

4.2.2. Microarray Detection of circRNAs

Microarray analyses were performed as custom order by ArrayStar Inc. (Rockville, MD, USA) using extracted total RNA from seven paired tissue samples of non-metastasized clear cell renal cell carcinomas (ccRCC: all patients with negative lymph nodes and negative surgical margin; 1 \times pT1 with Fuhrman grade 2, 1 \times pT2 with grade 2, 3 \times pT3 with grade 2, 2 \times pT3 with grade 3). The samples were treated with RNase R to digest linear RNAs and enrich circular RNAs. The circRNAs were amplified, transcribed, and fluorescently labelled on the 3'-end using Cy3. The prepared samples were hybridized on the ArrayStar Human Circular RNA Array that is designed to detect 13,617 circRNAs. Image scanning and analysis was performed with Agilent software (Agilent scanner model G2505C, Agilent Feature Extraction software version 11.0.1.1 and Agilent GeneSpring GX). Probe intensities were normalized with quantile normalization. Differential expression analysis was carried out with R Bioconductor 'limma' package by computing moderated t-statistics and Benjamini-Hochberg adjusted *p* values. All the data are compiled in the accompanying separate Excel file with all additional information and annotation details (Supplemental Microarray Excel File).

4.2.3. RT-qPCR Methodology and circRNA Validation Methods

RT-qPCR measurements were performed according to the recommendations of the MIQE guidelines [58]. The corresponding comments are listed in a checklist and apply for all assays (Supplementary Information with Supplemental Table S1). No template controls (NTC) and no reverse transcription controls (NRTC or no enzyme controls = NEC) were always performed and showed negative results. For cDNA synthesis, the Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; Cat.No. K1642) was used. All real-time qPCR runs were performed on the LightCycler 480 Instrument (Roche Molecular Diagnostics, Mannheim, Germany) in white 96-well plates (Cat.No. 04729692001) using at least technical duplicates and resulting mean values for further calculations. Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific; Cat.No. K0252) was used. Primers were designed using the blasting tool provided by Primer3 [64] and synthesized by TIB MOLBIOL GmbH (Berlin, Germany). PPIA (peptidylprolyl isomerase A) and TBP (TATA-box binding protein) were used as normalizers [32]. Quantitative PCR data analysis was done using qbase + software, version 3.2 (Biogazelle, Zwijnaarde, Belgium). All analytical details (list of primers with their sequences, setups for all

measurements, performance of RT-qPCR with melting curve analyses and agarose electrophoreses of RT-qPCR products) are compiled in Supplementary Information 2 with Supplemental Tables S2 and S3, and Supplemental Figure S1. The validation methods according for the three circRNAs based on the on the RNase R approach, the cDNA synthesis with random hexamer primers and oligo(dT) primers, the Sanger sequencing, and characterization of PCR products using divergent and convergent primers [13] are summarized in Supplementary Information 3.

4.3. Statistics and Data Analysis

SPSS Version 25 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) with the bootstrap module, GraphPad Prism 8.1 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA), and MedCalc 19.0.6 (MedCalc Software, Ostend, Belgium) were used as statistical programs. $p < 0.05$ (two-sided) was considered statistically significant. Non-parametric tests (Mann-Whitney U-test, Kruskal-Wallis test, and Spearman rank correlation) for continuous data and Chi-squared or Fisher's exact tests for categorical data were applied. To obtain optimized cutoff-points of the circRNAs and linRNAs for the outcome assessments, the software X-tile was applied [33]. Kaplan-Meier and Cox proportional hazard regression analyses were used for survival analysis. C-statistics as ROCs with AUCs decision curve analysis [65,66] served to identify the discrimination/prediction capacity of the different variables and models. The Akaike and Bayesian information criteria were used for the model evaluation [35]. GPower 3.1.9.4 [67], GraphPad StatMate 2.0 (GraphPad Software), and MedCalc were used for sample size and power determinations. For the in-silico analysis of circRNAs, the prediction tool CircInteractome [36] was used and the subsequent miRNA-gene interactions for the predicted miRNAs were analyzed with the databases miRDB [38] and TargetScan [37]. TCGA-KIRC RNAseq data were downloaded and analyzed with R (version 3.6) using the "TCGA2stat" library and the "survival" library for Kaplan-Meier analysis.

5. Conclusions

This study was the first to identify differentially expressed circRNA candidates using a genome-wide approach that subsequently evaluated the candidates in terms of their prognostic potential in ccRCC patients. We showed that in combination with standard clinicopathological data, circRNA-based signatures improve prognostic accuracy when predicting CSS, RFS, and OS. Furthermore, we revealed potential functional relevance of circRNAs in ccRCC by exploring circRNA-miRNA-gene interactions. CircRNAs should be considered as potential prognostic biomarkers to improve risk stratification of ccRCC patients after nephrectomy. The further exploration of circRNA functions in ccRCC might lead to new findings regarding tumor biology and pathways.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Supplementary Information S1: Sample size and power calculations, Supplementary Information S2: RT-qPCR methodology, Supplementary Information S3: CircRNA validation methods, Supplementary Information S4: Associations between clinicopathological variables and circRNAs/linear transcripts, Supplementary Information S5: Cox regressions and Kaplan-Meier curves, Supplemental Microarray Excel File, Figure S1: Specificity of the circRNA RT-PCR products, Figure S2A-B: Kaplan-Meier curves of circRNAs and linRNAs, Figure S3A-C: Kaplan-Meier analysis using TCGA data, Figure S4A-C: Kaplan-Meier curves of clinicopathological factors, Table S1: MIQE checklist according to Bustin et al., Table S2: List of primers, Table S3: Characteristics of the PCR standard curves, Table S4: List of backsplice junctions and primers, Table S5: Associations of circRNAs and linear transcripts with clinicopathological variables, Table S6A: Correlation between circRNAs and linear transcripts in adjacent normal ccRCC tissue, Table S6B: Correlation between circRNAs and linear transcripts in malignant ccRCC samples, Table S6C: Significantly different correlation coefficients of circRNAs and linear transcripts between malignant and adjacent normal samples, Table S7: Univariate Cox regressions of circRNAs and linRNAs, Table S8: Univariate Cox regressions of clinicopathological factors, Table S9: Bootstrapping p-values of Cox regression analyses.

Author Contributions: Conceptualization, A.Fr., A.Fe. and K.J.; Data curation, A.Fr., S.W. and K.J.; Formal analysis, A.Fr., C.S. and A.Fe.; Funding acquisition, C.S., A.Fe. and K.J.; Investigation, A.Fr., S.W., M.J., H.R., A.E. and E.K.; Methodology, A.F., S.W., M.J. and K.J.; Project administration, B.R., S.W. and K.J.; Resources, B.R., C.S. and K.J.; Supervision, C.S., A.Fe. and K.J.; Validation, S.W., M.J. and H.R.; Visualization, A.Fr., S.W. and K.J.; Writing—original draft, A.Fr., M.J., A.Fe. and K.J.; Writing—review & editing, B.R., C.S., A.E., E.K. and A.Fe.

Funding: This research was funded by Foundation of Urologic Research, Berlin, Germany by a research fellowship (grant number BFIU2017/18-AF) to Antonia Franz.

Acknowledgments: The authors would like to thank Dr. Dieter Beule und Dr. Andranik Ivanov (Berlin Institute of Health, Bioinformatics Core Unit) for interpretation of the microarray data and for helpful discussion and feedback on this manuscript. The support of the study through the Foundation of Urologic Research, Berlin, Germany by a research fellowship to cand. med. Antonia Franz is greatly acknowledged. The authors thank Siegrun Blauhut and Silke Rabenhorst for valuable technical assistance. The German Research Foundation (DFG) and the Open Access Publication Fund of Charité–Universitätsmedizin Berlin supported the Open Access publication of this article. The results here are in part based upon data generated by the TCGA Research Network: <https://www.cancer.gov/tcga>.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Ljungberg, B.; Albiges, L.; Abu-Ghanem, Y.; Bensalah, K.; Dabestani, S.; Fernández-Pello, S.; Giles, R.H.; Hofman, F.; Hora, M.; Kuczyk, M.A.; et al. European Association of Urology Guidelines on Renal Cell Carcinoma: The 2019 Update. *Eur. Urol.* **2019**, *75*, 799–810.
2. Dabestani, S.; Beisland, C.; Stewart, G.D.; Bensalah, K.; Gudmundsson, E.; Lam, T.B.; Gietzmann, W.; Zakikhani, P.; Marconi, L.; Fernández-Pello, S.; et al. Long-term Outcomes of Follow-up for Initially Localised Clear Cell Renal Cell Carcinoma: RECUR Database Analysis. *Eur. Urol. Focus* **2018**, doi:10.1016/j.euf.2018.02.010.
3. Sun, M.; Shariat, S.F.; Cheng, C.; Ficarra, V.; Murai, M.; Oudard, S.; Pantuck, A.J.; Zigeuner, R.; Karakiewicz, P.I. Prognostic Factors and Predictive Models in Renal Cell Carcinoma: A Contemporary Review. *Eur. Urol.* **2011**, *60*, 644–661.
4. Tan, P.H.; Cheng, L.; Rioux-Leclercq, N.; Merino, M.J.; Netto, G.; Reuter, V.E.; Shen, S.S.; Grignon, D.J.; Montironi, R.; Egevad, L.; et al. Renal tumors: Diagnostic and prognostic biomarkers. *Am. J. Surg. Pathol.* **2013**, *37*, 1518–1531.
5. Klatte, T.; Seligson, D.B.; LaRochelle, J.; Shuch, B.; Said, J.W.; Riggs, S.B.; Zomorodian, N.; Kabinavar, F.F.; Pantuck, A.J.; Belldegrun, A.S. Molecular Signatures of Localized Clear Cell Renal Cell Carcinoma to Predict Disease-Free Survival after Nephrectomy. *Cancer Epidemiol. Prev. Biomark.* **2009**, *18*, 894–900.
6. Rini, B.; Goddard, A.; Knezevic, D.; Maddala, T.; Zhou, M.; Aydin, H.; Campbell, S.; Elson, P.; Koscielny, S.; Lopatin, M.; et al. A 16-gene assay to predict recurrence after surgery in localized renal cell carcinoma: Development and validation studies. *Lancet Oncol.* **2015**, *16*, 676–685.
7. Shi, D.; Qu, Q.; Chang, Q.; Wang, Y.; Gui, Y.; Dong, D. A five-long non-coding RNA signature to improve prognosis prediction of clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget* **2017**, *8*, 58699–58708.
8. Haddad, A.Q.; Luo, J.H.; Krabbe, L.M.; Darwish, O.; Gayed, B.; Youssef, R.; Kapur, P.; Rakheja, D.; Lotan, Y.; Sagalowsky, A.; et al. Prognostic value of tissue-based biomarker signature in clear cell renal cell carcinoma. *BJU Int.* **2017**, *119*, 741–747.
9. Ghatalia, P.; Rathmell, W.K. Systematic Review: ClearCode 34—A Validated Prognostic Signature in Clear Cell Renal Cell Carcinoma (ccRCC). *Kidney Cancer* **2018**, *2*, 23–29.
10. Zuo, S.; Wang, L.; Wen, Y.; Dai, G. Identification of a universal 6-lncRNA prognostic signature for three pathologic subtypes of renal cell carcinoma. *J. Cell. Biochem.* **2019**, *120*, 7375–7385.
11. Salzman, J.; Gawad, C.; Wang, P.L.; Lacayo, N.; Brown, P.O. Circular RNAs Are the Predominant Transcript Isoform from Hundreds of Human Genes in Diverse Cell Types. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e30733.
12. Franz, A.; Rabien, A.; Stephan, C.; Ralla, B.; Fuchs, S.; Jung, K.; Fendler, A. Circular RNAs: A new class of biomarkers as a rising interest in laboratory medicine. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2018**, *56*, 1992–2003.

13. Memczak, S.; Jens, M.; Elefsinioti, A.; Torti, F.; Krueger, J.; Rybak, A.; Maier, L.; Mackowiak, S.D.; Gregersen, L.H.; Munschauer, M.; et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature* **2013**, *495*, 333–338.
14. Hansen, T.B.; Jensen, T.I.; Clausen, B.H.; Bramsen, J.B.; Finsen, B.; Damgaard, C.K.; Kjems, J. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature* **2013**, *495*, 384–388.
15. Wang, K.; Sun, Y.; Tao, W.; Fei, X.; Chang, C. Androgen receptor (AR) promotes clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) migration and invasion via altering the circHIAT1/miR-195-5p/29a-3p/29c-3p/CDC42 signals. *Cancer Lett.* **2017**, *394*, 1–12.
16. Han, Z.; Zhang, Y.; Sun, Y.; Chen, J.; Chang, C.; Wang, X.; Yeh, S. ER β -mediated alteration of circATP2B1 and miR-204-3p signaling promotes invasion of clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Res.* **2018**, *78*, 2550–2563.
17. Zhou, B.; Zheng, P.; Li, Z.; Li, H.; Wang, X.; Shi, Z.; Han, Q. CircPCNXL2 sponges miR-153 to promote the proliferation and invasion of renal cancer cells through upregulating ZEB2. *Cell Cycle* **2018**, *17*, 2644–2654.
18. Huang, Y.; Zhang, Y.; Jia, L.; Liu, C.; Xu, F. Circular RNA ABCB10 promotes tumor progression and correlates with pejorative prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *Int. J. Boil. Markers* **2019**, *34*, 176–183.
19. Salzman, J.; Chen, R.E.; Olsen, M.N.; Wang, P.L.; Brown, P.O. Cell-Type Specific Features of Circular RNA Expression. *PLoS Genet.* **2013**, *9*, e1003777.
20. Maass, P.G.; Glažar, P.; Memczak, S.; Dittmar, G.; Hollfinger, I.; Schreyer, L.; Sauer, A.V.; Toka, O.; Aiuti, A.; Luft, F.C.; et al. A map of human circular RNAs in clinically relevant tissues. *J. Mol. Med.* **2017**, *95*, 1179–1189.
21. Szabo, L.; Salzman, J. Detecting circular RNAs: Bioinformatic and experimental challenges. *Nat. Rev. Genet.* **2016**, *17*, 679–692.
22. Glažar, P.; Papavasileiou, P.; Rajewsky, N. circBase: A database for circular RNAs. *RNA* **2014**, *20*, 1666–1670.
23. Campisano, S.; Bertran, E.; Caballero-Díaz, D.; La Colla, A.; Fabregat, I.; Chisari, A.N. Paradoxical role of the NADPH oxidase NOX4 in early preneoplastic stages of hepatocytes induced by amino acid deprivation. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Gen. Subj.* **2019**, *1863*, 714–722.
24. Crosas-Molist, E.; Bertran, E.; Rodriguez-Hernandez, I.; Herraiz, C.; Cantelli, G.; Fabra, A.; Sanz-Moreno, V.; Fabregat, I. The NADPH oxidase NOX4 represses epithelial to amoeboid transition and efficient tumour dissemination. *Oncogene* **2017**, *36*, 3002–3014.
25. Miiikkulainen, P.; Högel, H.; Seyednasrollah, F.; Rantanen, K.; Elo, L.L.; Jaakkola, P.M. Hypoxia-inducible factor (HIF)-prolyl hydroxylase 3 (PHD3) maintains high HIF2A mRNA levels in clear cell renal cell carcinoma. *J. Boil. Chem.* **2019**, *294*, 3760–3771.
26. Tanaka, T.; Torigoe, T.; Hirohashi, Y.; Sato, E.; Honma, I.; Kitamura, H.; Masumori, N.; Tsukamoto, T.; Sato, N. Hypoxia-inducible factor (HIF)-independent expression mechanism and novel function of HIF prolyl hydroxylase-3 in renal cell carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2014**, *140*, 503–513.
27. Zhang, C.S.; Liu, Q.; Li, M.; Lin, S.Y.; Peng, Y.; Wu, D.; Li, T.Y.; Fu, Q.; Jia, W.; Wang, X.; et al. RHOBTB3 promotes proteasomal degradation of HIF α through facilitating hydroxylation and suppresses the Warburg effect. *Cell Res.* **2015**, *25*, 1025–1042.
28. Jeck, W.R.; Sharpless, N.E. Detecting and characterizing circular RNAs. *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 453–461.
29. Starke, S.; Jost, I.; Rossbach, O.; Schneider, T.; Schreiner, S.; Hung, L.H.; Bindereif, A. Exon Circularization Requires Canonical Splice Signals. *Cell Rep.* **2015**, *10*, 103–111.
30. Jeck, W.R.; Sorrentino, J.A.; Wang, K.; Slevin, M.K.; Burd, C.E.; Liu, J.; Marzluff, W.F.; Sharpless, N.E. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA* **2013**, *19*, 141–157.
31. Memczak, S.; Papavasileiou, P.; Peters, O.; Rajewsky, N. Identification and Characterization of Circular RNAs As a New Class of Putative Biomarkers in Human Blood. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0141214.
32. Jung, M.; Ramankulov, A.; Roigas, J.; Johannsen, M.; Ringsdorf, M.; Kristiansen, G.; Jung, K. In search of suitable reference genes for gene expression studies of human renal cell carcinoma by real-time PCR. *BMC Mol. Boil.* **2007**, *8*, 47.
33. Camp, R.L. X-Tile: A New Bio-Informatics Tool for Biomarker Assessment and Outcome-Based Cut-Point Optimization. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 7252–7259.
34. Steyerberg, E.W.; Pencina, M.J.; Lingsma, H.F.; Kattan, M.W.; Vickers, A.J.; Van, C.B. Assessing the incremental value of diagnostic and prognostic markers: A review and illustration. *Eur. J. Clin. Investig.* **2012**, *42*, 216–228.

35. Wagenmakers, E.J.; Farrell, S. AIC model selection using Akaike weights. *Psychon. Bull. Rev.* **2004**, *11*, 192–196.
36. Dudekula, D.B.; Panda, A.C.; Grammatikakis, I.; De, S.; Abdelmohsen, K.; Gorospe, M. CircInteractome: A web tool for exploring circular RNAs and their interacting proteins and microRNAs. *RNA Biol.* **2016**, *13*, 34–42.
37. Agarwal, V.; Bell, G.W.; Nam, J.W.; Bartel, D.P. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife* **2015**, *4*, e05005.
38. Wong, N.; Wang, X. miRDB: An online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, D146–D152.
39. Littman, B.H.; Di, M.L.; Plebani, M.; Marincola, F.M. What's next in translational medicine? *Clin. Sci.* **2007**, *112*, 217–227.
40. Klatte, T.; Rossi, S.H.; Stewart, G.D. Prognostic factors and prognostic models for renal cell carcinoma: A literature review. *World J. Urol.* **2018**, *36*, 1943–1952.
41. Li, S.; Teng, S.; Xu, J.; Su, G.; Zhang, Y.; Zhao, J.; Zhang, S.; Wang, H.; Qin, W.; Lu, Z.J.; et al. Microarray is an efficient tool for circRNA profiling. *Brief. Bioinform.* **2018**, doi:10.1093/bib/bby006.
42. Tan, W.L.; Lim, B.T.; Anene-Nzelu, C.G.; Ackers-Johnson, M.; Dashi, A.; See, K.; Tiang, Z.; Lee, D.P.; Chua, W.W.; Luu, T.D.; et al. A landscape of circular RNA expression in the human heart. *Cardiovasc. Res.* **2017**, *113*, 298–309.
43. Chen, S.; Huang, V.; Xu, X.; Livingstone, J.; Soares, F.; Jeon, J.; Zeng, Y.; Hua, J.T.; Petricca, J.; Guo, H.; et al. Widespread and Functional RNA Circularization in Localized Prostate Cancer. *Cell* **2019**, *176*, 831–843.
44. Siede, D.; Rapti, K.; Gorska, A.; Katus, H.; Altmüller, J.; Boeckel, J.; Meder, B.; Maack, C.; Völkens, M.; Müller, O.; et al. Identification of circular RNAs with host gene-independent expression in human model systems for cardiac differentiation and disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2017**, *109*, 48–56.
45. Vo, J.N.; Cieslik, M.; Zhang, Y.; Shukla, S.; Xiao, L.; Zhang, Y.; Wu, Y.M.; Dhanasekaran, S.M.; Engelke, C.G.; Cao, X.; et al. The Landscape of Circular RNA in Cancer. *Cell* **2019**, *176*, 869–881.
46. Cieslik, M.; Chugh, R.; Wu, Y.M.; Wu, M.; Brennan, C.; Lonigro, R.; Su, F.; Wang, R.; Siddiqui, J.; Mehra, R.; et al. The use of exome capture RNA-seq for highly degraded RNA with application to clinical cancer sequencing. *Genome Res.* **2015**, *25*, 1372–1381.
47. Gerszten, R.E.; Wang, T.J. The search for new cardiovascular biomarkers. *Nature* **2008**, *451*, 949–952.
48. Ralla, B.; Busch, J.; Flörcken, A.; Westermann, J.; Zhao, Z.; Kilic, E.; Weickmann, S.; Jung, M.; Fendler, A.; Jung, K. miR-9-5p in Nephrectomy Specimens is a Potential Predictor of Primary Resistance to First-Line Treatment with Tyrosine Kinase Inhibitors in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Cancers* **2018**, *10*, 321.
49. Steyerberg, E.W.; E Harrell, F.; Borsboom, G.J.; Eijkemans, M.J.; Vergouwe, Y.; Habbema, J.D. Internal validation of predictive models: Efficiency of some procedures for logistic regression analysis. *J. Clin. Epidemiol.* **2001**, *54*, 774–781.
50. Meng, S.; Zhou, H.; Feng, Z.; Xu, Z.; Tang, Y.; Li, P.; Wu, M. CircRNA: Functions and properties of a novel potential biomarker for cancer. *Mol. Cancer* **2017**, *16*, 94.
51. Hansen, T.B.; Kjems, J.; Damgaard, C.K. Circular RNA and miR-7 in cancer. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 5609–5612.
52. Cheng, Z.; Yu, C.; Cui, S.; Wang, H.; Jin, H.; Wang, C.; Li, B.; Qin, M.; Yang, C.; He, J.; et al. circTP63 functions as a ceRNA to promote lung squamous cell carcinoma progression by upregulating FOXM1. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 3200.
53. Lu, Q.; Liu, T.; Feng, H.; Yang, R.; Zhao, X.; Chen, W.; Jiang, B.; Qin, H.; Guo, X.; Liu, M.; et al. Circular RNA circSLC8A1 acts as a sponge of miR-130b/miR-494 in suppressing bladder cancer progression via regulating PTEN. *Mol. Cancer* **2019**, *18*, 111.
54. Högel, H.; Miiikkulainen, P.; Bino, L.; Jaakkola, P.M. Hypoxia inducible prolyl hydroxylase PHD3 maintains carcinoma cell growth by decreasing the stability of p27. *Mol. Cancer* **2015**, *14*, 143.
55. Li, Y.; Quan, J.; Chen, F.; Pan, X.; Zhuang, C.; Xiong, T.; Zhuang, C.; Li, J.; Huang, X.; Ye, J.; et al. MiR-31-5p acts as a tumor suppressor in renal cell carcinoma by targeting cyclin-dependent kinase 1 (CDK1). *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *111*, 517–526.
56. Lin, H.; Huang, Z.P.; Liu, J.; Qiu, Y.; Tao, Y.P.; Wang, M.C.; Yao, H.; Hou, K.Z.; Gu, F.M.; Xu, X.F. MiR-494-3p promotes PI3K/AKT pathway hyperactivation and human hepatocellular carcinoma progression by targeting PTEN. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 10461.

57. Wang, J.; Chen, H.; Liao, Y.; Chen, N.; Liu, T.; Zhang, H.; Zhang, H. Expression and clinical evidence of miR-494 and PTEN in non-small cell lung cancer. *Tumor Boil.* **2015**, *36*, 6965–6972.
58. Bustin, S.A.; Benes, V.; Garson, J.A.; Huggett, J.; Kubista, M.; Mueller, R.; Nolan, T.; Pfaffl, M.W.; Shipley, G.L.; Vandesompele, J.; et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* **2009**, *55*, 611–622.
59. Altman, D.G.; McShane, L.M.; Sauerbrei, W.; Taube, S.E. Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK): Explanation and elaboration. *PLoS Med.* **2012**, *9*, e1001216.
60. Bossuyt, P.M.; Reitsma, J.B.; Bruns, D.E.; Gatsonis, C.A.; Glasziou, P.P.; Irwig, L.; Lijmer, J.G.; Moher, D.; Rennie, D.; De Vet, H.C.; et al. STARD 2015: An Updated List of Essential Items for Reporting Diagnostic Accuracy Studies. *Radiology* **2015**, *277*, 826–832.
61. Jung, M.; Mollenkopf, H.J.; Grimm, C.; Wagner, I.; Albrecht, M.; Waller, T.; Pilarsky, C.; Johannsen, M.; Stephan, C.; Lehrach, H.; et al. MicroRNA profiling of clear cell renal cell cancer identifies a robust signature to define renal malignancy. *J. Cell. Mol. Med.* **2009**, *13*, 3918–3928.
62. Wotschofsky, Z.; Meyer, H.A.; Jung, M.; Fendler, A.; Wagner, I.; Stephan, C.; Busch, J.; Erbersdobler, A.; Disch, A.C.; Mollenkopf, H.J.; et al. Reference genes for the relative quantification of microRNAs in renal cell carcinomas and their metastases. *Anal. Biochem.* **2011**, *417*, 233–241.
63. Ralla, B.; Magheli, A.; Kempkensteffen, C.; Miller, K.; Jung, M.; Trujillo, E.; Wotschofsky, Z.; Kilic, E.; Fendler, A.; Jung, K.; et al. 773 Piwi-interacting RNAs as novel prognostic markers in clear cell renal cell carcinomas. *Eur. Urol. Suppl.* **2015**, *14*, e773.
64. Untergasser, A.; Cutcutache, I.; Koressaar, T.; Ye, J.; Faircloth, B.C.; Remm, M.; Rozen, S.G. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, e115.
65. Vickers, A.J.; Elkin, E.B. Decision curve analysis: A novel method for evaluating prediction models. *Med. Decis. Mak.* **2006**, *26*, 565–574.
66. Stephan, C.; Jung, K.; Semjonow, A.; Schulze-Forster, K.; Cammann, H.; Hu, X.; Meyer, H.A.; Bogemann, M.; Miller, K.; Friedersdorff, F. Comparative assessment of urinary prostate cancer antigen 3 and TMPRSS2:ERG gene fusion with the serum [-2]prostate-specific antigen-based prostate health index for detection of prostate cancer. *Clin. Chem.* **2013**, *59*, 280–288.
67. Faul, F.; Erdfelder, E.; Lang, A.G.; Buchner, A. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav. Res. Methods* **2007**, *39*, 175–191.



© 2019 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 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

15. Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

16. Publikationsliste

Originalarbeit

1. **Franz A**, Ralla B, Weickmann S, Jung M, Rochow H, Stephan C, Erbersdobler A, Kilic E, Fendler A, Jung K. Circular RNAs in clear cell renal cell carcinoma: Their microarray-based identification, analytical validation, and potential use in a clinico-genomic model to improve prognostic accuracy. *Cancers (Basel)*. 2019;11(10):1473. [Impact Factor 2018: 6.162]

Übersichtsarbeit

1. **Franz A**, Rabien A, Stephan C, Ralla B, Fuchs S, Jung K, Fendler A. Circular RNAs: a new class of biomarkers as a rising interest in laboratory medicine. *Clin Chem Lab Med*. 2018;56(12):1992-2003. [Impact Factor 2017: 3.556]

Vortrag

1. **Franz A**, Ralla B, Rabien A, Beule D, Jung K, Ivanov A. CircRNAs in urological tumors: Identification of potential biomarkers. [Abstract V5.5: Urologe 2017] 9. Symposium „Urologische Forschung“ der Deutschen Gesellschaft für Urologie, Freiburg 16.-18.11.2017

17. Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Stefan Loening, Prof. Dr. Dietmar Schnorr und allen Mitgliedern der Stiftung Urologische Forschung. Das Promotionsstipendium der Stiftung Urologische Forschung hat mir die großartige Möglichkeit eröffnet, während eines Freisemesters an meinem Forschungsprojekt zu arbeiten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus Jung für die hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit. Sein unermüdliches Engagement und seine Begeisterung für die medizinische Forschung bestärken mich immer wieder darin meine eigene wissenschaftliche Arbeit fortzuführen.

Ich bedanke mich herzlich bei allen Mitarbeiterinnen der urologischen Forschungsabteilung für die freundliche Zusammenarbeit in der Forschungsgruppe. Insbesondere bedanke ich mich bei Frau Dr. Monika Jung und Frau Dr. Annika Fendler für die wertvollen wissenschaftlichen Diskussionen und bei Frau Sabine Weickmann und Frau Silke Rabenhorst für ihre geduldigen Erklärungen, für die große Hilfsbereitschaft und ihren motivierenden Zuspruch. Frau Hannah Rochow danke ich für ihre Anmerkungen zu dieser Arbeit und wünsche ihr ganz viel Erfolg für die Fertigstellung ihres circRNA-Projekts.

Gleichfalls möchte ich Herrn PD Dr. Jonas Busch und Herrn Dr. Bernhard Ralla aus der Klinik für Urologie für ihre Betreuung und fachliche Unterstützung danken.

Nicht zuletzt sei auch Herrn Dr. Dieter Beule und Herrn Dr. Andranik Ivanov (Berlin Institute of Health) herzlich für die freundliche Zusammenarbeit und Beratung gedankt. Ich danke all den Menschen, deren Zuspruch und Unterstützung mich jeden Tag begleiten: meinem Mann Julian, meiner Familie und meinen Freunden.