

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

DISSERTATION

Zirkuläre RNAs und ihre linearen Transkripte als diagnostische  
und prognostische Gewebebiomarker beim Prostatakarzinom

Circular RNAs and Their Linear Transcripts as Diagnostic and  
Prognostic Tissue Biomarkers in Prostate Cancer

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Hannah Rochow

aus Nürnberg

Datum der Promotion: 4. März 2022

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>3</b>
<b>2.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>4</b>
<b>3.</b>	<b>Abstract.....</b>	<b>6</b>
3.1.	Deutsch .....	6
3.2.	Englisch .....	7
<b>4.</b>	<b>Einführung und Zielsetzung .....</b>	<b>8</b>
<b>5.</b>	<b>Studiendesign, Material und Methoden.....</b>	<b>10</b>
5.1.	Studiendesign.....	10
5.2.	Patienten und Gewebeproben.....	11
5.3.	RNA - Isolierung und Eigenschaften .....	12
5.4.	Microarray-Analyse.....	13
5.5.	circRNA-Validierung und RT-qPCR-Analytik.....	13
5.6.	Datenanalyse.....	14
<b>6.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>15</b>
6.1.	Identifikation und Auswahl der circRNAs mittels Microarray-Analyse .....	15
6.2.	Validierung der ausgewählten circRNAs und der RT-qPCR-Assays.....	16
6.2.1.	Validierung der zirkulären Struktur .....	16
6.2.2.	Etablierung und Evaluierung der RT-qPCR-Assays als geeignete Messmethoden .....	17
6.3.	Untersuchungen zur klinischen Validität.....	18
6.3.1.	circRNAs und ihre Beziehung zu klinisch-pathologischen Parametern.....	18
6.3.2.	circRNAs und linRNAs als Differenzierungsmarker zwischen Tumor und Normalgewebe .....	21
6.3.3.	circRNAs und linRNAs als Prognosemarker eines biochemischen Rezidivs.....	22
6.3.4.	Kombination von klinisch-pathologischen Parametern und RNA-Signatur zur verbesserten Vorhersage eines biochemischen Rezidivs .....	24

7.	<b>Diskussion .....</b>	<b>25</b>
8.	<b>Quellenverzeichnis .....</b>	<b>33</b>
9.	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>39</b>
10.	<b>Anteilserklärung .....</b>	<b>40</b>
11.	<b>Auszug aus der Journal Summary List .....</b>	<b>41</b>
12.	<b>Zugrundeliegende Publikation .....</b>	<b>45</b>
13.	<b>Curriculum Vitae .....</b>	<b>77</b>
14.	<b>Publikationsliste .....</b>	<b>78</b>
15.	<b>Danksagung .....</b>	<b>79</b>

## 1. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<b>Abbildung 1: Flussdiagramm des Studiendesigns in 3 Phasen</b> .....	11
<b>Abbildung 2: Volcano Plot der circRNAs aus dem Mikroarray</b> .....	16
<b>Abbildung 3: Nachweis der zirkulären Struktur</b> .....	17
<b>Abbildung 4: Expression der circRNAs und linRNAs</b> .....	20
<b>Abbildung 5: ROC-Kurvenanalyse und Entscheidungskurvenanalyse</b> .....	22
<b>Tabelle 1. Klinisch-pathologische Eigenschaften der Studienpopulation</b> .....	12
<b>Tabelle 2. Intraserielle und interserielle Präzision der RT-qPCR-Assays</b> .....	18
<b>Tabelle 3. Univariable und multivariable Cox-Regressionsanalysen zur Vorhersage eines biochemischen Rezidivs mit circRNAs und deren linearen Transkripten</b> .....	23
<b>Tabelle 4. Ermittlung einer RNA Signatur zur Vorhersage eines biochemischen Rezidivs durch Cox-Regressionsanalyse mit circRNAs und linRNAs</b> .....	24
<b>Tabelle 5. Verbesserte Vorhersage eines biochemischen Rezidivs durch Kombination der RNA-Signatur mit Modellen, die auf klinisch-pathologischen Parametern basieren</b>	25

## 2. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATXN10	Ataxin 10
AUC	Fläche unter der Kurve (area under the curve)
BCR	biochemisches Rezidiv
bzw.	beziehungsweise
CAPRAS	Cancer of the Prostate Risk Assessment Postsurgical Score
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary DNA)
CI	Konfidenzintervall (confidence interval)
circATXN10	circBase ID hsa_circ_0001246
circCRIM1	circBase ID hsa_circ_0007386
circCSNK1G3	circBase ID hsa_circ_0001522
circFOXO3	circBase ID hsa_circ_0006404
circGUCY1A2	circBase ID hsa_circ_0008602
circLPP	circBase ID hsa_circ_0003759
circNEAT1	circBase ID hsa_circ_0000324
circRHOBTB3	circBase ID hsa_circ_0007444
circRNA	zirkuläre Ribonukleinsäure (circular ribonucleic acid)
circSTIL	circBase ID hsa_circ_0000069
Cq	quantification cycle
CRIM1	Cystein rich transmembrane BMP regulator 1
CSNK1G3	Casein kinase 1 gamma 3
DRU	digital rektale Untersuchung
d.h.	das heißt
et al.	et alii
FOXO3	Forkhead box O3
GUCY1A2	Guanylate cyclase 1 soluble subunit alpha 2
HR	Hazard Ratio
IQR	Interquartilsabstand (interquartile range)
ISUP	International Society of Urologic Pathology /Internationale Gesellschaft für urologische Pathologie
linATXN10	NCBI Referenzsequenz NM_013236.4
linCRIM1	NCBI Referenzsequenz NM_016441.3
linCSNK1G3	NCBI Referenzsequenz NM_001044723.2
linGUCY1A2	NCBI Referenzsequenz NM_000855.3
linLPP	NCBI Referenzsequenz NM_005578.5
linNEAT1	NCBI Referenzsequenz NR_131012.1
linRHOBTB3	NCBI Referenzsequenz NM_014899.4

linRNA	lineare Ribonukleinsäure
linSTIL	NCBI Referenzsequenz NM_001282936.1
lncRNA	long non-coding RNA
LPP	LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma
MIQE	Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments
miRNA	micro RNA
mRNA	messenger RNA
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NEAT1	Nuclear paraspeckle assembly transcript 1
o.g.	oben genannt
PK	Prostatakarzinom
PSA	prostataspezifisches Antigen
REMARK	Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies
RHOBTB3	Rho related BTB domain containing 3
RIN	RNA-Integrität-Wert (RNA Integrity Number)
RNase R	Ribonuklease R
ROC	Receiver-Operating-Characteristics
RT-qPCR	Reverse Transkription Quantitative Polymerase Chain Reaction
SD	Standardabweichung
sog.	sogenannt
STARD	Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy Studies
STIL	STIL centriolar assembly protein
T/N	Tumorgewebe/Normalgewebe
UICC	Union Internationale Contre le Cancer/Internationale Vereinigung gegen Krebs
WHO	World Health Organization/Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel
%RSD	prozentuale relative Standardabweichung

### 3. Abstract

#### 3.1. Deutsch

**Einleitung:** Zirkuläre RNAs (circRNA) sind eine neue Klasse von Biomarkern, deren Rolle in der Tumorbilogie erst kürzlich entdeckt wurde. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob circRNAs als Biomarker beim Prostatakarzinom (PK) geeignet sind. Insbesondere soll deren Potenzial und das ihrer linearen Transkripte zur Unterscheidung zwischen Normal- und Tumorgewebe sowie zur Vorhersage des biochemischen Rezidivs (BCR) dargelegt werden.

**Methodik:** Zuerst wurden differenziell exprimierte circRNAs mittels Mikroarray in einem Screeningverfahren identifiziert. Acht ausgewählte circRNAs (circATXN10, circCRIM1, circCSNK1G3, circGUCY1A2, circLPP, circNEAT1, circRHOBTB3, circSTIL) und ihre linearen Transkripte wurden validiert und dafür spezifische RT-qPCR-Assays etabliert. Im Anschluss wurde die Expression der circRNAs und ihrer linearen Transkripte (linRNA) im Tumorgewebe von 115 Patienten nach radikaler Prostatektomie bestimmt, wovon in 79 Fällen auch benachbartes Normalgewebe untersucht wurde. Für die Patientenkohorte wurde eine Datenbank mit allen klinisch-pathologischen Kenngrößen erstellt. Die statistische Auswertung der Expressionsdaten in Zusammenhang mit den klinisch-pathologischen Variablen erfolgte mittels parameterfreier Tests sowie "Receiver-Operating-Characteristics"- und "Decision-Curve"-Analysen, univariablen und multivariablen Cox-Regressionen mit interner Validierung durch Bootstrapping.

**Ergebnisse:** Zur Unterscheidung zwischen Tumor- und Normalgewebe eignete sich die Kombination von circATXN10 und linSTIL am besten. Zur Vorhersage des BCR war es die Kombination von linGUCY1A2, linNEAT1 und linSTIL. Diese RNA-Signatur konnte die Vorhersagegenauigkeit des BCR von fünf bereits etablierten klinisch-pathologischen Referenzmodellen erhöhen, indem sie mit ihnen kombiniert wurde.

**Schlussfolgerung:** Diese explorative Untersuchung von circRNAs und linRNAs beim PK zeigt deren vielversprechendes Potenzial als klinische Biomarker und eröffnet neue Möglichkeiten, etablierte klinisch-pathologische Referenzmodelle zu ergänzen und zu verbessern.

### 3.2. Englisch

**Introduction:** Circular RNAs (circRNA) are a class of novel biomarkers, that have recently been proven to play a major role in tumor biology. This study was designed to explore the potential of circRNAs as biomarkers in prostate cancer (PK). In particular their ability to discriminate malignant from normal tissue and to predict biochemical recurrence (BCR) in PK was to be evaluated.

**Methods:** First of all, Microarray analysis was used to identify differentially expressed circRNAs. Eight circRNAs (circATXN10, circCRIM1, circCSNK1G3, circGUCY1A2, circLPP, circNEAT1, circRHOBTB3, circSTIL) were selected for further evaluation and specific RT-qPCR assays for circRNAs and their linear transcripts (linRNA) were designed. Subsequently the expression of circRNAs and linRNAs was measured in malignant tissue samples of 115 patients undergoing radical prostatectomy, in 79 cases adjacent normal tissue was evaluated as well. A database containing clinicopathological patient characteristics was created. For statistical assessment of the expression data and clinicopathological factors non-parametric test were used. Testing included receiver operating characteristics (ROC) curves, decision curve analyses, univariable and multivariable Cox regression analyses including internal validation by bootstrapping.

**Results:** The combination of circATXN10 and linSTIL proved best to discriminate between malignant and normal prostate tissue. linGUCY1A2 combined with linNEAT1 and linSTIL was most suitable to predict BCR. Combining the RNA signature with five clinicopathological-based models was shown to improve the accuracy of BCR prediction of these models.

**Conclusion:** This explorative study demonstrates the very promising potential of circRNAs and linRNAs as clinical biomarkers in PK and introduces new possibilities to complement and improve established clinicopathological variables.



## 4. Einführung und Zielsetzung

Zirkuläre Ribonukleinsäuren (circRNAs) sind eine neue Klasse von Ribonukleinsäuren (RNA), die in den letzten Jahren besonderes Interesse in der Grundlagenforschung und nun auch vermehrt in der klinischen Forschung gefunden haben. Anders als bei linearer mRNA mit einem 5'-Ende an der einen Seite und einem 3'-Ende an der anderen Seite, bilden das 3'- und 5'-Ende bei circRNAs eine sogenannte backsplice junction durch deren Verbindung die beiden Enden der RNA sich zu einem Ring schließen (1). Die Zirkularität verleiht dieser RNA-Klasse einige besondere Eigenschaften, wie deren Resistenz gegenüber RNA-abbauenden Enzymen, die durch das Fehlen des polaren Aufbaus und die Abwesenheit eines Poly-A-Schwanzes bedingt sind (1, 2).

Die Expressionsmuster der circRNAs sind sowohl gewebe- als auch zellspezifisch. CircRNAs können durch spezifische Bindung einzelner microRNAs (miRNAs) als "Schwämme" für miRNAs fungieren und so die Expression von Zielgenen der miRNAs verändern (3-5). Dadurch beeinflussen sie entscheidende physiologische und pathologische zelluläre Prozesse, wie z.B. die Regulation des Zellzyklus (4, 6, 7). Expressionsveränderungen der circRNAs können zur Entstehung und Progression von malignen Tumorerkrankungen beitragen. Hierbei kann die Expression der einzelnen circRNAs erhöht oder auch erniedrigt sein. In verschiedenen Krebsarten, wie beispielsweise beim hepatozellulären Karzinom, beim Magenkarzinom und beim kolorektalen Karzinom, konnte der Einfluss von circRNAs auf Tumorwachstum und Apoptoseprozesse gezeigt werden (8-10). Auch circRNAs im Prostatakarzinom (PK) sind gegenwärtig Forschungsgegenstand in verschiedenen Studien. Neben weiteren circRNAs wurde letztes Jahr circCSNK1G3 im PK identifiziert und ihre mögliche Funktion als Aktivator der Zellproliferation nachgewiesen (11). Eine weitere circRNA, die auch im letzten Jahr im PK entdeckt wurde, ist circGUCY1A2. Des Weiteren wurden in verschiedenen PK-Zelllinien Hinweise dafür gefunden, dass circGUCY1A2 als Modulator der Tumorprogression wirken könnte (12).

Weltweit erkranken jährlich 1,6 Millionen Männer am PK und der Tumor ist die Ursache von 366 000 Todesfällen pro Jahr (13). Die radikale Prostatektomie gilt neben der Radiotherapie als kurative Therapieoption beim lokalisierten PK (14). Als erstes Anzeichen eines Krankheitsrückfalls nach primär erfolgreicher Operation wird der Wiederanstieg des prostataspezifischen Antigens (PSA) gewertet. Dies wird als biochemisches Rezidiv (BCR) bezeichnet (15). BCR nach radikaler Prostatektomie ist als

Anstieg des PSA-Nadirs im Serum auf  $>0,2 \mu\text{g/L}$  definiert (16). Im Zeitraum von fünf bis zehn Jahren entwickelt ein Anteil von 15-34 % der Patienten postoperativ ein BCR (17). In Patientenkohorten mit BCR zeigen etwa 30 % der Patienten im Verlauf ohne weitere Therapie Fernmetastasen und 19-27 % versterben innerhalb der nächsten 10 Jahre (18, 19).

Im klinischen Alltag werden verschiedene Variablen, wie beispielsweise der histologische Differenzierungsgrad des Tumors (Gleason-Score bzw. seit 2014 ISUP-Gruppen entsprechend der Empfehlung der International Society of Urologic Pathology), das Tumorstadium oder der präoperative PSA-Wert einzeln oder in Modellen kombiniert zur Vorhersage eines möglichen BCR herangezogen. Zu diesen Modellen zählen die von D'Amico et al. (20), Stephenson et al. (21) und vom National Comprehensive Cancer Network (NCCN) (22) erarbeiteten Modelle sowie der Cancer of the Prostate Risk Assessment Postsurgical Score (CAPRAS) (23). Aus diesen Modellen resultieren Entscheidungen zur weiteren Verlaufskontrolle bzw. für zusätzliche Therapiemaßnahmen. Diese nur auf klinisch-pathologischen Variablen beruhenden Vorhersagemodelle sind hinsichtlich ihrer diagnostischen Präzision jedoch limitiert (24-27). Folglich ist eine verbesserte Prädiktion des BCR eine dringende Forderung für die Patientenbetreuung. Dies kann durch Einsatz von molekularen Markern erreicht werden (28, 29). Letztes Jahr konnte unsere Arbeitsgruppe bereits drei differenziell exprimierte circRNAs im Nierenzellkarzinom identifizieren und deren Potential als prognostische Biomarker zeigen (30).

Ergebnisse, die unsere Arbeitsgruppe mit circRNAs als diagnostische und prognostische Biomarker beim Nierenzellkarzinom gewinnen konnte, waren der Anlass, circRNAs auch beim PK hinsichtlich ihrer klinischen Validität zu überprüfen. Untersuchungen dazu lagen zu Beginn dieser Doktorarbeit nicht vor. Mit der vorliegenden Doktorarbeit werden nachfolgende Ziele verfolgt:

- Identifikation von differenziell exprimierten circRNAs im PK-Gewebe mit Hilfe eines Screeningverfahrens der Microarray-Technologie zur Selektion geeigneter circRNAs für weitere Untersuchungen
- Experimentelle Validierung der circRNAs und Etablierung von RT-qPCR-Methoden zur Bestimmung der circRNAs und ihrer linearen Transkripte
- Ermittlung der Expressionsdaten der circRNAs und ihrer linearen Transkripte im Tumor- und Normalgewebe, ihre Korrelationen zu klinisch-pathologischen Variablen und ihre Diskriminationsfähigkeit zwischen Tumor- und Normalgewebe

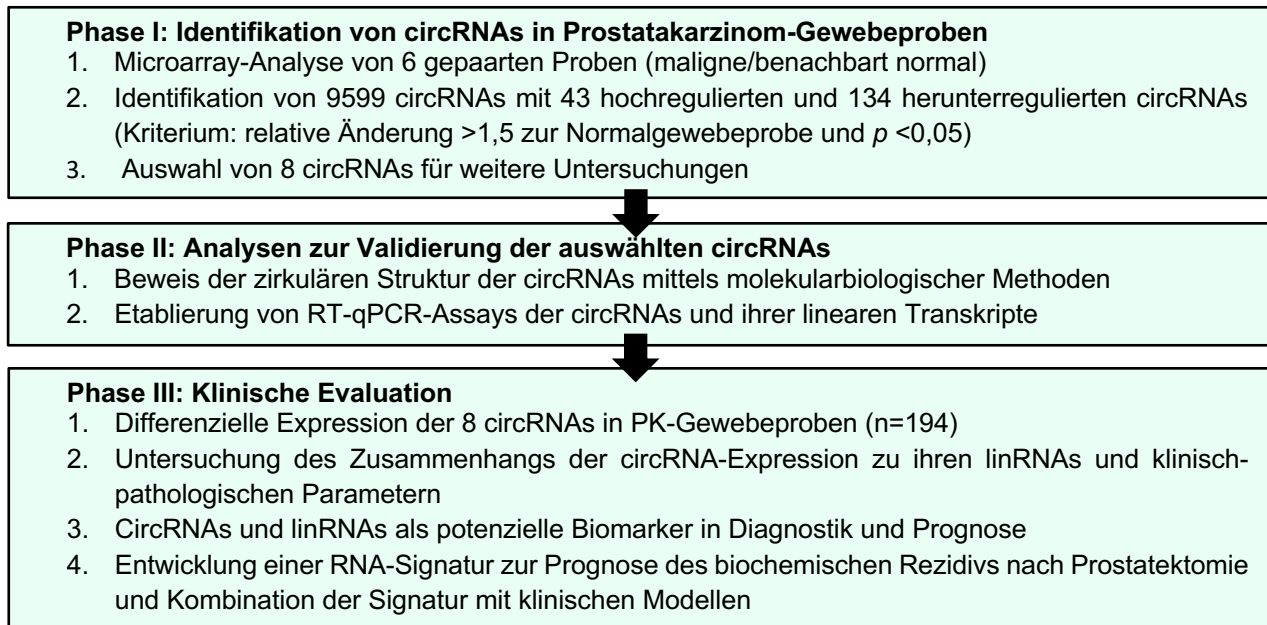
- Nachweis der circRNAs und linearen Transkripte als Prädiktoren eines biochemischen Rezidivs im Vergleich und in Kombination mit klinisch-pathologischen Variablen etablierter Vorhersagemodelle

Da es keine einheitliche Nomenklatur der circRNAs gibt (30), werden die RNAs im Folgenden nach ihrem Ursprungsgen benannt und mit dem Präfix „circ-“ für zirkuläre RNAs oder „lin-“ für die entsprechenden linearen Transkripte versehen. Die entsprechenden Bezeichnungen aus der circBase-Datenbank und die NCBI Zugangsnummer der Gene können dem Abkürzungsverzeichnis entnommen werden.

## **5. Studiendesign, Material und Methoden**

### 5.1. Studiendesign

Die Studie war entsprechend den dargelegten Zielstellungen in drei Phasen gegliedert (Abb. 1): In einer ersten "Entdeckungsphase" wurden zahlreiche differenziell exprimierte circRNAs als mögliche Kandidaten für die Studie identifiziert und anschließend auf acht circRNAs mit ihren linearen Transkripten eingegrenzt. In der folgenden zweiten Phase wurden die ausgewählten circRNAs analytisch validiert und spezifische RT-qPCR-Assays für die circRNAs und die dazugehörigen linRNAs etabliert. Zuletzt folgte in einer dritten Phase die klinische Evaluation der circRNAs und ihrer linRNAs.



**Abbildung 1: Flussdiagramm des Studiendesigns in 3 Phasen**

Darstellung übersetzt und entnommen der Originalpublikation (31).

## 5.2. Patienten und Gewebeproben

Untersucht wurden 115 Patienten mit PK, die zwischen 2007 und 2014 als erste Therapiemaßnahme radikal prostatektomiert wurden. Anamnestische, klinische und pathohistologische Daten sowie Nachsorgedaten wurden durch Einsicht in medizinische Akten und in Telefonaten mit Patienten, Angehörigen und deren betreuenden Urologen bis November 2019 gesammelt und in einer Datenbank dokumentiert. Die klinisch-pathologischen Eigenschaften der Patientenkohorte können Tabelle 1 entnommen werden. Insgesamt wurden 194 Gewebeproben analysiert, wovon 79 Paare von malignem und von benachbartem normalen Gewebe waren. Von den 115 eingeschlossenen Patienten wiesen 39 im Verlauf nach der Prostatektomie ein BCR auf. Ein Wiederanstieg der PSA-Konzentration im Serum  $>0,2 \mu\text{g/L}$  mit mindestens zwei nachfolgenden bestätigten Werten wurde, wie bereits einleitend erwähnt, als BCR definiert.

Die Forschungsstudie wurde von der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin bewilligt (EA1/134/12). Die Patienten wurden sowohl mündlich als auch schriftlich über die Studienteilnahme aufgeklärt und stimmten schriftlich der Verwendung des entnommenen Materials zu.

Die Gewebeproben wurden entweder direkt nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert oder alternativ in einem RNA-Stabilisierungsreagenz bei  $-20^{\circ}\text{C}$  asserviert. Die pathohistologische Beurteilung erfolgte

durch zwei erfahrene Uropathologen unter Beachtung der Kriterien der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) sowie der WHO (World Health Organization) und der ISUP (International Society of Urological Pathology).

**Tabelle 1.** Klinisch-pathologische Eigenschaften der Studienpopulation.

Eigenschaft	Alle Patienten	Patienten mit BCR	Patienten ohne BCR	p-Wert <sup>a</sup>
Patienten, no. (%)	115 (100)	39 (34)	76 (66)	
Alter, Median Jahre, (IQR)	67 (62–70)	66 (59–71)	67 (64–70)	0,339
PSA, µg/L (IQR)	7,7 (5,4–12,2)	9,7 (6,1–19,5)	7,0 (5,4–9,5)	0,011
Prostatavolumen, cm <sup>3</sup> (IQR)	32 (25–45)	30 (23–39)	33 (26–45)	0,264
DRU, no. (%)				0,067
Unauffällig	67 (58)	17 (44)	50 (66)	
Auffällig	32 (28)	14 (36)	18 (24)	
Keine Angabe	16 (14)	8 (20)	8 (10)	
pT Status, no. (%)				0,005
pT1c	1 (1)	0	1 (1)	
pT2a	2 (2)	0	2 (3)	
pT2b	1 (1)	0	1 (1)	
pT2c	61 (53)	13 (33)	48 (63)	
pT3a	27 (23)	11 (28)	16 (21)	
pT3b	23 (20)	15 (39)	8 (11)	
ISUP Gruppe, no. (%)				0,0001
1	26 (23)	2 (5)	24 (31)	
2	47 (41)	13 (33)	34 (45)	
3	30 (26)	14 (36)	16 (21)	
4	4 (3)	4 (11)	0 (0)	
5	8 (7)	6 (15)	2 (3)	
pN Status, no. (%)				0,017
pN0/Nx	109 (95)	34 (87)	75 (99)	
pN1	6 (5)	5 (13)	1 (1)	
Resektionsstatus, no. (%)				0,030
Negativ	64 (56)	16 (41)	48 (63)	
Positiv	51 (44)	23 (59)	28 (37)	
Follow-up nach OP				< 0,0001
Median Monate (IQR)	41 (26–72)	19,9 (9,8–41)	52 (38–80)	

Abkürzungen: BCR, Biochemisches Rezidiv; CI, Konfidenzintervall; DRU, digital rektale Untersuchung; IQR, Interquartilsabstand; ISUP Gruppen, Histopathologisches Klassifizierungssystem basierend auf dem Gleason Score nach der International Society of Urologic Pathology; pN, Lymphknotenstatus; PSA, Gesamt prostataspezifisches Antigen vor Operation; pT, pathologische Tumorklassifikation. <sup>a</sup> p-Werte (Mann-Whitney U Test; Chi-Quadrat oder Fisher-test) zeigen die Assoziation der klinisch-pathologischen Variablen zu den Patienten mit bzw. ohne BCR. Die Tabelle ist übersetzt und der Originalpublikation entnommen (31).

### 5.3. RNA - Isolierung und Eigenschaften

Die Gewebeproben wurden per Stanze aus pathohistologisch bestätigten benignen bzw. malignen Geweberealen entnommen und anschließend mit dem TissueLyser (Qiagen, Hilden, Deutschland) homogenisiert. Die Gesamt-RNA wurde mithilfe des miRNeasy-Mini-Kits (Qiagen) und einem zusätzlichen DNA-Verdau isoliert. Im Anschluss erfolgte

die quantitative Bestimmung und qualitative Beurteilung der isolierten RNA-Proben am NanoDrop 1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) und am Bioanalyzer 2100 mit dem Agilent 6000 Nano Chip Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Die Konzentration und der RIN-Wert der Proben lagen im Median bei 1096 ng/ $\mu$ L bzw. 7,00.

#### 5.4. Microarray-Analyse

Die Microarray-Analyse wurde als Auftragsleistung von der Firma ArrayStar Inc. (Rockville, MD, USA) durchgeführt. Dabei wurden sechs RNA-Probenpaare analysiert. Ein Paar bestand jeweils aus einer Tumorgewebeprobe sowie aus entsprechenden benachbarten normalen Gewebe. Die RNA-Proben wurden vor der Microarray-Analyse mit RNase R behandelt, sodass lineare RNAs entfernt und zirkuläre RNAs angereichert wurden. Mit dem ArrayStar-Microarray wurden 13 617 verschiedene humane circRNAs über spezifische Fluoreszenzsonden erfasst. Aus den gemessenen Fluoreszenzunterschieden zwischen Tumor- und Normalgewebe ergab sich die differenzielle Expression der circRNAs. Die Rohdaten des Microarrays wurden gemeinsam mit der Abteilung für Bioinformatik des Berlin Institute of Health (BIH) ausgewertet.

#### 5.5. circRNA-Validierung und RT-qPCR-Analytik

Alle RT-qPCR-Messungen erfolgten unter Berücksichtigung der MIQE-Richtlinien („Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments“) (32). Die Primer für die Validierung der circRNAs wurden mit Hilfe der Datenbank Primer3 entworfen und von der Firma TIBMolbiol (Berlin, Deutschland) synthetisiert. Nach der cDNA-Synthese erfolgten alle RT-qPCR-Messungen am LightCycler 480 (Roche, Mannheim, Deutschland) unter Verwendung eines SYBR Green qPCR Master Mixes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Nur für die beiden prostataspezifischen Referenzgene wurde ein LightCycler Probes Master (Roche, Mannheim, Deutschland) als Mastermix verwendet. Die PCR-Produkte wurden über Schmelztemperaturanalysen und Gelelektrophoresen überprüft. Um die Erfassung der zirkulären Struktur einer Ziel-RNA zu verifizieren, erfolgten Versuche zu ihrer Stabilität gegenüber RNase R sowie der Einsatz unterschiedlicher Primer bei der reversen Transkription der Gesamt-RNA. So wurden separate cDNA-Synthesen unter Verwendung von Random-Hexamer- bzw.

Oligo(dt)-Primern durchgeführt, um das Fehlen des Poly-A-Schwanzes nachzuweisen. Die cDNA wurde allgemein mit dem Maxima First Strand cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) synthetisiert. Für die o.g. getrennte Synthese mit Random-Hexamer und Oligo(dt)-Primern wurde der Transcriptor First Stand cDNA Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) verwendet. Die detaillierten Reaktionsbedingungen und Primersequenzen können dem Supplement der Originalpublikation entnommen werden (31). Zusätzlich erfolgte eine Sanger-Sequenzierung der PCR-Produkte zum Nachweis der backsplice junction der jeweiligen circRNA.

Alle cDNA-Proben wurden mindestens zweifach bestimmt und der Mittelwert für die weiteren Berechnungen gebildet. Zur Auswertung der Cq Werte der RT-qPCR Bestimmungen wurde die qBase+ Version 3.2 Software (Biogazelle, Zwijnaarde, Belgien) genutzt.

## 5.6. Datenanalyse

Für die statistische Analyse wurden die Programme SPSS Version 25 (IBM Corp., NY, USA), GraphPad Prism Version 8.4.3 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) und MedCalc Version 19.4 (MedCalc Software bvba, 8400 Ostend, Belgien) verwendet. Die Auswertung von kategorialen Daten erfolgte mit dem Chi-Quadrat und Fisher-Test. Kontinuierliche Daten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test, dem Wilcoxon-Test, dem t-Test und der Spearman-Korrelation ausgewertet. Die Diskriminationsfähigkeit der circRNAs und ihrer linearen Transkripte zwischen Tumor- und Normalgewebe zu unterscheiden wurde mittels C-Statistik und Entscheidungskurvenanalyse („Decision curve analysis“) bewertet. Die C-Statistik basierte auf „Receiver-Operating-Characteristics“- (ROC)-Kurvenanalysen mit der Berechnung der Fläche unter der Kurve („area under curve“ bzw. AUC). Die prognostische Aussage der Marker hinsichtlich des primären Endpunktes BCR wurde durch univariable und multivariable Cox-Regressionsanalysen ermittelt. Als statistisch signifikant wurde ein  $p$ -Wert von  $<0,05$  angenommen.

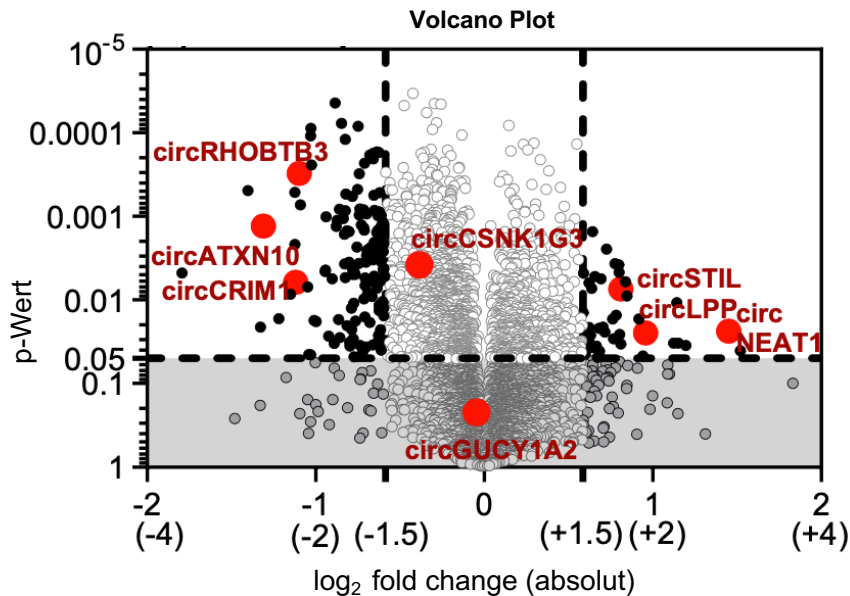
## 6. Ergebnisse

### 6.1. Identifikation und Auswahl der circRNAs mittels Microarray-Analyse

In den sechs untersuchten Gewebepaaren konnten von den 13 617 getesteten circRNAs 9 599 circRNAs nachgewiesen werden. Darunter wurden 43 hochregulierte und 134 herunterregulierte circRNAs identifiziert, die das Kriterium relative Änderung  $>1,5$  gegenüber dem Normalwert mit einem  $p$ -Wert  $<0,05$  erfüllten. Um die Anzahl an circRNAs für weitere Untersuchungen einzugrenzen, wurden die vorliegenden Informationen durch Literaturrecherchen ergänzt. Es wurden sechs circRNAs (circATXN10, circCRIM1, circLPP, circNEAT1, circRHOBTB3, circSTIL) ausgewählt, deren Ursprungsgene zwar eine Rolle in der Tumorbilogie des PK (z.B. STIL (33)) oder anderen malignen Tumoren (z.B. LPP (34)) spielen, deren circRNAs jedoch noch nicht beim PK beschrieben wurden. Zwei der circRNAs (circCRIM1, circRHOBTB3 (30, 35)) wurden teilweise bereits in anderen Krebsarten identifiziert. Zusätzlich wurden zwei weitere circRNAs (circCSNK1G3, circGUCY1A2 (11, 12)) in die Studie integriert, die bereits im PK im Rahmen von anderen Studien identifiziert wurden und von denen bisher keine Aussagen zum BCR bekannt waren. Im Volcano-Diagramm (Abb. 2) ist die Lage dieser acht circRNAs hinsichtlich der positiven bzw. negativen differentiellen Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe bei einer Signifikanz von  $p < 0,05$  für die Microarray-Daten dargestellt.

Signifikante Unterschiede ergab der Vergleich der Expressionsdaten aus dem Microarray mit den eigenen RT-qPCR-Messungen bezüglich der Expression von circLPP und circSTIL. In den Messungen waren diese beiden circRNAs im Tumor gegenüber dem Normalgewebe herunterreguliert und nicht wie im Microarray hochreguliert. Die übrigen circRNAs verhielten sich in der RT-qPCR entsprechend den Ergebnissen des Microarrays. Diese aufgetretene Diskrepanz wird in der Diskussion näher erläutert. Trotz dieser Divergenz wurden alle aufgeführten acht circRNAs und ihre linearen Transkripte mit in die Untersuchung der 194 Gewebeproben einbezogen.





**Abbildung 2: Volcano Plot der circRNAs aus dem Mikroarray**

Rot hervorgehoben sind die für diese Studie selektierten circRNAs. Die gestrichelten Linien verlaufen bei  $p=0,05$  und einer relativen Änderung von  $>1,5$ . CircATXN10, circCRIM1, circCSNK1G3, circGUCY1A2 und circRHOBTB3 sind im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe herunterreguliert. CircSTIL, circLPP und circNEAT1 sind hochreguliert. Die Abbildung ist übersetzt und der Originalpublikation entnommen (31).

## 6.2. Validierung der ausgewählten circRNAs und der RT-qPCR-Assays

### 6.2.1. Validierung der zirkulären Struktur

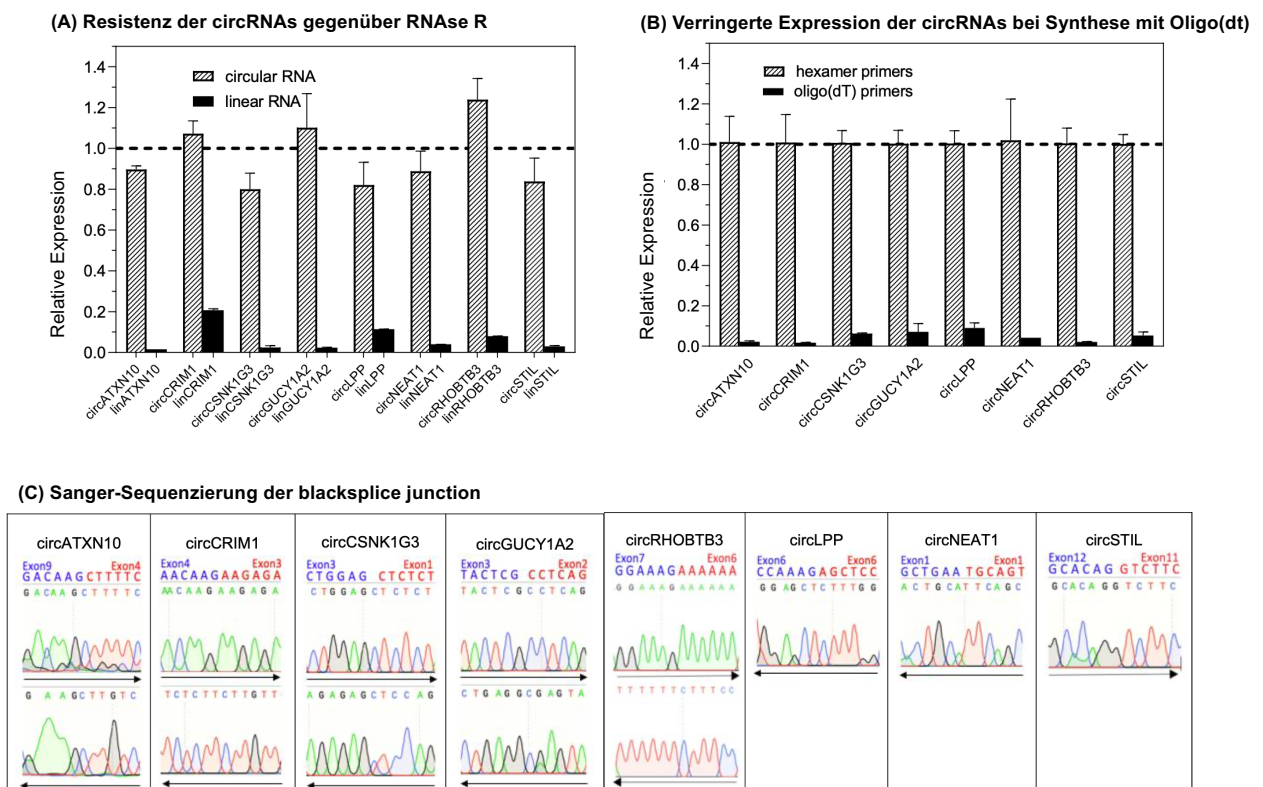
Für alle PCR-Experimente wurden die MIQE-Richtlinien eingehalten. Dafür wurden spezifische Assays für die acht circRNAs und die entsprechenden linRNAs optimiert, wobei die Spezifität jedes einzelnen Assays mittels Schmelzkurvenanalyse und Gelelektrophorese des Amplicons bestätigt wurde.

Ein erster entscheidender Schritt der analytischen Validierung war der Nachweis der zirkulären Struktur der ausgewählten circRNAs. Dies kann durch Überprüfung der Eigenschaften der circRNAs erfolgen, die aus der spezifischen circRNA-Struktur resultieren. Nachfolgend wird dies anhand der Abbildung 3A–C mit Hilfe von drei Versuchsanordnungen aus der Publikation näher erläutert.

Lineare RNAs werden durch die Exonribonuklease RNase R vom 3'- zum 5'-Ende hin degradiert, während circRNAs durch ihre Struktur vor diesem Abbau geschützt sind (4). Nach der RNase-R-Behandlung von RNA-Proben aus Prostatatumorgewebe zeigt sich dies bei RT-qPCR-Bestimmungen als Anreicherung der circRNAs sowie Degradation der zugehörigen linearen Transkripte (Abb. 3A).

Da den circRNAs im Vergleich zu den linearen mRNAs der Poly-A-Schwanz fehlt, können sich Oligo(dt)-Primer nicht an die circRNAs anlagern (5). Daraus resultieren die für circRNAs typischen Expressionsunterschiede in der PCR nach einer cDNA-Synthese mit Random-Hexamer-Primern im Vergleich zu Oligo(dt)-Primern (Abb. 3B).

Die backsplice junction einer circRNA ist spezifisch für die entsprechende circRNA. Durch Sanger-Sequenzierungen der eigens vorbereiteten PCR-Produkte konnte die backsplice junction von allen acht circRNAs nachgewiesen werden (Abb. 3C).



**Abbildung 3: Nachweis der zirkulären Struktur**

(A) RNase-R-Behandlung: Relative Anreicherung der circRNAs nach Behandlung mit RNase R im Vergleich zu den verdauten linRNAs. (B) cDNA-Synthese mit Random- Hexamer-Primer und Oligo(dt)-Primern: Es zeigt sich eine deutlich verringerte Expression bei Verwendung von Oligo(dt)-Primern gegenüber Random-Hexamer-Primern. (C) Sanger-Sequenzierung: Die entsprechenden Ausschnitte aus der Sanger-Sequenzierung bilden die backsplice junction ab. CircLPP, circNEAT1 und circSTIL wurden nur in eine Richtung sequenziert, da einer der beiden Primer die backsplice junction überspannte. Die Abbildungen sind übersetzt und der Originalpublikation entnommen (31).

6.2.2. Etablierung und Evaluierung der RT-qPCR-Assays als geeignete Messmethoden Für die circRNAs, ihre linearen Transkripte und die Referenzgene wurde in umfangreichen Voruntersuchungen geeignete RT-qPCR-Bestimmungsmethoden erarbeitet, die in der Publikation und im zugehörigen Supplement detailliert beschrieben

sind (31). Alle für die Studie optimierten Assays erwiesen sich, mit Ausnahme der circNEAT1, als Methoden mit einer entsprechend der MIQE-Leitlinien geforderten guten analytischen Zuverlässigkeit hinsichtlich Wiederholbarkeit (sog. intraserielle Präzision) und Reproduzierbarkeit (sog. interserielle Präzision). Damit waren die analytischen Voraussetzungen gegeben, die Studie unter den erforderlichen "fit-for-purpose"-Kriterien durchzuführen (36).

**Tabelle 2.** Intraserielle und interserielle Präzision der RT-qPCR-Assays

RNA	Wiederholbarkeit <sup>a</sup>		Reproduzierbarkeit <sup>b</sup>	
	Cq Wert Mittelwert (%RSD)	Relative Häufigkeit Mittelwert (%RSD)	Cq Wert Mittelwert ± SD (%RSD)	Relative Häufigkeit Mittelwert ± SD (%RSD)
circATXN10	24,49 (0,595)	1,345 (10,4)	24,31 ± 0,144 (0,591)	1,004 ± 0,100 (9,98)
circCRIM1	24,61 (0,455)	1,299 (7,59)	24,39 ± 0,115 (0,472)	1,003 ± 0,078 (7,79)
circCSNK1G3	21,47 (0,289)	1,164 (4,28)	21,34 ± 0,131 (0,613)	1,003 ± 0,093 (9,22)
circGUCY1A2	24,68 (0,516)	1,461 (8,81)	24,68 ± 0,134 (0,541)	1,003 ± 0,092 (9,18)
circLPP	25,71 (0,314)	1,177 (5,71)	25,76 ± 0,104 (0,406)	1,002 ± 0,070 (7,00)
circNEAT1	35,56 (0,680)	1,285 (16,4)	36,80 ± 0,309 (0,838)	1,017 ± 0,214 (21,1)
circRHOBTB3	23,91 (0,241)	1,055 (3,95)	24,02 ± 0,178 (0,739)	1,006 ± 0,121 (12,1)
circSTIL	28,51 (0,542)	1,261 (10,9)	28,47 ± 0,105 (0,369)	1,002 ± 0,072 (7,18)
linATXN10	20,23 (0,341)	1,250 (5,07)	20,21 ± 0,106 (0,525)	1,002 ± 0,072 (7,14)
linCRIM1	21,67 (0,257)	1,305 (3,85)	21,49 ± 0,145 (0,673)	1,004 ± 0,102 (10,1)
linCSNK1G3	21,73 (0,275)	1,052 (4,13)	22,23 ± 0,152 (0,683)	1,003 ± 0,091 (9,08)
linGUCY1A2	23,55 (0,480)	1,458 (8,22)	22,51 ± 0,134 (0,596)	1,004 ± 0,096 (9,57)
linLPP	19,27 (0,472)	1,193 (6,64)	19,06 ± 0,121 (0,633)	1,003 ± 0,085 (8,46)
linNEAT1	18,79 (0,231)	1,641 (2,96)	19,80 ± 0,079 (0,401)	1,001 ± 0,054 (5,38)
linRHOBTB3	21,23 (0,259)	1,147 (3,73)	21,34 ± 0,170 (0,796)	1,006 ± 0,120 (11,9)
linSTIL	25,88 (0,411)	1,381 (5,22)	26,22 ± 0,131 (0,500)	1,003 ± 0,089 (8,94)
ALAS1	23,04 (0,305)	1,113 (4,86)	23,32 ± 0,064 (0,275)	1,001 ± 0,043 (4,33)
HPRT1	25,32 (0,411)	1,192 (7,09)	25,97 ± 0,112 (0,432)	1,002 ± 0,077 (7,75)

Abkürzungen: Cq, quantification cycle; %RSD, prozentuale relative Standardabweichung; SD, Standardabweichung; ALAS1, 5'-aminolevulinat synthase 1; HPRT1, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1. ALAS1 und HPRT1 wurden als Referenzgene verwendet (37). <sup>a</sup> n = 20; %RSD wurde durch Doppelmessungen über das quadratische Mittel der Cq-Werte und die relativen Häufigkeiten berechnet. <sup>b</sup> n = 5 interserielle Messungen; %RSD (Cq) entspricht den prozentualen relativen Standardabweichungen der Cq-Werte. %RSD (Relative Häufigkeiten) entsprechen den relativen prozentualen Standardabweichungen der relativen Häufigkeiten der interseriellen Messungen der entsprechenden RNA Variable. Die Tabelle ist übersetzt und entnommen der Originalpublikation (31).

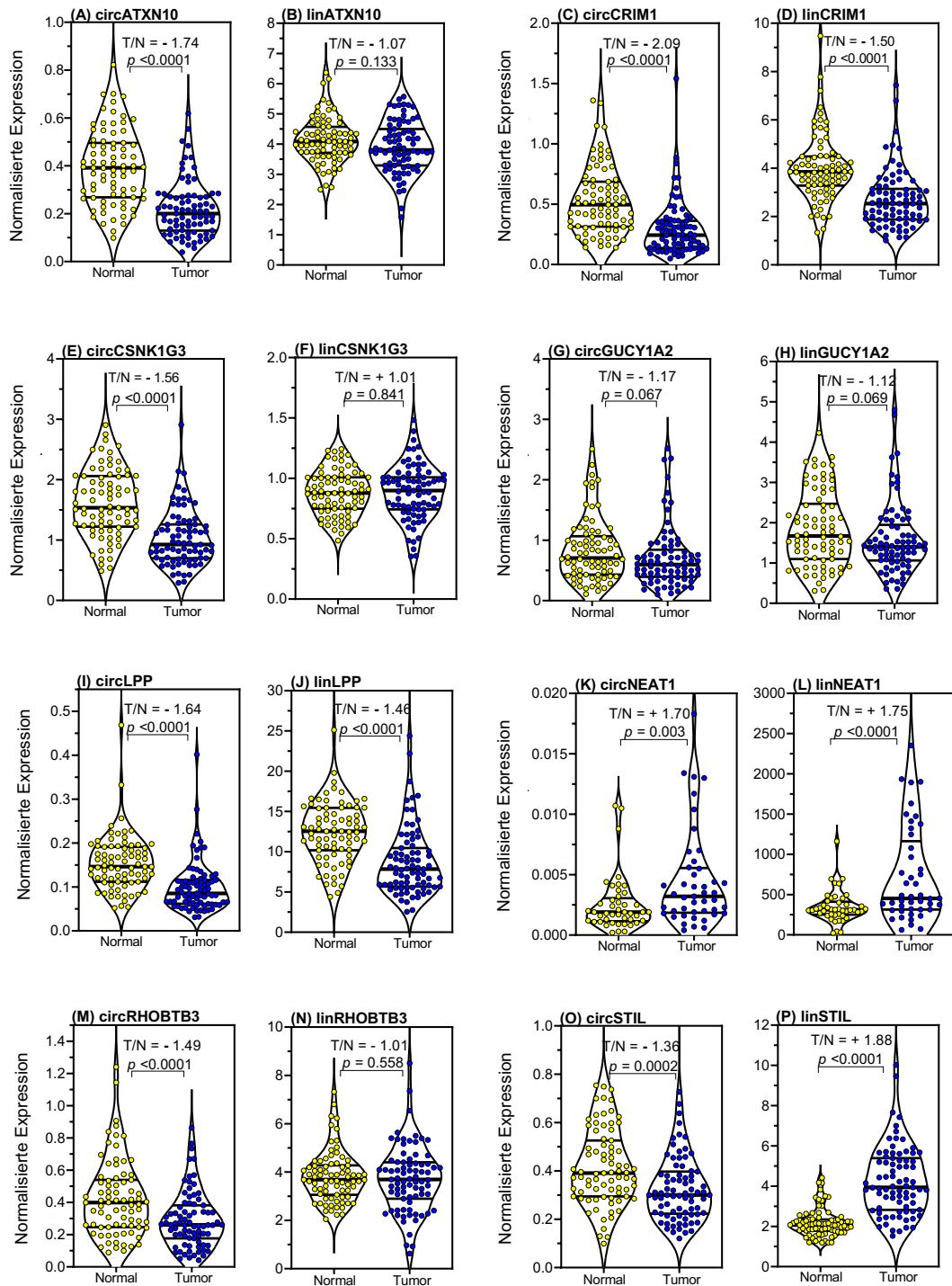
### 6.3. Untersuchungen zur klinischen Validität

#### 6.3.1. circRNAs und ihre Beziehung zu klinisch-pathologischen Parametern

Die Expression aller circRNAs und linRNAs wurde in den gepaarten Gewebeproben unter Bezug auf die Referenzgene ALAS1 und HPRT1 bestimmt. ALAS1 und HPRT1 sind in Kombination zur Normalisierung von Expressionsdaten beim PK besonders geeignet (37). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 zusammengestellt. Die Expression im

Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe war bei sechs circRNAs (circATXN10, circCRIM1, circCSNK1G3, circLPP, circRHOBTB3, circSTIL) signifikant vermindert; die circNEAT1 war vermehrt und circGUCY1A2 blieb unverändert. Korrespondierend zu den circRNA-Expressionen wurden lediglich bei linCRIM1 und linLPP erniedrigte und bei linNEAT1 erhöhte Werte ermittelt, während linSTIL, im Vergleich zur circSTIL, im Tumorgewebe vermehrt war. CircATXN10, circCSNK1G3, circGUCY1A2 und circRHOBTB3 wiesen keine Veränderungen ihres Expressionsverhaltens zwischen Tumor- und Normalgewebe auf.

Bei Betrachtung der Expressionsdaten fällt auf, dass alle circRNAs mit Ausnahme der circCSNK1G3 geringere Expressionswerte als die der entsprechenden linRNAs aufwiesen. Nur in 45 der 79 Gewebepaare war circNEAT1 nachweisbar, wobei sich aber durch die hohe Rate an biologischen Replikaten die Hochregulation von circNEAT1 im Tumor statistisch sichern ließ. Zwar war die circNEAT1 im Vergleich zum Normalgewebe im PK hochreguliert, aber insgesamt war die Expression sehr niedrig. Die aufgrund dieser niedrigen Expression verminderte Detektierbarkeit und die dadurch bereits erwähnte höhere Impräzision bei ihren Bestimmungen waren daher Anlass, circNEAT1 von multivariablen BCR-Analysen auszuschließen.



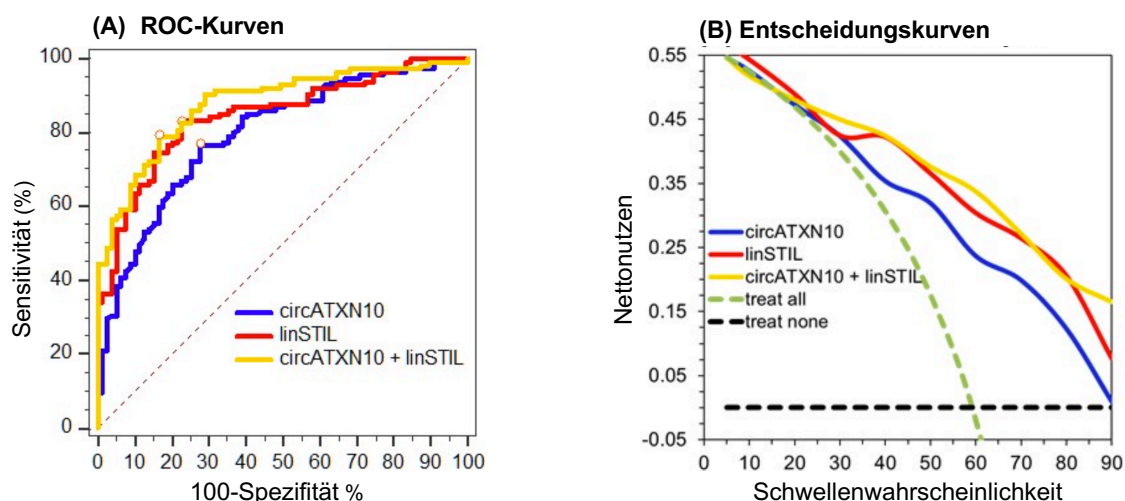
**Abbildung 4: Expression der circRNAs und linRNAs**

Expression der zirkulären RNAs und der linearen Transkripte der Wirtsgene in Gewebeproben nach radikaler Prostatektomie. Es handelt sich um gepaarte Proben von Tumorgewebe und angrenzendem Normalgewebe (n=79, bei circNEAT1/linNEAT1 nur n=45 wegen fehlender Detektierbarkeit aufgrund zu geringer Expressionshöhe). Die Normalisierung erfolgte in Bezug auf die mRNA der prostataspezifischen Referenzgene ALAS1 und HPRT1(37). Die Violinen-Diagramme zeigen die komplette Spannweite der Expressionswerte, die gestrichelten Linien zeigen die oberen und unteren Quartilen, die durchgezogene Linie zeigt den Median. Der T/N-Index (Tumor/Normalgewebe-Index) zeigt die statistisch signifikanten Expressionsunterschiede an. Ist der T/N-Index < 0 ist die Expression im Tumorgewebe niedriger als im Normalgewebe bzw. ist der T/N-Index > 0 ist die Expression im Tumorgewebe höher als im Normalgewebe. Die Abbildung ist übersetzt und der Originalpublikation entnommen (31).

Die Expressionsdaten der circRNAs und linRNAs zeigen keinerlei signifikante Zusammenhänge mit den klinisch-pathologischen Variablen Alter, präoperativer PSA-Wert, Prostatagröße, mit der digital rektalen Untersuchung (DRU), dem Tumorstadium und dem Resektionsstatus. Ein signifikanter Zusammenhang konnte zwischen der Expression aller circRNAs außer der circNEAT1 und der circRHOBTB3 und dem Parameter ISUP-Gruppe nachgewiesen werden. Von den linRNAs zeigten nur linGUCY1A2 und linLPP diesen Zusammenhang. Diese Daten sind detailliert im Supplement der Publikation aufgelistet und werden aus Platzgründen hier nicht aufgeführt (31).

### 6.3.2. circRNAs und linRNAs als Differenzierungsmarker zwischen Tumor und Normalgewebe

Um die untersuchten RNAs als potenzielle Gewebemarkers zur Trennung zwischen Tumor- und Normalgewebe einschätzen zu können, wurden die Expressionsdaten für alle RNAs einzeln und in Kombination durch ROC-Analysen bewertet. Das Maß für die Trennschärfe ist die Fläche unter der ROC-Kurve (AUC), die maximal 1 sein kann. Die Analysen ergaben, dass circATXN10 in Kombination mit linSTIL die zuverlässigste Diskrimination zwischen beiden Gewebearten ergibt. Der AUC-Wert betrug für circATXN10 0,801 und für linSTIL 0,841. Durch die Kombination der beiden RNAs steigt der Wert der AUC auf 0,892. Die Kurven der Kombination von circATXN10 und linSTIL verlaufen sowohl in der ROC-Kurvenanalyse als auch in der Entscheidungskurvenanalyse über den Kurven der Individualparameter und belegen damit eine verbesserte Diskrimination (Abb. 5).



### Abbildung 5: ROC-Kurvenanalyse und Entscheidungskurvenanalyse

(A) ROC-Kurven und (B) Entscheidungskurven der von circATXN10, linSTIL und ihrer Kombination zur Differenzierung zwischen Tumor- und Normalgewebe. Die Kombination von circATXN10 und linSTIL verbesserte die Vorhersagekraft. Die Abbildung ist übersetzt und der Originalpublikation entnommen (31).

#### 6.3.3. circRNAs und linRNAs als Prognosemarker eines biochemischen Rezidivs

Von 115 Patienten der Studienpopulation erlitten 39 ein BCR. Es wurden die Zeitintervalle von der Prostatektomie bis zu diesem klinischen Endpunkt ermittelt. Im Median erfolgte das Ereignis nach 19,9 Monaten (Interquartilsabstand IQR = 9,8-41). Rezidivfrei waren 76 Patienten bis zum Ende der Nachkontrollen, im Median 52 Monate (IQR = 38-80).

Es wurden Cox-Regressions-Analysen mit den kontinuierlichen Daten der normalisierten relativen Expressionsquantitäten der einzelnen RNAs durchgeführt (Tabelle 3). Die Analyse erfolgte in drei Schritten. Zuerst wurde mit der univariablen Cox-Regression getestet, welche der circRNAs bzw. linRNAs potenziell geeignet sind, ein BCR vorherzusagen zu können. Um Fehler zweiter Ordnung zu vermeiden, wurde ein  $p$ -Wert von  $<0,25$  für den jeweiligen Hazard-Ratio-Wert (HR) einer Variable angesetzt. Dadurch wurden bereits in diesem Schritt zwei circRNAs (circCRIM1, circRHOBTB3) und fünf linRNAs (linATXN10, linCRIM1, linCSNK1G3, linLPP, linRHOBTB3) für die nachfolgenden multivariablen Analysen ausgeschlossen. Im zweiten Schritt wurde mit den verbliebenen fünf circRNAs bzw. den drei linRNAs durch multivariable Cox-Regressionsanalyse ein sogenanntes Vollmodell für die jeweilige RNA-Klasse aufgestellt. Anschließend wurde im dritten Schritt unter dem Ausschlusskriterium von  $p > 0,25$  und durch Rückwärtselimination ein reduziertes Modell berechnet. In den jeweiligen Modellen verblieben für die circRNAs ATXN10, circGUCY1A2 und circLPP und für die linRNAs linGUCY1A2, linNEAT1 und linSTIL.

**Tabelle 3.** Univariable und multivariable Cox-Regressionsanalysen zur Vorhersage eines biochemischen Rezidivs mit circRNAs und deren linearen Transkripten

RNA	Univariable Cox Regression <sup>a</sup>		Multivariable Cox Regression			
	HR (95% CI)	p-Value	Vollmodell <sup>b</sup>		Reduziertes Modell nach Rückwärtselimination <sup>c</sup>	
	HR (95% CI)	p-Value	HR (95% CI)	p-Wert	HR (95% CI)	p-Wert
<b>Zirkuläre RNAs</b>						
circATXN10	0,39 (0,10-1,88)	0,239	0,27 (0,08-0,89)	0,032	0,31 (0,13-0,76)	0,011
circCRIM1	0,69 (0,22-2,16)	0,521	-	-	-	-
circCSNK1G3	2,32 (0,51-10,6)	0,240	1,96 (0,50-7,68)	0,336	-	-
circGUCY1A2	1,31 (0,98-1,75)	0,065	1,32 (0,99-1,75)	0,051	1,33 (1,02-1,74)	0,037
circLPP	1,86 (0,84-4,12)	0,125	1,76 (0,78-3,96)	0,169	1,89 (0,91-3,95)	0,092
circRHOBTB3	0,86 (0,38-1,93)	0,705	-	-	-	-
circSTIL	0,53 (0,18-1,53)	0,238	0,57 (0,21-1,62)	0,293	-	-
<b>Lineare mRNAs</b>						
linATXN10p	1,23 (0,15-10,2)	0,846	-	-	-	-
linCRIM1	0,90 (0,22-3,76)	0,887	-	-	-	-
linCSNK1G3	0,47 (0,09-2,60)	0,399	-	-	-	-
linGUCY1A2	1,52 (0,99-2,32)	0,050	1,47 (1,09-2,00)	0,012	1,47 (1,09-2,00)	0,012
linLPP	1,06 (0,23-4,76)	0,941	-	-	-	-
linNEAT1	1,41 (1,15-1,72)	0,001	1,39 (1,16-1,66)	0,0003	1,39 (1,16-1,66)	0,0003
linRHOBTB3	0,78 (0,20-3,11)	0,727	-	-	-	-
linSTIL	0,59 (0,32-1,08)	0,086	0,54 (0,30-0,96)	0,037	0,54 (0,30-0,96)	0,037

Abkürzungen: HR, hazard ratio; CI, Konfidenzintervall. <sup>a</sup> circNEAT1 wurde von den Berechnungen, wie oben angegeben, ausgeschlossen. <sup>b</sup> Das Vollmodell schließt alle Variablen der univariablen Cox-Regression mit HRs der p-Werte <0,25 für die Berechnung ein. <sup>c</sup> Das finale reduzierte Modell mit Rückwärtselimination schließt HRs mit p-Werten <0,05 ein und eliminiert Werte mit p>0,10. Die Tabelle ist übersetzt und der Originalpublikation entnommen (31).

Die Vorhersagekraft der Vollmodelle und der reduzierten Modelle ergab mit der C-Statistik sowohl für die circRNAs ( $0,676 \pm 0,055$  vs.  $0,649 \pm 0,056$ ;  $p = 0,219$ ) als auch für die linearen Transkripte (beide Modelle identisch mit  $0,722 \pm 0,053$ ) keine signifikanten Unterschiede. Anschließend wurden mit allen acht RNA-Variablen der vollen multivariablen Cox-Regressionsmodelle (fünf circRNAs und drei linRNAs) bzw. mit den sechs Variablen der beiden reduzierten Modelle (drei circRNAs und drei linRNAs) aus Tabelle 3 Cox-Regressionsanalysen mit Rückwärtselimination durchgeführt (Tabelle 4). Dabei ergab sich, dass alle circRNAs vom Modell ausgeschlossen wurden. Im Modell verblieben nur die drei linearen RNAs linGUCY1A2, linNEAT1 und linSTIL als unabhängige Variablen, sodass in dieser RNA-Kombination die circRNAs keinen zusätzlichen statistisch signifikanten Prädiktionswert haben. Im Folgenden wird das Modell aus den kombinierten Variablen linGUCY1A2, linNEAT1 und linSTIL als RNA-Signatur bezeichnet.



**Tabelle 4.** Ermittlung einer RNA Signatur zur Vorhersage eines biochemischen Rezidivs durch Cox-Regressionsanalyse mit circRNAs und linRNAs

RNA Vorhersage- modell	Multivariable Cox Regression der kombinierten einzelnen RNA Parameter			
	Vollmodell mit einzelnen Parametern <sup>a</sup>		Durch Rückwärtselimination reduziertes Modell <sup>b</sup>	
	HR (95% CI)	p-Value	HR (95% CI)	p-Value
circRNA Vorhersageparameter				
circATXN10	0,45 (0,18-1,12)	0,086	ausgeschlossen	-
circGUCY1A2	0,95 (0,55-1,64)	0,850	ausgeschlossen	-
circLPP	1,37 (0,66-2,82)	0,399	ausgeschlossen	-
linear RNA Vorhersageparameter				
linGUCY1A2	1,77 (0,80-3,89)	0,153	1,47 (1,09-2,00)	0,012
linNEAT1	1,33 (1,11-1,60)	0,002	1,39 (1,16-1,66)	0,0003
linSTIL	0,52 (0,29-0,94)	0,030	0,54 (0,30-0,96)	0,037

Abkürzungen: HR, hazard ratio; CI, Konfidenzintervall. <sup>a</sup> Das Modell beinhaltet die sechs verbliebenen RNAs aus den jeweiligen reduzierten Modellen in Tabelle 3. <sup>b</sup> Das finale reduzierte Modell schließt HRs mit  $p$ -Werten  $<0,05$  ein und eliminiert HRs mit  $p >0,10$ . Die Tabelle ist übersetzt und der Originalpublikation entnommen (31).

#### 6.3.4. Kombination von klinisch-pathologischen Parametern und RNA-Signatur zur verbesserten Vorhersage eines biochemischen Rezidivs

Im klinischen Alltag werden verschiedene Modelle zur Vorhersage eines möglichen biochemischen Rezidivs benutzt. Diese beruhen in der Regel auf den routinemäßig erhobenen klinisch-pathologischen Variablen, verwenden aber unterschiedliche Auswertelgorithmen. Dazu zählen die eingangs bereits erwähnten Modelle nach D'Amico et al. (20), Stephenson et al. (21) sowie das CAPRAS-Modell (23) und das NCCN-Modell (22). Mittels Cox-Regressionsanalyse wurde in der untersuchten Patientenpopulation analog zu dem RNA-Modell auch ein Modell aus den klinisch-pathologischen Variablen, wie Alter, präoperativer PSA-Wert, DRU, Resektionsrand, Lymphknotenstatus, Tumorstadium und ISUP-Gruppe zur Vorhersage des BCR konstruiert. Das volle Modell beinhaltete präoperatives PSA, Resektionsrand, Lymphknotenstatus, Tumorstadium und ISUP-Gruppe. Das durch Rückwärtselimination reduzierte Modell beinhaltete nur noch den Resektionsrand, das Tumorstadium und die ISUP-Gruppe. Für all diese Modelle sind die C-Statistik-Werte der prognostischen Indizes zum biochemischen Rezidiv aus den Cox-Regressionsanalysen mit den zugrundeliegenden klinisch-pathologischen Variablen allein und in Kombination mit der erarbeiteten RNA-Signatur in Tabelle 5 zusammengestellt. Die C-Statistik-Werte unterscheiden sich zwischen den Modellen. Aber wesentlich wichtiger ist, dass die Vorhersagewahrscheinlichkeiten eines biochemischen Rezidivs für die verschiedenen

klinischen Modelle durch Hinzufügen der RNA-Signatur statistisch signifikant besser werden bzw. zumindest eine Tendenz in diese Richtung zeigen.

**Tabelle 5.** Verbesserte Vorhersage eines biochemischen Rezidivs durch Kombination der RNA-Signatur mit Modellen, die auf klinisch-pathologischen Parametern basieren.

Vorhersagemodell	Klinisch-pathologische Modelle	Kombination von klinisch-pathologischen Modellen und der RNA-Signatur	p-Wert
	AUC (95% CI)	AUC (95% CI)	
<i>Vorliegende Studie</i>			
Volles Modell	0,810 (0,726–0,877)	0,841 (0,761–0,902)	0,073
Reduziertes Modell	0,804 (0,720–0,872)	0,827 (0,746–0,891)	0,104
<i>Referenzmodelle</i>			
D'Amico et al. (20)	0,513 (0,418–0,607)	0,718 (0,627–0,798)	0,004
CAPRAS (23)	0,750 (0,660–0,826)	0,799 (0,714–0,868)	0,034
NCCN (22)	0,733 (0,643–0,811)	0,800 (0,715–0,869)	0,035
Stephenson et al. (21)	0,785 (0,699–0,856)	0,821 (0,738–0,886)	0,107

Abkürzungen: AUC, Fläche unter der ROC-Kurve, errechnet aus den prognostischen Indizes der Cox-Regressionsanalyse; CI, Konfidenzintervall; CAPRAS, Cancer of the Prostate Risk Assessment Postsurgical Score; NCCN, National Comprehensive Cancer Network; Vollmodell, Einschluss aller klinisch-pathologischen Variablen außer Alter und digital-rektaler Untersuchung; Reduziertes Modell, Einschluss der klinisch-pathologischen Variablen Resektionsrand, Tumorstadium und ISUP-Gruppe. Die Tabelle ist übersetzt und der Originalpublikation entnommen (31).

## 7. Diskussion

Die Studie erfolgte schrittweise in drei Phasen (Abb. 1). Da zu Beginn der Arbeit nur unzureichende Informationen über circRNAs beim Prostatakarzinom vorlagen, kann die Studie auch als hypothesengenerierende Forschung mit explorativem Charakter angesehen werden. Die erste Phase der experimentellen Arbeit begann daher zunächst mit einer genomweiten Microarray-Analyse von RNA-Proben aus malignen und nicht-malignen Prostatagewebeproben. Dieser Arbeitsschritt war auf die Identifizierung differenziell exprimierter circRNAs ausgerichtet, die als potenzielle diagnostische und prognostische Biomarker für das PK geeignet wären. In den sich daran anschließenden zwei weiteren Phasen wurden ausgewählte circRNAs einer analytischen und klinischen Validierung unterzogen. Die Besonderheit der Studie lag außerdem im integrativen Ansatz, da gleichzeitig neben den circRNAs auch ihre linearen Transkripte mittels RT-qPCR bestimmt wurden. Unter Betrachtung der o.g. spezifischen Gesichtspunkte werden

im Folgenden die Ergebnisse der Arbeit diskutiert und eigene Ansichten bezüglich zukünftiger Aufgaben auf diesem Forschungsgebiet dargelegt.

Die Microarray-Analytik ist als ein zuverlässiges und effektives methodisches Verfahren auch in der circRNA-Forschung anerkannt (38). Allerdings können nur bereits identifizierte circRNAs über entsprechende Sonden detektiert werden. Im Falle des Microarrays der Firma ArrayStar waren dies 13 617 circRNAs, die vorher im Rahmen anderer Studien verifiziert wurden (4, 5, 39). In einem auf RNA-Sequenzierung beruhendem Ansatz könnten gegebenenfalls zusätzlich bisher unbekannte circRNAs identifiziert werden. Von den 43 im Microarray nachgewiesenen hochregulierten und den 134 herunterregulierten circRNAs, die die beiden Kriterien relativer Unterschied  $>1,5$  und  $p$ -Wert  $<0,05$  erfüllten, wurden drei hochregulierte (circNEAT1, circLPP, circSTIL) und drei herunterregulierte (circATXN10, circCRIM1, circRHOBTB3) ausgewählt. Hinzu kamen noch zwei circRNAs (circCSNK1G3, circGUCY1A2), die aus bereits veröffentlichten Studien anderer Arbeitsgruppen mit aufgenommen wurden. Von diesen beiden circRNAs wurde bislang nur circCSNK1G3 im Tumorgewebe untersucht und die Beobachtungen von circGUCY1A2 beruhten auf Experimenten an Tumorzelllinien (11, 12). Zusätzlich zu jeder der acht zu untersuchenden circRNAs wurden auch jeweils die linRNAs des Ursprungsgens in die Studie miteingeschlossen. Somit konnten die zirkulären RNAs mit den linearen Transkripten verglichen werden.

Alle acht circRNAs konnten erfolgreich validiert und ihre zirkuläre Struktur nachgewiesen werden. Die drei angewendeten Validierungsmethoden, die Behandlung mit RNase R, die Verwendung von Random-Hexamer- und Oligo(dt)-Primern sowie die Sanger-Sequenzierung gelten als ausreichend, um die Ringform dieser RNAs zu bestätigen (6). Trotzdem sollten einheitliche Validierungsprotokolle für zukünftige Experimente vereinbart werden, um Studien vergleichbarer und transparenter zu machen. Dies trifft besonders auf die Erhebung zuverlässiger RT-qPCR-Daten zu, für die auch die strenge Beachtung der MIQE-Richtlinien eine Voraussetzung sind. Nur so kann es gelingen, in Pilotstudien empfohlene Biomarker über Replikationsstudien zu bestätigen und sie damit in den klinischen Alltag zu etablieren (32).

Für die aus den Microarray-Analysen selektierten acht circRNAs und acht linRNAs wurden methodisch valide RT-qPCR-Assays erarbeitet. Obwohl die circLPP- und circSTIL-Expression an den sechs Prostatagewebeproben im Microarray im Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe erhöht waren, wiesen sie in den parallel durchgeführten RT-qPCR-Bestimmungen eine Verminderung auf. Dieses Ergebnis

bestätigte sich auch in den RT-qPCR-Bestimmungen der 79 gepaarten Gewebeproben. Im Fall der anderen circRNAs stimmten die RT-qPCR-Daten mit denen des Microarrays gut überein. Eine Diskrepanz zwischen Microarray und RT-qPCR-Daten wurde auch in anderen Studien beschrieben (40, 41). Da in beiden Verfahren dieselben RNA-Proben verwendet wurden, kommen nur analytische oder post-analytische Fehler dafür in Frage. Anders als im Microarray erfolgte vor den RT-qPCR-Messungen keine Behandlung der RNA mit RNase R. Möglicherweise beeinflusst dieser Schritt die Expression der circRNAs und der linearen RNAs, da Unterschiede für beide RNAs hinsichtlich der Degradation nach dieser Behandlung beobachtet wurden (5). Wie oben bereits beschrieben, werden linRNAs von RNase R degradiert, während die meisten circRNAs resistent sind und so angereichert werden (4, 42). Auch die Anwendung unterschiedlicher Normalisierungsstrategien, wie z.B. mit Referenzgenen oder über eine globale Normalisierung, erschwert es oft Resultate aus Microarray- und RT-qPCR-Studien miteinander zu vergleichen. Deshalb wurden hier die Referenzgene ALAS1 und HPRT1 benutzt, die sich beim PK in dieser Kombination als besonders geeignet zur Normalisierung von RT-qPCR-Daten erwiesen haben (37).

In der Studie wurde die Integrität aller RNA-Proben zuerst über die RIN-Werte bestimmt. Die RIN Werte, die bei einer intakten RNA maximal einen Wert von 10 erreichen, lagen hier im Median bei 7. Es ist bekannt, dass die Integrität der RNA die RT-qPCR-Ergebnisse erheblich beeinflussen kann. So konnte in einer vorhergehenden Publikation (43), in der ich auch als Erstautor fungiere, nachgewiesen werden, dass niedrige RIN-Werte mit niedrigen Expressionswerten in der RT-qPCR auch bei circRNAs einhergehen. Diese Effekte können durch Normalisierung mit geeigneten Referenzgenen erst bei einem RIN-Wert  $>6$  ausgeglichen werden. Da man sich derzeit noch auf die besondere Stabilität der circRNA aufgrund ihrer Struktur verlässt, werden RIN-Werte oder andere Stabilitätskriterien leider nicht immer in Studien publiziert. Deshalb ist zu fordern, auch bei circRNA-Untersuchungen entsprechend den MIQE-Leitlinien die Integrität der isolierten RNA anzugeben, um die Vergleichbarkeit von Studien verlässlicher zu gestalten.

Bei der Betrachtung der unterschiedlichen Expressionshöhen der circRNAs und ihrer zugehörigen linearen Transkripte ist besonders auffällig, dass alle linRNAs außer linCSNK1G3 deutlich höher exprimiert waren als ihre circRNAs. In Abbildung 4 ist dies anhand der unterschiedlichen Skalierungen der y-Achsen gut zu erkennen und deckt sich auch mit anderen Studien (4, 5). Beim Vergleich von circSTIL mit linSTIL fiel hingegen

die entgegengesetzt veränderte Expression im Tumor besonders auf, d.h. circSTIL war im Tumorgewebe signifikant herunterreguliert und linSTIL war im Tumorgewebe signifikant höher exprimiert als im Normalgewebe. Die erhöhte Expression von linSTIL im PK Gewebe entspricht Ergebnissen von Wu et al. (33). In verschiedenen Krebszelllinien wurde bereits die Funktion von linSTIL untersucht. Es konnten sowohl die Unterdrückung von Apoptose als auch die Förderung der Zellproliferation gezeigt werden (33, 44).

Die hier untersuchten circRNAs waren bisher kaum Gegenstand von Untersuchungen zum PK. Es gibt weder ausreichende Expressionsdaten, die zum Vergleich herangezogen werden können, noch gibt es zuverlässige Informationen über mögliche biologische Funktionen der einzelnen circRNAs. Lediglich von den beiden von mir zusätzlich zur Kontrolle mitgeführten circRNAs, der circCSNK1G3 und der GUCY1A2 waren bereits Angaben vorhanden (11, 12). Die von Chen et al. (11) mitgeteilten veränderten circCSNK1G3-Expressionen im Prostatakarzinomgewebe konnten in den RT-qPCR-Bestimmungen bestätigt werden. Für circGUCY1A2 wurde in verschiedenen Prostatakarzinom-Zelllinien eine differenzielle Expression in Abhängigkeit von ihrer Aggressivität beschrieben und der Einfluss der RNA auf die PK-Pathogenese postuliert (12). Die vorliegende Studie ist jedoch die erste Arbeit, in der circGUCY1A2 und ihr lineares Transkript in humanen Gewebeproben quantitativ bestimmt wurden. Weder für circGUCY1A2 noch für ihre entsprechende linRNA konnten Expressionsunterschiede in den untersuchten gepaarten Gewebeproben festgestellt werden. Auffällig war, dass circNEAT1 wegen der geringen Expressionshöhen nicht in allen Proben detektierbar war. Die geringe Anzahl der dadurch auswertbaren Proben und die mit der geringen Expressionshöhe verbundene unzureichende analytische Zuverlässigkeit des Assays waren daher Anlass, die circNEAT1 nicht mit in die uni- und multivariablen Cox-Regressionsanalysen einzubeziehen. Es bleibt daher zu hoffen, dass die klinische Validität der circNEAT1 in der Zukunft mit sensitiveren Methoden, wie z.B. mit der digitalen RT-qPCR, eingehender evaluiert werden kann. Im Gegensatz zu circNEAT1 war linNEAT1, die eine long non coding RNA (lncRNA) ist, in beiden Gewebearten extrem hoch exprimiert. Auch in anderen Studien zum PK wurde die linNEAT, ihre onkogene Wirkung und ihr Einfluss auf die Entstehung von Resistenzen gegenüber dem Chemotherapeutikum Docetaxel bereits beschrieben (45, 46).

Im Laufe der experimentellen Versuche dieser Doktorarbeit wurden zwei neue Arbeiten publiziert, die das Potenzial von circRNAs beschreiben, um malignes von normalem Gewebe im PK zu unterscheiden (47, 48). Eine Studie nutzte dazu die beiden

circRNAs hsa\_circ\_0057558 und hsa\_circ\_0062019 zur Gewebediskrimination (48). Bei Kombination der beiden Biomarker über eine ROC-Analyse wurde ein AUC-Wert von 0,861 ermittelt. Eine andere Studie verwendete die circRNAs hsa\_circ\_0001633, hsa\_circ\_0001206 und hsa\_circ\_0009061 als potenzielle Differenzierungsparameter und erreichte damit AUC-Werte von 0,809, 0,774 bzw. 0,711 (47). In der vorliegenden Studie zeigten sich circATXN10 und linSTIL als die am besten geeignete Kombination von den 16 untersuchten RNAs mit einer AUC von 0,892 (95% KI: 0,834-0,925), um Tumorgewebe von Normalgewebe zu unterscheiden. Neben der ROC-Kurvenanalyse bestätigte auch die Entscheidungskurvenanalyse, dass die Kombination der beiden RNAs gegenüber den individuellen RNAs in der Vorhersage überlegen ist. Allerdings ist die Richtigkeit von circRNAs, malignes von nicht-malignem Gewebe zu unterscheiden bei anderen Krebsarten deutlich höher. Im Nierenzellkarzinom wurde circEGLN3 als besonders aussagekräftiger Biomarker (AUC 0,98) identifiziert, der in Kombination mit seinem linearen Transkript sogar eine AUC von 0,99 erreicht (30). Diese Ergebnisse unterstreichen grundsätzlich das Potenzial von circRNAs, als Biomarker zur Gewebedifferenzierung zu fungieren. In Zukunft könnten sie sicherlich als molekularbiologische Marker histopathologische Gewebeuntersuchungen bei kritischen Fragestellungen unterstützen und ergänzen.

Die Beziehung der Expressionsdaten der RNAs zu etablierten klinisch-pathologischen Variablen war in dieser explorativen Studie von besonderem Interesse. Mit Ausnahme von circNEAT1 und circRHOBTB3, waren alle circRNAs statistisch signifikant mit der ISUP-Gruppe assoziiert. Korrelationen zu den übrigen klinischen Parametern wie Alter, PSA-Wert, Prostatagröße, DRU, Tumorstadium und Resektionsstadium wurden nicht nachgewiesen. Von den linRNAs zeigten nur linGUCY1A2 und linLPP einen Zusammenhang zur ISUP-Gruppe. Die untersuchten RNAs waren in ihrer Expression somit weitgehend unabhängig von den o.g. klinisch-pathologischen Standardvariablen. Die dargestellte Unabhängigkeit der RNA-Expressionen von diesen Variablen kann Ausdruck eines möglichen zusätzlichen Informationsgewinns gegenüber diesen Standardvariablen sein. Man spricht in solchen Fällen von orthogonalen Markern (49). Diese besondere Eigenschaft von circRNAs und linRNAs konnte auch in den Auswertungen hinsichtlich ihres Expressionsverhaltens zum klinischen Endpunkt BCR belegt werden. BCR ist ein entscheidender Parameter, um die Prognose eines PK-Patienten nach radikaler Prostatektomie einzuschätzen (50). Folglich war eine der zentralen Fragestellungen dieser Studie, die Expressionen von circRNAs

und linRNAs auf ihre Fähigkeit der BCR-Vorhersage hin zu überprüfen. Bisher fehlten allgemeine Daten zur Korrelation zwischen den circRNA- bzw. linRNA-Expression und einem BCR. In einem Mehrschritt-Prozess wurden die untersuchten RNAs einzeln und in Kombination zu dieser Fragestellung über Cox-Regressionsberechnungen analysiert. Bei individueller Betrachtung der RNAs zeichneten sich drei circRNAs (circATXN10, circGUCY1A2 und circLPP) und drei linRNAs (linGUCY1A2, linNEAT1 und linSTIL) innerhalb der jeweiligen RNA-Klasse in der multivariablen Cox-Regressionsanalyse als geeignete Vorhersageparameter aus (Tabelle 3). Obwohl von Chen et al. (11) für circCSNK1G3 ein Einfluss auf die Regulation der Proliferation von PK-Zellen nachgewiesen wurde, konnte für diese circRNA kein statistisch gesicherter Zusammenhang zum BCR festgestellt werden. In einem nächsten Schritt erfolgte die Kombination der RNAs aus beiden RNA-Klassen, um die Vorhersagegenauigkeit weiter zu verbessern (Tabelle 4). Dabei wurde jedoch deutlich, dass nur die drei linRNAs im Modell für eine BCR-Vorhersage relevant sind. Diese Kombination der drei linRNAs, linGUCY1A2, linNEAT1 und linSTIL wurde daraufhin im Rahmen dieser Arbeit als RNA-Signatur bezeichnet. Bei der Cox-Regressionsanalyse war zwar die Elimination aller circRNAs überraschend, unterstreicht aber, dass ein integrativer Ansatz durch Kombinationen von circRNAs und linRNAs sinnvoll ist, um mögliche fehlerhafte Interpretationen zu verhindern.

Daraufhin wurden verschiedene in der Klinik zur BCR-Prognose herangezogene Modelle mit nur klinisch-pathologischen Variablen separat und in Kombination mit der erarbeiteten RNA-Signatur bewertet (Tabelle 5). Im Vergleich zu den bisherigen Modellen schnitt die RNA-Signatur nur im Verhältnis zu dem Modell von D'Amico et al. (20) signifikant besser ab. Werden die klinischen Modelle jedoch durch Kombination mit der RNA-Signatur erweitert, wurden in allen Fällen bessere C-Statistik-Werte erreicht. Aufgrund der hohen statistischen Signifikanz war hierbei die Kombination der RNA-Signatur mit dem Modell nach D'Amico et al. (20) sowie mit den Modellen CAPRAS (23) und NCCN (22) besonders eindrücklich. Diese Ergebnisse konnten auch in den Entscheidungskurvenanalysen bestätigt werden. Folglich haben gewebespezifische molekulare Biomarker das Potenzial, bisher ausschließlich auf klinisch-pathologischen Variablen beruhende Vorhersagemodelle in der Klinik sinnvoll zu ergänzen und deren Zuverlässigkeit zu verbessern. Dieser allgemeine Ansatz, in der Diagnostik und Prognose des Prostatakarzinoms Biomarker heranzuziehen, wird auch darin deutlich, dass inzwischen verschiedene kommerzielle Teste sowohl auf Genom-, Transkriptom-, als

auch auf der Proteomebene verfügbar sind (28, 51-53). In den aktuellen Leitlinien zum Prostatakarzinom werden aber dazu noch keine Empfehlungen ausgesprochen (14, 54).

In dieser Studie wurden keine Funktionen der circRNAs untersucht. Die vorliegende Dissertation war bewusst nur auf die Suche nach möglichen Biomarkern ausgerichtet, da funktionelle Experimente nicht im Umfang der Studie enthalten waren. Lediglich in der Diskussion wurde zu einzelnen circRNAs und linRNAs auf mögliche funktionelle Eigenschaften hingewiesen. Außerdem ist es sinnvoll, zuerst zu prüfen, ob ein molekularer Marker überhaupt als Biomarker geeignet ist, bevor dessen mögliche Funktionen untersucht werden. Die Güte eines Biomarkers hängt oft nicht von seiner spezifischen biologischen Funktion ab. Wichtiger ist es zu überprüfen, ob der neue Biomarker einen diagnostischen oder prognostischen Gewinn einzeln und in Kombination mit etablierten Verfahren bringt (55). Für die in dieser Studie erarbeitete RNA-Signatur ist dies zutreffend.

Trotz Beachtung der Forderungen, die die MIQE-, STARD- und REMARK-Richtlinien für Studien vorsehen, ist die vorliegende explorative Arbeit nicht frei von Limitationen. Dabei handelt es sich vor allem um den retrospektiven Ansatz der Studie, die fehlende externe Validierung und die ausschließliche Bewertung des Endpunktes BCR, ohne das krebsspezifische Überleben oder das Gesamtüberleben der Patienten zu berücksichtigen. Mittels Fallzahlberechnungen ( $\alpha=5\%$ ,  $\beta=80\%$ ) wurden jedoch Fehler erster und zweiter Art weitgehend minimiert und die angewendeten Modellrechnungen durch Bootstrapping-Verfahren intern validiert.

In zukünftigen Forschungsprojekten sollten circRNAs auch hinsichtlich ihrer Eignung als nicht-invasive Biomarker im Sinne einer Flüssigbiopsie geprüft werden. Bekannt ist bereits, dass sich circRNAs nicht nur in Zellen oder Gewebeproben, sondern auch im Plasma, Serum und im Urin nachweisen lassen (56, 57). Li et al. (58) konnten stabile circRNAs auch in Exosomen von Patientenseren nachweisen. Dadurch gelang es, gesunde ProbandInnen von PatientInnen mit kolorektalem Karzinom zu differenzieren. Auch beim Magenkarzinom konnte das diagnostische Potential von circRNA im Plasma gezeigt werden (59). Weiterhin bleibt zu klären, ob circRNAs auch neue Angriffspunkte für spezielle Therapien darstellen könnten. CircFOXO3 wurde z.B. in verschiedenen Tumorgeweben als herunterreguliert beschrieben. Das trifft auch auf das Prostatakarzinom zu. Im Maus-Modell gelang es durch eine gezielte circFOXO3-Expression, die Apoptose von Tumorzellen zu induzieren, Tumorwachstum zu hemmen



und das Überleben der Tiere zu verlängern (60, 61). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass in Zukunft auch circRNAs eine Rolle in der Therapie beim PK spielen könnten.

Abschließend lässt sich feststellen, dass die Entdeckung und Erforschung von circRNAs zahlreiche neue Möglichkeiten für die moderne Medizin eröffnet. CircRNAs könnten nicht nur als neue Biomarker für diagnostische und prognostische Zielstellungen genutzt werden, sondern sie bieten auch die Chance, etablierte klinische und pathologische Methoden und Modelle zu ergänzen und zu verbessern. Sie sind sowohl in Geweben als auch in Körperflüssigkeiten nachweisbar. Durch ihre bisher beschriebenen und noch zu entdeckenden Funktionen sind sie potenzielle Zielstrukturen für zukünftige Therapieoptionen. In dieser explorativen Studie wurden sowohl RNAs zur Gewebedifferenzierung als auch eine RNA-Signatur zur Verbesserung klinischer Referenzmodelle zur BCR-Vorhersage etabliert und somit ein Grundstein für zukünftige weitere Forschungsansätze im Bereich der circRNAs beim PK gelegt.

## 8. Quellenverzeichnis

1. Jeck WR, Sharpless NE. Detecting and characterizing circular RNAs. *Nat Biotechnol.* 2014;32(5):453-61.
2. Cocquerelle C, Mascrez B, Héтуin D, Bailleul B. Mis-splicing yields circular RNA molecules. *FASEB J.* 1993;7(1):155-60.
3. Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, Bramsen JB, Finsen B, Damgaard CK, Kjems J. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature.* 2013;495(7441):384-8.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Conn SJ, Pillman KA, Toubia J, Conn VM, Salmanidis M, Phillips CA, Roslan S, Schreiber AW, Gregory PA, Goodall GJ. The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs. *Cell.* 2015;160(6):1125-34.
8. Bachmayr-Heyda A, Reiner AT, Auer K, Sukhbaatar N, Aust S, Bachleitner-Hofmann T, Mesteri I, Grunt TW, Zeillinger R, Pils D. Correlation of circular RNA abundance with proliferation--exemplified with colorectal and ovarian cancer, idiopathic lung fibrosis, and normal human tissues. *Sci Rep.* 2015;5:8057.
9. Sun HD, Xu ZP, Sun ZQ, Zhu B, Wang Q, Zhou J, Jin H, Zhao A, Tang WW, Cao XF. Down-regulation of circPVRL3 promotes the proliferation and migration of gastric cancer cells. *Sci Rep.* 2018;8(1):10111.
10. Wang M, Yu F, Li P. Circular RNAs: characteristics, function and clinical significance in hepatocellular carcinoma. *Cancers (Basel).* 2018;10(8).
11. 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, Têtu 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.e22.
12. Zhang C, Xiong J, Yang Q, Wang Y, Shi H, Tian Q, Huang H, Kong D, Lv J, Liu D, Gao X, Zi X, Sun Y. Profiling and bioinformatics analyses of differential circular RNA expression in prostate cancer cells. *Future Sci OA.* 2018;4(9):Fsoa340.

13. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(2):87-108.
14. Mottet N, Bellmunt J, Bolla M, Briers E, Cumberbatch MG, De Santis M, Fossati N, Gross T, Henry AM, Joniau S, Lam TB, Mason MD, Matveev VB, Moldovan PC, van den Bergh RCN, Van den Broeck T, van der Poel HG, van der Kwast TH, Rouvière O, Schoots IG, Wiegel T, Cornford P. EAU-ESTRO-SIOG guidelines on prostate cancer. part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent. *Eur Urol.* 2017;71(4):618-29.
15. Van den Broeck T, van den Bergh RCN, Arfi N, Gross T, Moris L, Briers E, Cumberbatch M, De Santis M, Tilki D, Fanti S, Fossati N, Gillessen S, Grummet JP, Henry AM, Lardas M, Liew M, Rouvière O, Pecanka J, Mason MD, Schoots IG, van Der Kwast TH, van Der Poel HG, Wiegel T, Willemse PM, Yuan Y, Lam TB, Cornford P, Mottet N. Prognostic value of biochemical recurrence following treatment with curative intent for prostate cancer: a systematic review. *Eur Urol.* 2019;75(6):967-87.
16. Cornford P, Bellmunt J, Bolla M, Briers E, De Santis M, Gross T, Henry AM, Joniau S, Lam TB, Mason MD, van der Poel HG, van der Kwast TH, Rouvière O, Wiegel T, Mottet N. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on prostate cancer. Part II: treatment of relapsing, metastatic, and castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol.* 2017;71(4):630-42.
17. Zhao Z, Weickmann S, Jung M, Lein M, Kilic E, Stephan C, Erbersdobler A, Fendler A, Jung K. A novel predictor tool of biochemical recurrence after radical prostatectomy based on a five-microRNA tissue signature. *Cancers (Basel).* 2019;11(10).
18. Brockman JA, Alanee S, Vickers AJ, Scardino PT, Wood DP, Kibel AS, Lin DW, Bianco FJ, Jr., Rabah DM, Klein EA, Ciezki JP, Gao T, Kattan MW, Stephenson AJ. Nomogram predicting prostate cancer-specific mortality for men with biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Eur Urol.* 2015;67(6):1160-7.
19. Stephenson AJ, Kattan MW, Eastham JA, Dotan ZA, Bianco FJ, Jr., Lilja H, Scardino PT. Defining biochemical recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy: a proposal for a standardized definition. *J Clin Oncol.* 2006;24(24):3973-8.
20. D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, Broderick GA, Tomaszewski JE, Renshaw AA, Kaplan I, Beard CJ, Wein A. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA.* 1998;280(11):969-74.
21. Stephenson AJ, Scardino PT, Eastham JA, Bianco FJ, Jr., Dotan ZA, DiBlasio CJ, Reuther A, Klein EA, Kattan MW. Postoperative nomogram predicting the 10-year probability of prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. *J Clin Oncol.* 2005;23(28):7005-12.
22. Mohler JL. The 2010 NCCN clinical practice guidelines in oncology on prostate cancer. *J Natl Compr Canc Netw.* 2010;8(2):145.
23. Cooperberg MR, Pasta DJ, Elkin EP, Litwin MS, Latini DM, Du Chane J, Carroll PR. The University of California, San Francisco Cancer of the Prostate Risk Assessment

score: a straightforward and reliable preoperative predictor of disease recurrence after radical prostatectomy. *J Urol*. 2005;173(6):1938-42.

24. Lorent M, Maalmi H, Tessier P, Supiot S, Dantan E, Foucher Y. Meta-analysis of predictive models to assess the clinical validity and utility for patient-centered medical decision making: application to the Cancer of the Prostate Risk Assessment (CAPRA). *BMC Med Inform Decis Mak*. 2019;19(1):2.

25. Meurs P, Galvin R, Fanning DM, Fahey T. Prognostic value of the CAPRA clinical prediction rule: a systematic review and meta-analysis. *BJU Int*. 2013;111(3):427-36.

26. Remmers S, Verbeek JFM, Nieboer D, van der Kwast T, Roobol MJ. Predicting biochemical recurrence and prostate cancer-specific mortality after radical prostatectomy: comparison of six prediction models in a cohort of patients with screening- and clinically detected prostate cancer. *BJU Int*. 2019;124(4):635-42.

27. Shariat SF, Karakiewicz PI, Suardi N, Kattan MW. Comparison of nomograms with other methods for predicting outcomes in prostate cancer: a critical analysis of the literature. *Clin Cancer Res*. 2008;14(14):4400-7.

28. Fine ND, LaPolla F, Epstein M, Loeb S, Dani H. Genomic classifiers for treatment selection in newly diagnosed prostate cancer. *BJU Int*. 2019;124(4):578-86.

29. Hiser WM, Sangiorgio V, Bollito E, Esnakula A, Feely M, Falzarano SM. Tissue-based multigene expression tests for pretreatment prostate cancer risk assessment: current status and future perspectives. *Future Oncol*. 2018;14(29):3073-83.

30. 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).

31. Rochow H, Jung M, Weickmann S, Ralla B, Stephan C, Elezkurtaj S, Kilic E, Zhao Z, Jung K, Fendler A, Franz A. Circular RNAs and their linear transcripts as diagnostic and prognostic tissue biomarkers in prostate cancer after prostatectomy in combination with clinicopathological factors. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21):7812.

32. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611-22.

33. Wu X, Xiao Y, Yan W, Ji Z, Zheng G. The human oncogene SCL/TAL1 interrupting locus (STIL) promotes tumor growth through MAPK/ERK, PI3K/Akt and AMPK pathways in prostate cancer. *Gene*. 2019;686:220-7.

34. Kuriyama S, Yoshida M, Yano S, Aiba N, Kohno T, Minamiya Y, Goto A, Tanaka M. LPP inhibits collective cell migration during lung cancer dissemination. *Oncogene*. 2016;35(8):952-64.

35. Wang L, Liang Y, Mao Q, Xia W, Chen B, Shen H, Xu L, Jiang F, Dong G. Circular RNA circCRIM1 inhibits invasion and metastasis in lung adenocarcinoma through the

microRNA (miR)-182/miR-93-leukemia inhibitory factor receptor pathway. *Cancer Sci.* 2019;110(9):2960-72.

36. Lee JW, Devanarayan V, Barrett YC, Weiner R, Allinson J, Fountain S, Keller S, Weinryb I, Green M, Duan L, Rogers JA, Millham R, O'Brien PJ, Sailstad J, Khan M, Ray C, Wagner JA. Fit-for-purpose method development and validation for successful biomarker measurement. *Pharm Res.* 2006;23(2):312-28.

37. Ohl F, Jung M, Xu C, Stephan C, Rabien A, Burkhardt M, Nitsche A, Kristiansen G, Loening SA, Radonić A, Jung K. Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization? *J Mol Med (Berl).* 2005;83(12):1014-24.

38. 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.

39. Salzman J, Chen RE, Olsen MN, Wang PL, Brown PO. Cell-type specific features of circular RNA expression. *PLoS Genet.* 2013;9(9):e1003777.

40. Shan G, Shao B, Liu Q, Zeng Y, Fu C, Chen A, Chen Q. circFMN2 sponges miR-1238 to promote the expression of LIM-Homeobox Gene 2 in prostate cancer cells. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2020;21:133-46.

41. Qiu L, Huang Y, Li Z, Dong X, Chen G, Xu H, Zeng Y, Cai Z, Liu X, Liu J. Circular RNA profiling identifies circADAMTS13 as a miR-484 sponge which suppresses cell proliferation in hepatocellular carcinoma. *Mol Oncol.* 2019;13(2):441-55.

42. Vincent HA, Deutscher MP. Substrate recognition and catalysis by the exoribonuclease RNase R. *J Biol Chem.* 2006;281(40):29769-75.

43. Rochow H, Franz A, Jung M, Weickmann S, Ralla B, Kilic E, Stephan C, Fendler A, Jung K. Instability of circular RNAs in clinical tissue samples impairs their reliable expression analysis using RT-qPCR: from the myth of their advantage as biomarkers to reality. *Theranostics.* 2020;10(20):9268-79.

44. Wang J, Zhang Y, Dou Z, Jiang H, Wang Y, Gao X, Xin X. Knockdown of STIL suppresses the progression of gastric cancer by down-regulating the IGF-1/PI3K/AKT pathway. *J Cell Mol Med.* 2019;23(8):5566-75.

45. Guo Z, He C, Yang F, Qin L, Lu X, Wu J. Long non-coding RNA-NEAT1, a sponge for miR-98-5p, promotes expression of oncogene HMGA2 in prostate cancer. *Biosci Rep.* 2019;39(9).

46. Jiang X, Guo S, Zhang Y, Zhao Y, Li X, Jia Y, Xu Y, Ma B. LncRNA NEAT1 promotes docetaxel resistance in prostate cancer by regulating ACSL4 via sponging miR-34a-5p and miR-204-5p. *Cell Signal.* 2020;65:109422.

47. Song Z, Zhuo Z, Ma Z, Hou C, Chen G, Xu G. Hsa\_Circ\_0001206 is downregulated and inhibits cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2019;47(1):2449-64.

48. Xia Q, Ding T, Zhang G, Li Z, Zeng L, Zhu Y, Guo J, Hou J, Zhu T, Zheng J, Wang J. Circular RNA expression profiling identifies prostate cancer- specific circRNAs in prostate cancer. *Cell Physiol Biochem*. 2018;50(5):1903-15.
49. Gerszten RE, Wang TJ. The search for new cardiovascular biomarkers. *Nature*. 2008;451(7181):949-52.
50. Artibani W, Porcaro AB, De Marco V, Cerruto MA, Siracusano S. Management of biochemical recurrence after primary curative treatment for prostate cancer: a review. *Urol Int*. 2018;100(3):251-62.
51. Alam S, Tortora J, Staff I, McLaughlin T, Wagner J. Prostate cancer genomics: comparing results from three molecular assays. *Can J Urol*. 2019;26(3):9758-62.
52. Ferro M, Buonerba C, Terracciano D, Lucarelli G, Cosimato V, Bottero D, Deliu VM, Ditunno P, Perdonà S, Autorino R, Coman I, De Placido S, Di Lorenzo G, De Cobelli O. Biomarkers in localized prostate cancer. *Future Oncol*. 2016;12(3):399-411.
53. Sinha A, Huang V, Livingstone J, Wang J, Fox NS, Kurganovs N, Ignatchenko V, Fritsch K, Donmez N, Heisler LE, Shiah YJ, Yao CQ, Alfaro JA, Volik S, Lapuk A, Fraser M, Kron K, Murison A, Lupien M, Sahinalp C, Collins CC, Tetu B, Masoomian M, Berman DM, van der Kwast T, Bristow RG, Kislinger T, Boutros PC. The proteogenomic landscape of curable prostate cancer. *Cancer Cell*. 2019;35(3):414-27.e6.
54. Mohler JL, Antonarakis ES, Armstrong AJ, D'Amico AV, Davis BJ, Dorff T, Eastham JA, Enke CA, Farrington TA, Higano CS, Horwitz EM, Hurwitz M, Ippolito JE, Kane CJ, Kuettel MR, Lang JM, McKenney J, Netto G, Penson DF, Plimack ER, Pow-Sang JM, Pugh TJ, Richey S, Roach M, Rosenfeld S, Schaeffer E, Shabsigh A, Small EJ, Spratt DE, Srinivas S, Tward J, Shead DA, Freedman-Cass DA. Prostate cancer, Version 2.2019, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2019;17(5):479-505.
55. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig L, Lijmer JG, Moher D, Rennie D, de Vet HC, Kressel HY, Rifai N, Golub RM, Altman DG, Hooft L, Korevaar DA, Cohen JF. STARD 2015: an updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. *BMJ*. 2015;351:h5527.
56. Koh W, Pan W, Gawad C, Fan HC, Kerchner GA, Wyss-Coray T, Blumenfeld YJ, El-Sayed YY, Quake SR. Noninvasive in vivo monitoring of tissue-specific global gene expression in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(20):7361-6.
57. Vo JN, Cieslik M, Zhang Y, Shukla S, Xiao L, Zhang Y, Wu YM, Dhanasekaran SM, Engelke CG, Cao X, Robinson DR, Nesvizhskii AI, Chinnaiyan AM. The landscape of circular RNA in cancer. *Cell*. 2019;176(4):869-81.e13.
58. Li Y, Zheng Q, Bao C, Li S, Guo W, Zhao J, Chen D, Gu J, He X, Huang S. Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis. *Cell Res*. 2015;25(8):981-4.
59. Rong D, Lu C, Zhang B, Fu K, Zhao S, Tang W, Cao H. CircPSMC3 suppresses the proliferation and metastasis of gastric cancer by acting as a competitive endogenous RNA through sponging miR-296-5p. *Mol Cancer*. 2019;18(1):25.

60. Du WW, Fang L, Yang W, Wu N, Awan FM, Yang Z, Yang BB. Induction of tumor apoptosis through a circular RNA enhancing Foxo3 activity. *Cell Death Differ.* 2017;24(2):357-70.
61. Kong Z, Wan X, Lu Y, Zhang Y, Huang Y, Xu Y, Liu Y, Zhao P, Xiang X, Li L, Li Y. Circular RNA circFOXO3 promotes prostate cancer progression through sponging miR-29a-3p. *J Cell Mol Med.* 2020;24(1):799-813.

## 9. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Hannah Rochow, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Zirkuläre RNAs und ihre linearen Transkripte als diagnostische und prognostische Gewebemarkers beim Prostatakarzinom - Circular RNAs and Their Linear Transcripts as Diagnostic and Prognostic Tissue Biomarkers in Prostate Cancer“ 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/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://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

---

Hannah Rochow



## 10. Anteilserklärung

Hannah Rochow hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

**Rochow H**, Jung M, Weickmann S, Ralla B, Stephan C, Elezkurtaj S, Kilic E, Zhao Z, Jung K, Fendler A, Franz A. Circular RNAs and Their Linear Transcripts as Diagnostic and Prognostic Tissue Biomarkers in Prostate Cancer after Prostatectomy in Combination with Clinicopathological Factors. Int J Mol Sci. 2020 Oct 22;21(21).

Beitrag im Einzelnen:

- Entwicklung der Fragestellung, Festlegung des Forschungsziels und Erarbeitung des Studienprotokolls zusammen mit den Seniorautoren (Siehe Abb. 1)
- Hauptverantwortlich für Erhebung klinischer Daten in der Datenbank, Durchführung aller experimentellen Arbeiten im Labor, Datenauswertung, Erstellung des Erstentwurfs des Manuskriptes
- Klinische Datenerhebung, Überprüfung der Daten, Vervollständigung der Patientendatenbank, Durchführung Telefoninterviews, Sichtung medizinischer Akten und Erstellung Tab. 1 der Publikation
- Datenauswertung der Microarray-Analyse, Erstellung der entsprechenden Abbildungen in der Publikation (Figure 2 der Publikation), Vergleich mit der RT-qPCR (Erstellung Tab. 4 der Publikation)
- Primerdesign und Etablierung der RT-qPCR-Assays nach den MIQE-Richtlinien (Erstellung Supplement der Publikation)
- Selektion geeigneter Gewebeproben für die RT-qPCR-Messungen, Isolation und Qualitätsprüfung der Gesamt-RNA für RT-qPCR-Messungen (Erstellung Tab. 3 der Publikation und Supplement Tabellen)
- Durchführung und Auswertung der Validierungsexperimente und erstellen der entsprechenden Abbildungen für die Publikation (Erstellung Figure 3 der Publikation und Supplement Tabellen)
- Statistische Berechnung/Auswertung der Expressionsdaten (Erstellung Figure 4 der Publikation) in Zusammenhang mit den klinischen Daten (ROC-Kurven, DCA-Analyse, Cox-Regressionen) und Erstellung der Tabellen 5-9/Figure 5/Supplement Tabellen der Publikation mit der Unterstützung von Prof. Dr. med. Klaus Jung
- Literaturrecherche und Verfassung des Erstentwurfes des Manuskriptes und des Supplements, Abstimmung mit allen Autoren, Vorbereitung des revidierten Manuskriptes und erneute Abstimmung mit den Ko-Autoren und dem korrespondierenden Autor

---

Ort, Datum

---

PD Dr. med. Bernhard Ralla

---

Klinikstempel

---

Hannah Rochow

## 11. Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2019** Selected Editions: SCIE,SSCI  
 Selected Categories: **“BIOCHEMISTRY and MOLECULAR BIOLOGY”** Selected  
 Category Scheme: WoS  
**Gesamtanzahl: 297 Journale**

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	CELL	258,178	38.637	0.564970
2	NATURE MEDICINE	85,220	36.130	0.168730
3	Annual Review of Biochemistry	20,499	25.787	0.024820
4	MOLECULAR CELL	69,148	15.584	0.166260
5	Molecular Cancer	15,448	15.302	0.023990
6	PROGRESS IN LIPID RESEARCH	6,139	15.083	0.005730
7	TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES	18,416	14.732	0.032060
8	TRENDS IN MICROBIOLOGY	13,604	13.546	0.022780
9	Signal Transduction and Targeted Therapy	1,182	13.493	0.003380
10	Nature Chemical Biology	22,084	12.587	0.060130
11	MOLECULAR PSYCHIATRY	22,227	12.384	0.054730
12	Molecular Plant	11,432	12.084	0.028530
13	NATURAL PRODUCT REPORTS	11,239	12.000	0.013610
14	NATURE STRUCTURAL & MOLECULAR BIOLOGY	27,178	11.980	0.056800
15	NUCLEIC ACIDS RESEARCH	201,649	11.501	0.403470
16	TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE	10,618	11.099	0.018720
17	GENOME RESEARCH	41,755	11.093	0.076940
18	MOLECULAR BIOLOGY AND EVOLUTION	50,486	11.062	0.084810
19	CELL DEATH AND DIFFERENTIATION	21,095	10.717	0.029600
20	Redox Biology	10,157	9.986	0.023810

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
21	EMBO JOURNAL	64,724	9.889	0.059690
22	CURRENT OPINION IN CHEMICAL BIOLOGY	10,968	9.689	0.017770
23	PLANT CELL	54,927	9.618	0.048640
24	CURRENT BIOLOGY	63,256	9.601	0.133170
25	MOLECULAR ASPECTS OF MEDICINE	6,207	9.577	0.005750
26	Molecular Systems Biology	8,914	8.991	0.017390
27	Cell Systems	3,822	8.673	0.029290
28	MATRIX BIOLOGY	6,878	8.572	0.011920
29	ONCOGENE	66,303	7.971	0.068320
30	Cell Chemical Biology	3,326	7.739	0.015770
31	CRITICAL REVIEWS IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY	3,675	7.634	0.006380
32	EMBO REPORTS	14,976	7.497	0.030290
33	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-REVIEWS ON CANCER	5,650	7.365	0.007800
34	PLOS BIOLOGY	31,650	7.076	0.060300
35	Essays in Biochemistry	2,383	6.966	0.005060
36	CURRENT OPINION IN STRUCTURAL BIOLOGY	11,035	6.908	0.021890
37	CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES	26,128	6.496	0.037010
38	Science Signaling	12,736	6.467	0.026590
39	ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING	21,119	6.323	0.024660
40	Molecular Ecology Resources	10,868	6.286	0.019630
41	FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE	42,665	6.170	0.036960
42	BIOMACROMOLECULES	38,863	6.092	0.031320

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
43	Computational and Structural Biotechnology Journal	1,954	6.018	0.004980
44	CYTOKINE & GROWTH FACTOR REVIEWS	5,935	5.982	0.007380
45	Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry	634	5.800	0.000340
46	EXPERIMENTAL AND MOLECULAR MEDICINE	5,536	5.418	0.010300
47	AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY	12,243	5.373	0.016040
48	RNA Biology	6,589	5.350	0.015820
49	Acta Crystallographica Section D-Structural Biology	21,750	5.266	0.018220
50	MOLECULAR ECOLOGY	38,951	5.163	0.050800
51	INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES	47,121	5.162	0.057240
52	BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS	12,651	5.160	0.016140
53	HUMAN MOLECULAR GENETICS	39,652	5.100	0.064170
54	Journal of Genetics and Genomics	2,271	5.065	0.004310
55	Cell and Bioscience	1,898	5.026	0.004210
56	Antioxidants	2,568	5.014	0.004170
57	FASEB JOURNAL	43,126	4.966	0.043730
58	International Review of Cell and Molecular Biology	2,167	4.934	0.004350
59	Open Biology	2,886	4.931	0.009590
60	Journal of Integrative Plant Biology	5,005	4.885	0.006830
61	Advances in Microbial Physiology	1,227	4.875	0.000960
61	Nucleic Acid Therapeutics	1,030	4.875	0.003610

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
63	JOURNAL OF NUTRITIONAL BIOCHEMISTRY	11,460	4.873	0.011150
64	STRUCTURE	15,145	4.862	0.026940
65	International Journal of Biological Sciences	6,262	4.858	0.009710
66	BIOORGANIC CHEMISTRY	5,712	4.831	0.006730
67	Genes & Diseases	1,081	4.803	0.003310
68	JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY	56,952	4.760	0.040330
69	BIOFACTORS	3,769	4.734	0.002930
70	BIOELECTROCHEMISTRY	4,944	4.722	0.004950
71	Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology	805	4.700	0.000670
72	JOURNAL OF ENZYME INHIBITION AND MEDICINAL CHEMISTRY	5,415	4.673	0.005420
73	BIOESSAYS	10,189	4.627	0.016560
74	INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES	77,286	4.556	0.143760
75	APOPTOSIS	6,539	4.543	0.005880
76	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-MOLECULAR AND CELL BIOLOGY OF LIPIDS	10,266	4.519	0.016350
77	ACS Chemical Neuroscience	6,881	4.486	0.015300
78	JOURNAL OF LIPID RESEARCH	24,223	4.483	0.022420
79	ACS Chemical Biology	12,884	4.434	0.035490
80	FEBS Journal	18,845	4.392	0.025250
81	JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B-BIOLOGY	12,794	4.383	0.013640
82	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-MOLECULAR BASIS OF DISEASE	15,965	4.352	0.024200

Selected JCR Year: 2019; Selected Categories: "BIOCHEMISTRY and MOLECULAR BIOLOGY"

## 12. Zugrundeliegende Publikation



International Journal of  
Molecular Sciences



Article

### Circular RNAs and Their Linear Transcripts as Diagnostic and Prognostic Tissue Biomarkers in Prostate Cancer after Prostatectomy in Combination with Clinicopathological Factors

Hannah Rochow <sup>1,2</sup>, Monika Jung <sup>1</sup>, Sabine Weickmann <sup>1</sup>, Bernhard Ralla <sup>1</sup>, Carsten Stephan <sup>1,2</sup>, Sefer Elezkurtaj <sup>3</sup>, Ergin Kilic <sup>3,4</sup>, Zhongwei Zhao <sup>1,5</sup>, Klaus Jung <sup>1,2,\*†</sup>, Annika Fendler <sup>1,6,7,†</sup> and Antonia Franz <sup>1,†</sup>

<sup>1</sup> Department of Urology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, 10117 Berlin, Germany; hannah.rochow@charite.de (H.R.); mchjung94@gmail.com (M.J.); sabine.weickmann@charite.de (S.W.); bernhard.ralla@charite.de (B.R.); carsten.stephan@charite.de (C.S.); zhaozhongweixy@163.com (Z.Z.); annika.fendler@crick.ac.uk (A.F.); antonia.franz@charite.de (A.F.)

<sup>2</sup> Berlin Institute for Urologic Research, 10115 Berlin, Germany

<sup>3</sup> Institute of Pathology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, 10117 Berlin, Germany; sefer.elezkurtaj@charite.de (S.E.); e.kilic@pathologie-leverkusen.de (E.K.)

<sup>4</sup> Institute of Pathology, Hospital Leverkusen, 51375 Leverkusen, Germany

<sup>5</sup> Department of Urology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China

<sup>6</sup> Max Delbrueck Center for Molecular Medicine in the Helmholtz Association, Cancer Research Program, 13125 Berlin, Germany

<sup>7</sup> Cancer Dynamics Laboratory, The Francis Crick Institute, 1 Midland Road, London NW1 1AT, UK

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

† These authors share senior authorship.

Received: 1 September 2020; Accepted: 20 October 2020; Published: 22 October 2020

**Abstract:** As new biomarkers, circular RNAs (circRNAs) have been largely unexplored in prostate cancer (PCa). Using an integrative approach, we aimed to evaluate the potential of circRNAs and their linear transcripts (linRNAs) to act as (i) diagnostic biomarkers for differentiation between normal and tumor tissue and (ii) prognostic biomarkers for the prediction of biochemical recurrence (BCR) after radical prostatectomy. In a first step, eight circRNAs (circATXN10, circCRIM1, circCSNK1G3, circGUCY1A2, circLPP, circNEAT1, circRHOBTB3, and circSTIL) were identified as differentially expressed via a genome-wide circRNA-based microarray analysis of six PCa samples. Additional bioinformatics and literature data were applied for this selection process. In total, 115 malignant PCa and 79 adjacent normal tissue samples were examined using robust RT-qPCR assays specifically established for the circRNAs and their linear counterparts. Their diagnostic and prognostic potential was evaluated using receiver operating characteristic curves, Cox regressions, decision curve analyses, and C-statistic calculations of prognostic indices. The combination of circATXN10 and linSTIL showed a high discriminative ability between malignant and adjacent normal tissue PCa. The combination of linGUCY1A2, linNEAT1, and linSTIL proved to be the best predictive RNA-signature for BCR. The combination of this RNA signature with five established reference models based on only clinicopathological factors resulted in an improved predictive accuracy for BCR in these models. This is an encouraging study for PCa to evaluate circRNAs and their linRNAs in an integrative approach, and the results showed their clinical potential in combination with standard clinicopathological variables.

**Keywords:** prostate cancer; microarray; identification; validation and differential expression of circular RNAs; circular RNAs and linear counterparts; biochemical recurrence; diagnostic and prognostic tissue biomarkers; improved predictive accuracy by RNA signature

---

## 1. Introduction

Prostate cancer (PCa) is the second most common cancer type among men [1]. Following radical prostatectomy, which is used as a therapeutic curative option for patients suffering from PCa, biochemical recurrence (BCR), defined as a re-increased serum concentration of prostate-specific antigen (PSA) of  $>0.2 \mu\text{g/L}$  [2,3], is clinically considered to be the first sign of disease recurrence [4,5]. An evaluation of six recent studies with more than 1000 patients in each showed that approximately 15–34% of surgically treated patients suffered from BCR within 5 to 10 years after surgery [6]. Following BCR without secondary therapy, distant metastasis manifests in approximately 30% of patients and 19–27% will die within 10 years [7,8]. These data clearly show that early and reliable prediction of patients with a high risk of BCR is necessary to optimize the frequency of follow-up and thus the decision to undergo adjuvant therapy.

For BCR risk prediction, numerous scoring systems based on clinicopathological factors such as the Gleason score or the respective International Society of Urological Pathology (ISUP) grade, pathological tumor stage (pT stage), and preoperative PSA level are currently applied. Among these tools are the Cancer of the Prostate Risk Assessment Postsurgical Score (CAPRAS) [9] and those developed by D'Amico et al. [10], Stephenson et al. [7], and the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) [11]. Although all clinicopathological factors are, to some extent, associated with patient outcome, the prognostic accuracy of these nomograms is generally unsatisfactory [12–16]. In this context, prognostic molecular biomarkers could significantly improve the predictive accuracy of tools based only on clinicopathological factors [17–21]. We recently elaborated a five-microRNA signature that outperforms the BCR scoring systems mentioned above [6]. In addition, the combined use of clinicopathological factors and molecular markers was found to significantly improve the predictive accuracy compared to the separately calculated predictive value [6]. Based on this experience using molecular markers in BCR prediction, we decided to extend this approach to circular RNAs (circRNA), which we successfully introduced as prognostic biomarkers in clear cell renal cell carcinoma [22].

Recently, circRNAs have the subject of increasing interest in medicine. These RNAs consist of a single strand of RNA in a closed loop [23,24], and are formed by alternative splicing of mostly exonic sequences. One host gene can form several different circRNAs [25,26]. The functions of circRNAs are still being investigated. Their ability to sponge microRNAs (miRNAs), a process in which circRNAs prevent the inhibitory properties of miRNA and therefore promote the expression of target mRNAs, is relatively well known [23,24,27]. Furthermore, circRNAs may regulate the expression of their parenteral genes by interacting with RNA polymerase II [28], but they can also interact with RNA-binding proteins and are therefore involved in the regulation of gene expression [29]. Some circRNAs may even be able to encode proteins [30]. CircRNAs have expression patterns that are specific to different cells or tissues and have been shown to play roles in cell regulation, including physiological as well as pathological processes [24,31–35]. It has been shown that circRNAs can act as oncogenes and tumor suppressors in the initiation and progression of different cancers, e.g., hepatocellular carcinoma, gastric carcinoma, colorectal cancer, and renal cell carcinoma [22,36–39]. All of these aspects justify a particular interest in using circRNAs as biomarkers in diagnosis, prognosis, and prediction, as well as for therapeutic targets [33,40–43].

CircRNAs in PCa are also a subject of present research. Last year, Chen et al. [44] identified a broad signature of PCa-specific circRNAs via ultra-deep rRNA-depleted RNA sequencing of localized PCa tissue samples. Moreover, specific circRNA functions were shown. CircCSNK1G3, for example, seems to promote cell proliferation in PCa [44]. Furthermore, Zhang et al. [45] applied a bioinformatics approach using various PCa cells to identify numerous circRNAs, including

circGUCY1A2, as potential candidates for PCa progression. Other working groups using microarray platforms have reported lists of the top up- and downregulated circRNAs in PCa tissue compared with adjacent normal tissue [46,47]. Recent studies have particularly analyzed functional features and underlying molecular mechanisms of individual circRNAs [48–53]. Several publications particularly focused on androgen receptor pathway related circRNAs [54–57]. Correlations between the expression of circRNAs and relevant clinicopathological factors or survival Kaplan-Meier analyses have been reported [44,51,58–62]. However, it is astonishing that the potential of circRNAs as diagnostic and prognostic tissue biomarkers has so far only been evaluated in isolated cases [47,58,61]. As far as we know, only one study has ever conducted multivariate analyses of circRNAs in connection with clinicopathological factors [61]. Studies on the clinical validity of circRNAs in relation to BCR are still lacking.

Thus, in this study, we aimed to (i) identify differentially expressed circRNAs in six paired samples of PCa tissue and adjacent normal tissue using microarray analysis, (ii) validate the differential expression of eight chosen circRNAs and their linear counterparts via reverse-transcription quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR), (iii) examine the differentiating potential between malignant and non-malignant prostate tissue in 194 samples of 115 PCa patients including 79 paired samples, and (iv) evaluate the potential of the chosen circRNAs and their linear counterparts as biomarkers in combination with the clinicopathological factors of PCa patients after radical prostatectomy to predict BCR.

## 2. Results

### 2.1. Patient Characteristics and Study Design

One hundred and fifteen untreated PCa patients who underwent radical prostatectomy between 2007 and 2014 with follow-up data until November 2019 were included in this study. Follow-up data were based on medical records and telephone contacts with the patients, their physicians, and their family members. In total, 194 tissue samples with 79 pairs of adjacent normal and malignant samples, and 36 with malignant characteristics only were investigated (Table 1). The sample size was determined using a power-adapted calculation ( $\alpha = 5\%$ , power = 80%; Supplementary Information S1 (Supplementary Materials)). A two-to-one selection of available samples, based on patients with BCR, was retrospectively performed with 76 patients without BCR and 39 with BCR. BCR was defined as a postoperative PSA increase above 0.2  $\mu\text{g/L}$  after radical prostatectomy, as confirmed by consecutive increased values [2,3]. The workflow diagram presented in Figure 1 outlines the design of this study, which involved three phases based on the above postulated objectives for this investigation: (i) the discovery phase of identifying differentially expressed circRNAs using a microarray screening approach and the selection of circRNAs for further evaluation; (ii) analytical confirmation of the circular nature of selected circRNAs and elaboration of “fit-for-purpose” RT-qPCR assays for circRNAs and their linear transcripts; and (iii) initial clinical evaluations regarding their validity as discriminative tissue classifiers and the predictive value of these biomarkers when applied alone and in combination with conventional clinicopathological factors.

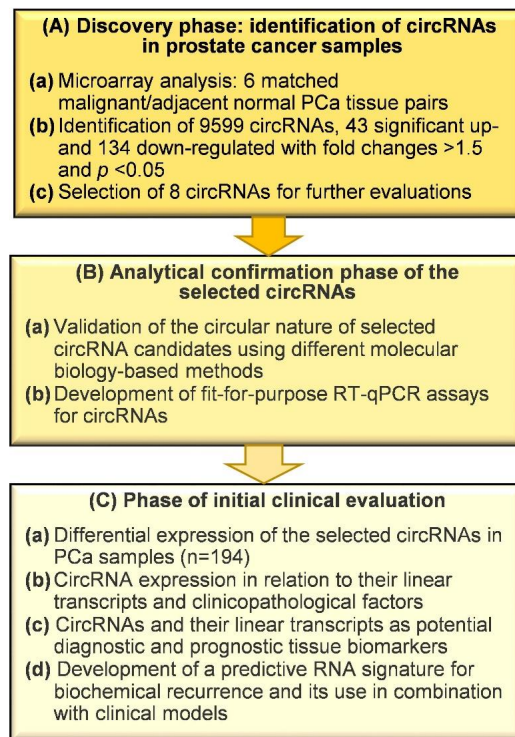
**Table 1.** Clinicopathological characteristics of the study group.

Characteristics	All Patients	Patients with Biochemical Recurrence	Patients without Biochemical Recurrence	<i>p</i> -Value <sup>a</sup>
Patients, no. (%)	115 (100)	39 (34)	76 (66)	
Age, median years, (IQR)	67 (62–70)	66 (59–71)	67 (64–70)	0.339
PSA, $\mu\text{g/L}$ (IQR)	7.7 (5.4–12.2)	9.7 (6.1–19.5)	7.0 (5.4–9.5)	0.011
Prostate volume, $\text{cm}^3$ (IQR)	32 (25–45)	30 (23–39)	33 (26–45)	0.264
DRE, no. (%)				0.067
Non-suspicious	67 (58)	17 (44)	50 (66)	
Suspicious	32 (28)	14 (36)	18 (24)	
Unclassified	16 (14)	8 (20)	8 (10)	



pT status, no. (%)				0.005
pT1c	1 (1)	0	1 (1)	
pT2a	2 (2)	0	2 (3)	
pT2b	1 (1)	0	1 (1)	
pT2c	61 (53)	13 (33)	48 (63)	
pT3a	27 (23)	11 (28)	16 (21)	
pT3b	23 (20)	15 (39)	8 (11)	
ISUP Grade groups, no. (%)				0.0001
1	26 (23)	2 (5)	24 (31)	
2	47 (41)	13 (33)	34 (45)	
3	30 (26)	14 (36)	16 (21)	
4	4 (3)	4 (11)	0 (0)	
5	8 (7)	6 (15)	2 (3)	
pN status, no. (%)				0.017
pN0/Nx	109 (95)	34 (87)	75 (99)	
pN1	6 (5)	5 (13)	1 (1)	
Surgical margin, no. (%)				0.030
Negative	64 (56)	16 (41)	48 (63)	
Positive	51 (44)	23 (59)	28 (37)	
Follow-up after surgery				< 0.0001
Median months (IQR)	41 (26–72)	19.9 (9.8–41)	52 (38–80)	

Abbreviations: CI, confidence interval; DRE, digital rectal examination; IQR, interquartile range; ISUP Grade groups, histopathological grade system based on Gleason score according to the International Society of Urologic Pathology; pN, lymph node status; PSA, total prostate specific antigen before surgery; pT, pathological tumor classification. <sup>a</sup> *p*-Values (Mann-Whitney *U* test; Chi-square or Fisher's exact test) indicate the association of the clinicopathological variables with patients with and without biochemical recurrence.

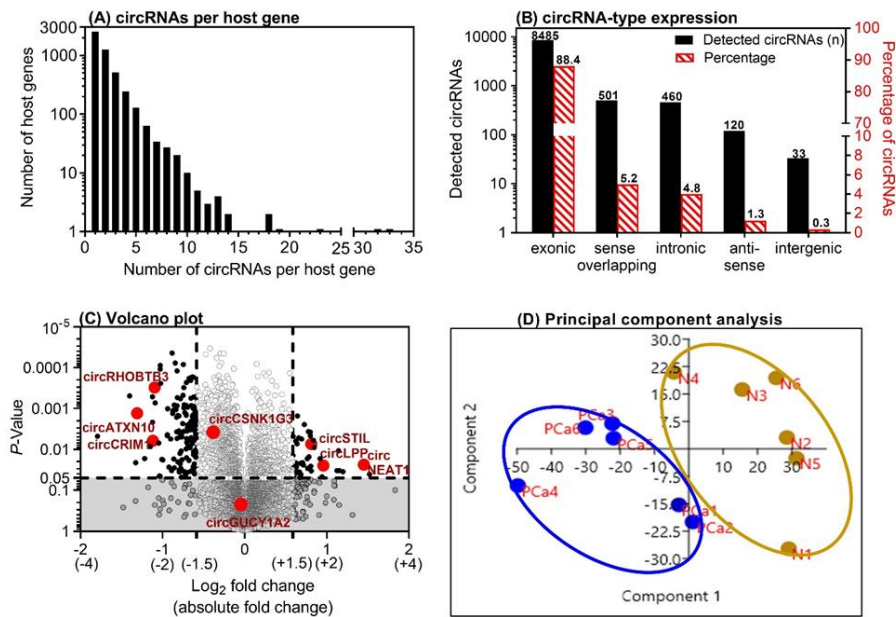


**Figure 1.** Workflow of the study in three phases. Abbreviations: circRNA, circular RNA; PCa, prostate cancer; RT-qPCR, reverse-transcription quantitative real-time polymerase chain reaction.

## 2.2. Discovery of circRNAs in Prostate Cancer Tissue Using Microarray Analysis

### 2.2.1. Identification of Differentially Expressed circRNAs

Six matched PCa tissue samples were examined using ArrayStar microarray experiment. A total of 9599 circRNAs out of 13,617 distinct probes on the array were detected (Supplementary Microarray Data File.xlsx (Supplementary Materials)). This number of circRNAs derived from 4838 host genes, since numerous host genes can form multiple circRNA isoforms [26]. Approximately 26% of all detected circRNAs were found to be from ~50% of the host genes that form only one circRNA, while the other 41% of circRNAs were found from the ~35% of the host genes that can form two or three circRNAs. Approximately 3.2% of the circRNAs were derived from only 0.6% of the host genes able to form 10 or more circRNAs (Figure 2A). Different genomic regions can be the origin of circRNAs. In this PCa microarray screening, approximately 90% of circRNAs were of exonic origin, but intronic, sense-overlapping, anti-sense, and intergenic circRNA types were also detected (Figure 2B). These data correspond with our own results in renal cell carcinoma [22] and data from studies on other tissues [25]. Regarding the differential expression between adjacent normal and malignant tissue, the array data identified 43 upregulated and 134 downregulated circRNAs with a higher than absolute 1.5-fold change ( $p < 0.05$ ) in malignant tissue samples (Figure 2C). Using a threshold of 2-fold change, only six upregulated and 18 downregulated circRNAs were identified. Based on a principal component analysis of the microarray expression data, two separate clusters with malignant and adjacent normal tissue characteristics were ascertained (Figure 2D).



**Figure 2.** Microarray analysis results of six matched prostate cancer (PCa) tissue samples. **(A)** The number of circular RNAs (circRNAs) expressed per host gene in the malignant tissue samples and their matched adjacent normal tissue samples from PCa specimens after prostatectomy. **(B)** Genomic origin of the detected circRNAs on the microarray. **(C)** Volcano plot with the up- and downregulated circRNAs in malignant vs. adjacent normal tissue samples. The dashed lines indicate the thresholds: absolute 1.5-fold changes and  $p$ -values of 0.05 in the  $t$ -test. The eight circRNAs that were selected for further evaluation in this study are marked. **(D)** Results of the principal component analysis with the left cluster of tumor samples (PCa1–PCa6, marked in blue) and the right cluster with the paired adjacent normal tissue samples (N1–N6, marked in brown).

### 2.2.2. Selection of circRNAs for Further Evaluation

In addition to the microarray-based expression results (absolute fold-change >1.5 with *unadjusted*  $p < 0.05$  and sufficiently raw intensity on the microarray), we used interest-specific criteria to select circRNAs for further investigation. We selected six circRNAs (Table 2), for which no information on prostate carcinoma was available. Their host genes had been described in individual studies with regard to their roles in either PCa progression (e.g., *CRIM1*, *NEAT1*, and *STIL* [63–65]) or other cancers (e.g., *LPP* and *RHOBTB3* [66,67]). Some of the selected circRNAs had been partly identified in other cancers (e.g., *circCRIM1* and *circRHOBTB3* [22,68]). Finally, an *in silico* analysis of miRNA interaction with these circRNAs was performed using the algorithm provided by the CircInteractome tool and the miRDB and TargetScan databases [69–71]. In all cases, the circRNAs were found to be crucial points for potentially relevant miRNA–gene interactions (Figure S1). This also fulfilled a selection criterion for further investigations to be planned. *NEAT1* was identified as a special case because it already has miRNA-sponging functions as a long non-coding RNA (lncRNA) [65]. Thus, the relationship between the circRNA and the lncRNA transcript was of particular interest. In this circRNA panel, two additional circRNAs from the genes *CSNK1G3* and *GUCY1A2* were included as these circRNAs were recently identified in PCa tissue samples and PCa cell lines as mentioned in the introduction [44,45]. Collectively, the microarray analysis of the six paired samples in the discovery phase (Figure 1) must be considered an exploratory study for ranking deregulated circRNAs using the unadjusted  $p$ -values supported by the mentioned additional selection criteria. Under these

conditions, an exploratory study should be preferably analyzed without *p*-value adjustment, but needs a technical replication by a different assay technique and biological validation using other clinical samples [72–74]. This was done in the two subsequent workflow phases B and C (Figure 1).

Data on the selected circRNAs are given in Table 2. Currently, there is no standardized nomenclature for circRNAs [22], and the designations of the database circBase are mainly used as a reference [75]. In order to facilitate the readability of the manuscript, official gene symbols with the prefixes “circ” and “lin” are used herein to characterize our selected circRNAs and the corresponding linear transcripts from the same host gene (Table 2).

**Table 2.** List of circular RNAs (circRNAs) selected for further evaluation in this study based on their differential expression between malignant and adjacent normal tissue samples data in the microarray discovery study phase and literature search.

circRNA in Manuscript	circRNA ID in circBase <sup>a,b</sup>	Absolute Fold Change on Microarray ( <i>p</i> -Value)	Best Transcript	Official Gene Symbol (Official Gene Name)
Upregulated circRNAs				
circLPP	circ_0003759	1.94 (0.025)	NM_005578.5	LPP (LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma)
circNEATI	circ_0000324	2.73 (0.0235)	NR_131012.1	NEATI (Nuclear paraspeckle assembly transcript 1)
circSTIL	circ_0000069	1.75 (0.007)	NM_001282936.1	STIL (STIL centriolar assembly protein)
Downregulated circRNAs				
circATXN10	circ_0001246	2.48 (0.001)	NM_013236.4	ATXN10 (Ataxin 10)
circCRIM1	circ_0007386	2.17 (0.006)	NM_016441.3	CRIM1 (Cysteine rich transmembrane BMP regulator 1)
circRHOTB3	circ_0007444	2.14 (0.0003)	NM_014899.4	RHOTB3 (Rho related BTB domain containing 3)
circRNAs from Literature <sup>c</sup>				
circCSNK1G3	circ_0001522	-1.31 (0.003)	NM_001044723.2	CSNK1G3 (Casein kinase 1 gamma 3)
circGUCY1A2	circ_0008602	-1.02 (0.305)	NM_000855.3	GUCY1A2 (Guanylate cyclase 1 soluble subunit alpha 2)

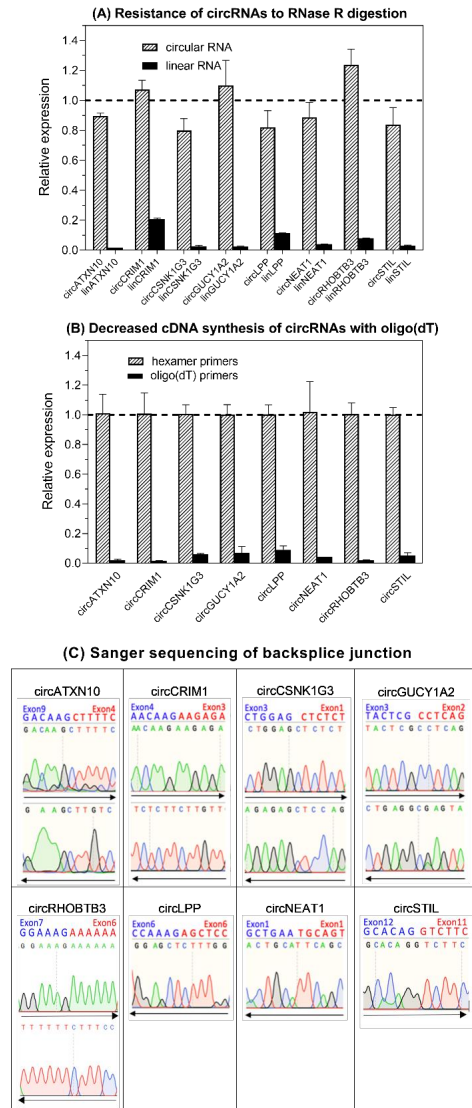
<sup>a</sup> The obligatory prefix *hsa\_* was omitted to facilitate the readability. <sup>b</sup> In the separate Supplementary Microarray Data File.xlsx as part of the Supplementary Materials, detailed information is given for all detected circRNAs including source, chromosome localization, strand, circRNA type, sequences, and the circRNA IDs specific for ArrayStar Microarrays and the database circBase [75]. <sup>c</sup> Chen et al. [44] for circCSNK1G3 and Zhang et al. [45] for circGUCY1A2.

### 2.3. Analytical Confirmation Phase of the Selected circRNAs

#### 2.3.1. Experimental Proof of the Circular Nature of Transcripts

RT-qPCR assays using SYBRGreen I were established for the eight selected circRNAs and their linear counterparts, taking into account the MIQE guidelines “Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments” [76] (Supplementary Information S3 (Supplementary Materials) with the Tables S1–S7 in addition to Section 4 of this paper). Experimental confirmation of the circular nature of the identified circRNAs via microarray and sequencing technologies was achieved using different tests to confirm the characteristics of the circRNA-specific backsplice junction [24,77,78]. Figure 3 shows that circRNAs are resistant to RNase R digestion (Figure 3A), distinctly decreased complementary DNA (cDNA) synthesis occurred when oligo(dT)<sub>18</sub> primers were used compared with when random hexamer primers (Figure 3B) were used, and the backsplice junction was confirmed by Sanger sequencing (Figure 3C). Melting curve analysis and

electrophoresis of the amplicons were applied in order to validate the analytical specificity of the RT-qPCR products in all assays (Figures S2, S3, and Table S7).



**Figure 3.** Experimental proof of the circular nature of the circRNAs selected in this study. **(A)** Resistance of circRNAs to RNase R digestion compared with linear RNAs. Data for triplicates (mean  $\pm$  standard deviation) normalized to controls without RNase treatment are presented. **(B)** Decreased cDNA synthesis of circRNAs with oligo(dT)<sub>18</sub> vs. random hexamer primers. Data are given as the relative expression normalized to hexamer-primers-based cDNA synthesis. The relative expression was markedly decreased in all circRNAs (at least  $n = 3$  of tissue pools) when using oligo(dT)<sub>18</sub> primers in comparison to random hexamer tail primers, indicating that the circRNAs lacked a poly(A) tail. **(C)** Base sequence of circRNA backsplice junction pictured by Sanger sequencing. *CircLPP*, *circNEAT1*, and *circSTIL* were only sequenced in one direction as one of the primers was junction-spanning (Table

S3). The sequencing result of circRHOBTB3 corresponded to that in kidney carcinoma [22]. Methodical details for all experiments listed here are described in Section 4 and Supplementary Information S4 (Supplementary Materials).

### 2.3.2. Analytical Performance of RT-qPCR Assays

According to the MIQE guidelines [76] and also to the “Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy Studies” (STARD) [79], the repeatability (intra-assay variation) and reproducibility (inter-assay variation) of the measurements should be used decisive criteria for the performance and robustness of RT-qPCR tests. Supported by the analytical specificity of the established assays (Figures S2 and S3) and the characteristics of the PCR standard curves (Table S7), the data shown in Table 3 proved that the assays were suitable for “fit-for-purpose” RT-qPCR measurements in clinical studies [80]. An exception was circNEAT1, which had rather poor repeatability and reproducibility due to its very low expression.

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

RNA	Repeatability <sup>a</sup>		Reproducibility <sup>b</sup>	
	Cq Value	Relative Quantities	Cq Value	Relative Quantities
	Mean (%RSD)	Mean (%RSD)	Mean ± SD (%RSD)	Mean ± SD (%RSD)
circATXN10	24.49 (0.595)	1.345 (10.4)	24.31 ± 0.144 (0.591)	1.004 ± 0.100 (9.98)
circCRIM1	24.61 (0.455)	1.299 (7.59)	24.39 ± 0.115 (0.472)	1.003 ± 0.078 (7.79)
circCSNK1G3	21.47 (0.289)	1.164 (4.28)	21.34 ± 0.131 (0.613)	1.003 ± 0.093 (9.22)
circGUCY1A2	24.68 (0.516)	1.461 (8.81)	24.68 ± 0.134 (0.541)	1.003 ± 0.092 (9.18)
circLPP	25.71 (0.314)	1.177 (5.71)	25.76 ± 0.104 (0.406)	1.002 ± 0.070 (7.00)
circNEAT1	35.56 (0.680)	1.285 (16.4)	36.80 ± 0.309 (0.838)	1.017 ± 0.214 (21.1)
circRHOBTB3	23.91 (0.241)	1.055 (3.95)	24.02 ± 0.178 (0.739)	1.006 ± 0.121 (12.1)
circSTIL	28.51 (0.542)	1.261 (10.9)	28.47 ± 0.105 (0.369)	1.002 ± 0.072 (7.18)
linATXN10	20.23 (0.341)	1.250 (5.07)	20.21 ± 0.106 (0.525)	1.002 ± 0.072 (7.14)
linCRIM1	21.67 (0.257)	1.305 (3.85)	21.49 ± 0.145 (0.673)	1.004 ± 0.102 (10.1)
linCSNK1G3	21.73 (0.275)	1.052 (4.13)	22.23 ± 0.152 (0.683)	1.003 ± 0.091 (9.08)
linGUCY1A2	23.55 (0.480)	1.458 (8.22)	22.51 ± 0.134 (0.596)	1.004 ± 0.096 (9.57)
linLPP	19.27 (0.472)	1.193 (6.64)	19.06 ± 0.121 (0.633)	1.003 ± 0.085 (8.46)
linNEAT1	18.79 (0.231)	1.641 (2.96)	19.80 ± 0.079 (0.401)	1.001 ± 0.054 (5.38)
linRHOBTB3	21.23 (0.259)	1.147 (3.73)	21.34 ± 0.170 (0.796)	1.006 ± 0.120 (11.9)
linSTIL	25.88 (0.411)	1.381 (5.22)	26.22 ± 0.131 (0.500)	1.003 ± 0.089 (8.94)
ALAS1	23.04 (0.305)	1.113 (4.86)	23.32 ± 0.064 (0.275)	1.001 ± 0.043 (4.33)
HPRT1	25.32 (0.411)	1.192 (7.09)	25.97 ± 0.112 (0.432)	1.002 ± 0.077 (7.75)

Abbreviations: Cq, quantification cycle; %RSD, percent relative standard deviation; SD, standard deviation; ALAS1, 5'-aminolevulinate synthase 1; HPRT1, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1. ALAS1 and HPRT1 were used as reference genes [81]. <sup>a</sup>  $n = 20$ ; %RSD was calculated from duplicate measurements using the root mean square method based on Cq values and relative quantities, respectively. <sup>b</sup>  $n = 5$  inter-assay measurements; %RSD (Cq) corresponds to the percent relative standard deviation using the Cq values. %RSD (Relative quantities) corresponds to the percent relative standard deviation using the relative quantities within the inter-assay measurements of the respective RNA variable.

## 2.4. Clinical Assessment

### 2.4.1. Differential Expression of circRNAs in Relation to Clinicopathological Variables

In the first step, we compared the circRNA expression data obtained from the six paired tumor and adjacent normal tissue samples using microarray analysis and the established RT-qPCR assays (Table 4). The expression results were in good agreement between both measurement methods for the circRNAs, with the exceptions of circLPP and circSTIL. CircLPP and circSTIL were found to be upregulated in the microarray analysis but downregulated in RT-qPCR measurements. Despite this

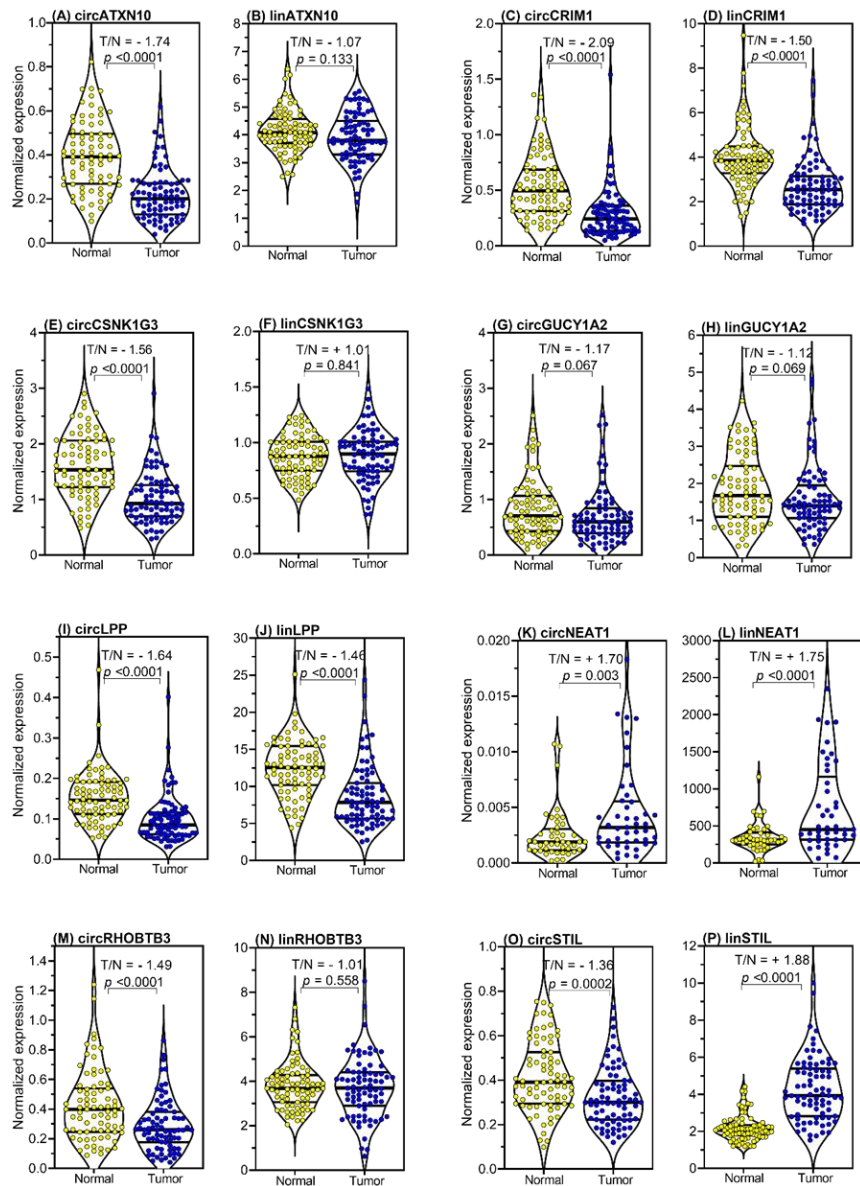
clear discrepancy, we decided to include these two circRNAs together with their linear transcripts in further analyses.

**Table 4.** Comparison of the circRNA expression data of the six paired tumor and adjacent normal tissue samples used in the microarray and RT-qPCR analyses.

circRNA	Microarray Expression Data <sup>a</sup>	RT-qPCR Expression Data <sup>b</sup>
	Ratio of Tumor to Normal	Ratio of Tumor to Normal
	Tissue ( <i>p</i> -Value)	Tissue ( <i>p</i> -Value)
circATXN10	-2.48 (0.001)	-2.09 (0.020)
circCRIM1	-2.17 (0.006)	-2.45 (0.027)
circCSNK1G3	-1.31 (0.003)	-1.84 (0.027)
circGUCY1A2	-1.02 (0.305)	-1.07 (0.781)
<b>circLPP</b>	<b>+1.94 (0.025)</b>	<b>-2.01 (0.004)</b>
circNEAT1	+2.73 (0.024)	+4.33 (0.061)
circRHOBTB3	-2.14 (0.0003)	-2.05 (0.041)
<b>circSTIL</b>	<b>+1.75 (0.007)</b>	<b>-1.35 (0.086)</b>

<sup>a</sup> Expression data correspond to the data shown in Table 2 (*t*-test of the six paired tissue samples used in microarray analyses). <sup>b</sup> Expression data of the paired samples used in the microarray analyses measured by the established circRNA assays in this study and normalized to the reference genes *ALAS1* and *HPRT1* (*t*-test of paired data).

The expression levels of the circRNAs and their linear transcripts were measured and evaluated in all samples of the studied cohort ( $n = 194$ ). To examine the differential expression between adjacent normal and malignant tissue samples, only the expression results of the paired samples of adjacent normal and malignant tissue samples were compared, in order to avoid bias due to biological variations between patients (Figure 4). Significant differential expression was observed between tumor and normal tissue samples, as indicated by T/N indices (Figure 4), for both circRNAs and their corresponding linear transcripts (Figure 4 and detailed in Table S8). The expression levels of all circRNAs except circNEAT1 and circGUCY1A2 were downregulated in tumor samples; circNEAT1 was upregulated and the expression level of circGUCY1A2 did not differ between the two tissue samples. In contrast, only the linear transcripts linCRIM1 and linLPP were downregulated in the tumor samples, while linSTIL and linNEAT1 were upregulated, and linATXN10, linCSNK1G3, linGUCY1A2, and linRHOBTB3 showed no significant differences in expression between the normal and tumor tissue samples.



**Figure 4.** Expression levels of circular RNAs (circRNAs) and the linear transcripts of their host genes in tissue samples from prostate cancer (PCa) patients. The expression data of all eight circRNAs (A, C, E, G, I, K, M, O) and their corresponding linear transcripts (B, D, F, H, J, L, N, P) are shown in the matched pairs of adjacent normal tissue samples and malignant samples from PCa specimens collected by radical prostatectomy ( $n = 79$ , only 45 for circNEAT1 and linNEAT1). *ALAS1* (5'-aminolevulinatase synthase 1) and *HPRT1* (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1) mRNAs were used as stable expression normalizers of prostatic cancer [81]. Complete violin plots with the



entire expression ranges, the lower and upper quartiles (dashed lines), and the medians (bold lines) are presented. Statistically significant expression differences of the malignant tissue samples compared with the adjacent normal tissue samples are given as the T/N (tumor/normal) index. To facilitate a direct comparison of the expression results of each circRNA and its corresponding linear transcript in the tumor to normal tissue, we used the term T/N index. A positive number indicates a higher expression in tumor tissue (numerator in the index) in relation to normal tissue (denominator in the index) and a negative number shows a higher expression in the normal tissue (denominator in the index) in relation to tumor tissue (numerator in the index).

Moreover, the following characteristics of the expression data were striking: (i) the upregulation of circLPP and circSTIL found in the microarray analysis could not be confirmed, as both circRNAs were shown to be downregulated in the RT-qPCR measurements, similarly to what was shown by the comparison of the paired samples used in the microarray analysis; (ii) all linear transcripts except circSNK1G3 had significantly higher expression than their circRNAs. This can be seen on the x-axes of the corresponding panels and by the different ratios between the two tissue samples and the RNA types, as summarized in Tables S9 and S10. This was particularly remarkable for circNEAT1, which showed a low expression rate, with only 45 of the 79 examined pairs having detectable expression. Although the high number of biological replicates confirmed the increased expression of this circRNA in tumor tissue, circNEAT1 was not included in the further multivariable prognostic BCR analysis. This was also compatible with the less reliable analytical performance data of circNEAT1 measurements in its low expression range, as mentioned above (Table 3), and the number of samples above the upper limit of the standard curve of this circRNA (Table S7).

The expression data of all examined circRNAs and their linear transcripts in the tumor samples were not associated with age, preoperative PSA, prostate volume, digital rectal examination, tumor stage, and surgical margin status (Table S11). However, significant associations between the ISUP grade and all circRNAs except circNEAT1 and circRHOTB3 were found, while only linGUCY1A2 and linLPP showed such associations for the linRNAs.

Close correlations between the expression levels of all circRNAs in both the adjacent normal and malignant tissue samples were observed, except for circNEAT1 and partly for circRHOTB3 (Tables S12 and S13). However, these close correlations were mainly lost if data in matched normal tissue and malignant tissue samples were correlated (Table S14). Furthermore, there were several different correlation coefficients between circRNAs and the linear transcripts in malignant tissue samples in comparison to the matched adjacent normal tissue samples (Table S15).

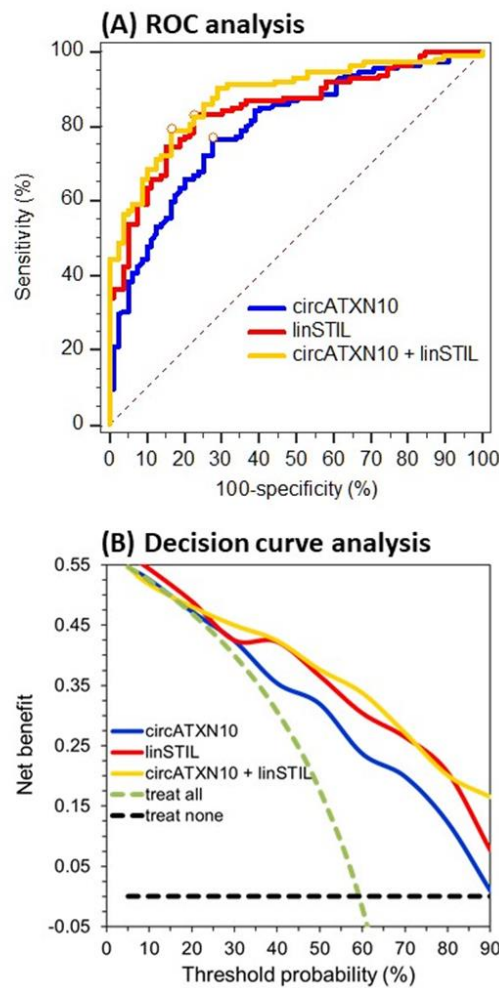
#### 2.4.2. CircRNAs and linRNAs as Biomarkers for Discrimination between Normal and Cancerous Tissue

The differences between the circRNAs and their linear transcripts described here support the idea, postulated in the introduction, that it makes sense to investigate circRNAs as cancer biomarkers in an integrative approach together with their linear transcripts, due to their potential differential influences in normal and cancerous tissue. From this point of view, the expression data of the circRNAs and linear transcripts were used to differentiate between adjacent normal and malignant tissue (Table 5). Data from the performed receiver operating characteristic (ROC) curve analysis revealed that circATXN10 and linSTIL were found to be the best individual markers for this purpose, with areas under the curves (AUCs) of 0.801 and 0.841, respectively. Using a backward elimination approach of binary logistic regression with all RNAs, a combined tool using these two markers resulted (Table 5). It is of particular interest that both RNAs were differentially expressed. CircATXN10 was downregulated in tumor samples, whereas linSTIL was upregulated. When applying the markers combined, the AUC value increased to 0.892. Both the ROC curve and the decision curve of this combination were found to run above the curves of the two individual markers (Figure 5). Thus, at least a “stabilizing” discriminative ability was achieved with the marker combination of circATXN10 + linSTIL.

**Table 5.** Receiver operating characteristic (ROC) curve analyses of circRNAs and their linear transcripts for discrimination between adjacent normal ( $n = 79$ ) and malignant ( $n = 115$ ) tissue samples from prostate cancer specimens. For circNEAT1, only 118 samples could be analyzed.

RNAs	AUC (95% CI)	$p$ -Value Different to AUC = 0.5	Differentiating Ability at the Youden Index <sup>a</sup>		Overall Correct Classification (%)
			Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	
<b>Single variable</b>					
circATXN10	0.801 (0.719–0.851)	< 0.0001	77 (68–84)	72 (61–82)	74.2
linATXN10 ( $p < 0.0001$ ) <sup>b</sup>	0.525 (0.442–0.606)	0.534	45 (36–55)	65 (53–75)	59.3
circCRIM1	0.743 (0.660–0.808)	< 0.0001	74 (66–82)	66 (54–76)	67.0
linCRIM1 ( $p = 0.143$ ) <sup>b</sup>	0.778 (0.697–0.836)	< 0.0001	76 (67–83)	76 (65–85)	71.7
circCSNK1G3	0.780 (0.715–0.836)	< 0.0001	69 (59–77)	77 (66–86)	72.7
linCSNK1G3 ( $p < 0.0001$ ) <sup>b</sup>	0.518 (0.436–0.602)	0.661	49 (40–59)	59 (48–70)	59.3
circGUCY1A2	0.545 (0.459–0.624)	0.285	65 (56–74)	48 (37–60)	58.8
linGUCY1A2 ( $p = 0.208$ ) <sup>b</sup>	0.583 (0.493–0.665)	0.051	70 (60–78)	49 (40–61)	58.3
circLPP	0.773 (0.708–0.830)	< 0.0001	71 (62–79)	75 (64–84)	72.2
linLPP ( $p = 0.321$ ) <sup>b</sup>	0.762 (0.696–0.820)	< 0.0001	70 (61–79)	76 (65–85)	71.6
circNEAT1	0.634 (0.552–0.733)	< 0.013	72 (60–82)	51 (36–67)	62.5
linNEAT1 ( $p = 0.371$ ) <sup>b</sup>	0.690 (0.608–0.760)	< 0.0001	63 (53–72)	72 (61–82)	63.4
circRHOBTB3	0.684 (0.613–0.749)	< 0.0001	73 (64–81)	61 (49–72)	66.0
linRHOBTB3 ( $p = 0.013$ ) <sup>b</sup>	0.520 (0.438–0.605)	0.629	45 (36–55)	67 (56–77)	59.3
circSTIL	0.645 (0.556–0.719)	< 0.003	53 (44–62)	72 (61–82)	62.9
linSTIL ( $p < 0.0001$ ) <sup>b</sup>	0.841 (0.804–0.912)	< 0.0001	78 (70–85)	86 (77–93)	80.4
<b>Optimized combination</b>					
circATXN10 + linSTIL <sup>c</sup>	0.892 (0.834–0.925)	< 0.0001	79 (71–86)	87 (78–94)	81.4

Abbreviations: AUC, area under the receiver operating characteristic curve; CI, confidence interval. <sup>a</sup> The Youden index as a measure of overall diagnostic effectiveness is calculated by (sensitivity + specificity) - 1. <sup>b</sup> Significances between the AUC values of individual circRNAs and their linear counterparts. <sup>c</sup> Calculated by binary logistic regression using all RNAs in a backward elimination approach. Results are based on bias-corrected and accelerated bootstrap calculation with 2000 iterations.



**Figure 5.** Receiver operating characteristic (ROC) curve and decision curve analyses of *circATXN10* and *linSTIL* as individual markers and in combination for discrimination between adjacent normal and malignant tissue samples. The data reflect the results shown in Table 5 for *circATXN10*, *linSTIL*, and their combination.

#### 2.4.3. CircRNAs and Linear Transcripts as Potential Markers for Predicting BCR

BCR, as the selected clinical outcome endpoint, was defined as the time from the radical prostatectomy until the time of the corresponding event or the last follow-up. Detailed data for the patients with and without BCR at the time of follow-up after surgery are shown in Table 1.

According to the Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK) [82], we used continuous data of the normalized relative expression quantities of the RNAs in the subsequently described Cox regression analyses. This procedure of using continuous data, if possible, is strongly recommended to avoid loss of information in detecting associations between cancer markers and time-dependent events [82]. The results of the univariable Cox regression analyses in this first step, which was done to evaluate the potential predictive validity of the total RNA panel,

are shown in Table 6. Those five circRNAs and three linear transcripts with  $p$ -values  $< 0.25$  were selected for subsequent multivariable Cox regression analyses to avoid type II errors. So-called “full models”, including the respective circular and linear RNAs, and “reduced models” after a backward elimination (entry:  $p < 0.05$ , removal:  $p > 0.100$ ) were separately constructed for the circRNAs and linRNAs (Table 6).

**Table 6.** Construction of separate tools for prediction of biochemical recurrence using circRNAs and their linear counterparts.

RNA	Univariable Cox Regression <sup>a</sup>		Multivariable Cox Regression			
	HR (95% CI)	$p$ -Value	Full Model <sup>b</sup>		Reduced Model after Backward Elimination <sup>c</sup>	
			HR (95% CI)	$p$ -Value	HR (95% CI)	$p$ -Value
<b>Circular RNAs</b>						
circATXN10	0.39 (0.10–1.88)	0.239	0.27 (0.08–0.89)	0.032	0.31 (0.13–0.76)	0.011
circCRIM1	0.69 (0.22–2.16)	0.521	-	-	-	-
circCSNK1G3	2.32 (0.51–10.6)	0.240	1.96 (0.50–7.68)	0.336	-	-
circGUCY1A2	1.31 (0.98–1.75)	0.065	1.32 (0.99–1.75)	0.051	1.33 (1.02–1.74)	0.037
circLPP	1.86 (0.84–4.12)	0.125	1.76 (0.78–3.96)	0.169	1.89 (0.91–3.95)	0.092
circRHOBTB3	0.86 (0.38–1.93)	0.705	-	-	-	-
circSTIL	0.53 (0.18–1.53)	0.238	0.57 (0.21–1.62)	0.293	-	-
<b>Linear mRNAs</b>						
linATXN10	1.23 (0.15–10.2)	0.846	-	-	-	-
linCRIM1	0.90 (0.22–3.76)	0.887	-	-	-	-
linCSNK1G3	0.47 (0.09–2.60)	0.399	-	-	-	-
linGUCY1A2	1.52 (0.99–2.32)	0.050	1.47 (1.09–2.00)	0.012	1.47 (1.09–2.00)	0.012
linLPP	1.06 (0.23–4.76)	0.941	-	-	-	-
linNEAT1	1.41 (1.15–1.72)	0.001	1.39 (1.16–1.66)	0.0003	1.39 (1.16–1.66)	0.0003
linRHOBTB3	0.78 (0.20–3.11)	0.727	-	-	-	-
linSTIL	0.59 (0.32–1.08)	0.086	0.54 (0.30–0.96)	0.037	0.54 (0.30–0.96)	0.037

Abbreviations: HR, hazard ratio; CI, confidence interval. <sup>a</sup> As explained in chapter 2.4.1, circNEAT1 was excluded from Cox regression analyses. <sup>b</sup> The full model included all variables of the univariable Cox regression with hazard ratios of  $p$ -values  $< 0.250$ . <sup>c</sup> Reduced model after backward elimination with entry  $p < 0.05$  and removal  $p > 0.100$ . All data of the univariable and final multivariable Cox regression models are calculated by the bias-corrected and accelerated bootstrap method with 2000 resamples.

For the circRNAs, only circATXN10, circGUCY1A2, and circLPP remained in the reduced model, while for the linRNA-based model (linGUCY1A2, linNEAT1, and linSTIL), no further variables were eliminated by the backward approach. To estimate the capacity of these models to predict BCR, the C-statistic values were compared. The C-statistic results, given as the AUC  $\pm$  SE of the prognostic indices calculated in the Cox regression analyses, did not differ between the full and reduced models for the circRNA-based BCR prediction ( $0.676 \pm 0.055$  vs.  $0.649 \pm 0.056$ ,  $p = 0.219$ ; details given in Table S16). The linRNA-based C-statistic value was found to be  $0.722 \pm 0.053$ , but it was also not statistically significant compared with the circRNA-based model ( $p = 0.141$ ; details given in Table S16). However, a Cox regression analysis with eight RNA variables from the circRNA-based and linRNA-based “full models” or the six RNAs of the “reduced models” (Table 6) and a subsequent backward elimination showed that all circRNAs were excluded from the model (Table 7). Only three linRNAs—linGUCY1A2, linNEAT1, and linSTIL—remained as independent variables in the model. This clearly shows that, compared to these linear RNAs, the circRNAs did not contribute to the BCR prediction. Thus, the model with linGUCY1A2, linNEAT1, and linSTIL, termed the “RNA signature” in the following text, was used as an additional tool for BCR prediction, together with clinicopathological factors.

**Table 7.** Construction of a predictive RNA signature for biochemical recurrence based on Cox regression analysis, using a combination of the separate prediction tools for circRNAs and their linear counterparts.

RNA Prediction Tool	Multivariable Cox Regression of the Combined Separate RNA Classifiers			
	Full Model with all Separate Classifiers <sup>a</sup>		Reduced Model after Backward Elimination <sup>b</sup>	
	HR (95% CI)	p-Value	HR (95% CI)	p-Value
circRNA prediction tool				
circATXN10	0.45 (0.18–1.12)	0.086	not included	-
circGUCY1A2	0.95 (0.55–1.64)	0.850	not included	-
circLPP	1.37 (0.66–2.82)	0.399	not included	-
linear RNA prediction tool				
linGUCY1A2	1.77 (0.80–3.89)	0.153	1.47 (1.09–2.00)	0.012
linNEAT1	1.33 (1.11–1.60)	0.002	1.39 (1.16–1.66)	0.0003
linSTIL	0.52 (0.29–0.94)	0.030	0.54 (0.30–0.96)	0.037

Abbreviations: HR, hazard ratio; CI, confidence interval. <sup>a</sup> This model included all six RNA variables indicated in Table 6 as the “Reduced model after backward elimination” of the separate circRNA and linear RNA based prediction tools. <sup>b</sup> Reduced model after backward elimination with entry  $p < 0.05$  and removal  $p > 0.100$ . All data of the univariable and final multivariable Cox regression models are calculated by the bias-corrected and accelerated bootstrap method with 2000 resamples.

To assess the validity of our linear transcript data regarding the BCR prediction, we used The Cancer Genome Atlas Prostate Cancer (TCGA-PRAD) dataset, a publicly available dataset (Table S17). This dataset contains information from 427 patients and includes 89 cases of BCR, defined as a re-increase of PSA  $> 0.2 \mu\text{g/L}$  after prostatectomy, as in our study cohort. Univariable Cox regression analyses of the linear transcripts showed that increased expression of linSTIL was closely associated with BCR, as in our study, whereas statistically significant relationships of the other transcripts with BCR were not observed (Table S17).

#### 2.4.4. BCR Prediction Models Based on Clinicopathological Variables in Combination with the RNA Signature

As briefly outlined in the introduction, different tools for predicting BCR based on the clinicopathological variables have been introduced in clinical practice. It was therefore of interest to (i) compare the predictive potential of the RNA signature elaborated above with the results of such clinical models and (ii) evaluate whether a combination of both approaches could improve the prognostic accuracy of single tools.

For this purpose, based on univariable and multivariable Cox regression analyses of the clinicopathological variables in our study cohort, we constructed full and reduced models to predict the occurrence of BCR (Table 8).

**Table 8.** Construction of a predictive classifier for biochemical recurrence using Cox regression analyses with clinicopathological variables in 115 patients.

Variable <sup>a</sup>	Univariable Cox Regression		Multivariable Cox Regression			
			Full Model <sup>b</sup>		Reduced Model after Backward Elimination <sup>c</sup>	
	HR (95% CI)	p-Value	HR (95% CI)	p-Value	HR (95% CI)	p-Value
Age	0.97 (0.93–1.02)	0.280				
PSA ( $> 10 <$ )	2.24 (1.18–4.18)	0.0130	1.59 (0.83–3.07)	0.162		
DRE	1.24 (0.83–1.95)	0.286				
Margin	2.37(1.24–4.52)	0.009	1.91 (0.98–3.72)	0.056	1.99 (1.03–3.84)	0.041
pN status	2.60 (0.92–7.35)	0.071	0.58 (0.19–1.81)	0.352		
pT stage	2.16 (1.51–3.09)	$<0.0001$	1.55 (1.03–2.33)	0.037	1.58 (1.05–2.40)	0.030
ISUP Group	1.66 (1.31–2.11)	$<0.0001$	1.55 (1.14–2.10)	0.005	1.43 (1.07–1.91)	0.016

<sup>a</sup> Abbreviations and stratifications of the variables as indicated in Table 1; CI, confidence interval; HR, hazard ratio. <sup>b</sup> The full model included all variables of the univariable Cox regression with hazard ratios of  $p < 0.250$ . <sup>c</sup> Reduced model after backward elimination with entry  $p < 0.05$  and removal  $p > 0.100$ . All data of the univariable and final multivariable Cox regression models are calculated by the bias-corrected and accelerated bootstrap method with 2000 resamples.

In addition, the established predictive BCR reference models CAPRAS [9] and NCCN [11] as well as those according to D'Amico et al. [10] and Stephenson et al. [7] were used. In all cases, the C-statistic values of the obtained prognostic indices were calculated using purely clinicopathological-based tools combined with the RNA signature (Table 9). As mentioned above, the C-statistic value of the RNA signature with linGUCY1A2, linNEAT1, and linSTIL was  $0.722 \pm 0.053$  (95% CI: 0.631–0.801), which was only significantly higher than D'Amico et al.'s reference model value of 0.513 (95% CI: 0.418–0.607;  $p = 0.003$ ). There were no statistical differences compared with the other clinicopathological tools listed in Table 9 ( $p$ -values between 0.128 and 0.640). However, the combination of the RNA signature with individual clinicopathological-based prediction tools increased the C-statistics values of all clinicopathological-based tools (Table 9). This was especially statistically significant for the tools presented by D'Amico et al. [10], CAPRAS [9], and NCCN [11]. In addition, decision curve analyses of our elaborated full model and the other four clinicopathological-based reference models were performed in combination with the RNA signature (Figure S4). The improved prediction of BCR by this inclusion of the RNA signature was confirmed, as the corresponding curves generally ran above the individual curves of the clinicopathological-based tools (Figure S4).

**Table 9.** Improved prediction of biochemical recurrence after radical prostatectomy using clinicopathological-based tools in combination with the RNA signature.

Prediction Tool	Clinicopathological-Based Tool	Clinicopathological-Based Tool Combined with RNA Signature	$p$ -Value
	AUC (95% CI)	AUC (95% CI)	
<i>Present study</i>			
Full model	0.810 (0.726–0.877)	0.841 (0.761–0.902)	0.073
Reduced model	0.804 (0.720–0.872)	0.827 (0.746–0.891)	0.104
<i>Reference models</i>			
D'Amico et al. [10]	0.513 (0.418–0.607)	0.718 (0.627–0.798)	0.004
CAPRAS [9]	0.750 (0.660–0.826)	0.799 (0.714–0.868)	0.034
NCCN [11]	0.733 (0.643–0.811)	0.800 (0.715–0.869)	0.035
Stephenson et al. [7]	0.785 (0.699–0.856)	0.821 (0.738–0.886)	0.107

Abbreviations: AUC, area under the receiver operating characteristic curve as C-statistics calculated from the prognostic indices of the Cox regression analyses; CI, confidence interval; CAPRAS, Cancer of the Prostate Risk Assessment Postsurgical Score; NCCN, National Comprehensive Cancer Network; Full model, according to the Cox regression model described in Table 8 with all clinicopathological factors except of age and digital rectal examination; Reduced model, according to the Cox regression model described in Table 8 after backward elimination and finally including only the variables of pT stage, ISUP Group grade, and surgical margin status. Results are based on bias-corrected and accelerated bootstrap calculation with 2000 iterations.

### 3. Discussion

In this retrospective study with three working phases (Figure 1), we identified differentially expressed circRNAs in PCa tissue samples using microarray analysis, performed an analytical validation of eight selected circRNAs and their linear counterparts via RT-qPCR measurements, and successfully elaborated RNA-signatures as discriminative biomarkers to differentiate between normal and cancerous PCa tissue and as predictive BCR biomarkers. This information was combined with clinicopathological variables to improve the prediction of BCR.

For the genome-wide identification of circRNAs in PCa tissue, we used six paired PCa tissue samples in the discovery phase in a microarray approach. Generally, microarray analysis is considered a strong and reliable tool for predicting circRNA profiles in clinically relevant tissue samples [83]. However, compared with high-throughput circRNA sequencing analysis with its discovery potential for new circRNAs, microarray platforms have the drawback of only including a limited number of already validated circRNAs [84]. The microarray analysis identified 43 upregulated and 134 downregulated circRNAs with a higher than absolute 1.5-fold change in malignant tissue samples (Figure 2C). For further evaluation, we chose three upregulated (circLPP, circSTIL, and circNEAT1) and three downregulated (circATXN10, circCRIM1, and circRHOTB3) circRNAs based on their differential expression levels identified in the microarray analysis and in an in silico circRNA-miRNA-gene interaction analysis (Supplementary Information S2 (Supplementary Materials) with Figure S1). In addition, circCSNK1G3 and circGUCY1A2 were included in this panel for control purposes, since they had already been investigated by other working groups at the start of our study [44,45]. Furthermore, in order to correlate our results with the linear products of the circRNA host genes in an integrative approach, we included the linRNA counterparts of the circRNAs in this study.

After successful experimental validation of the circular feature of the selected circRNAs and the establishment of their fit-for-purpose RT-qPCR assays (Section 2.3), a comparison of the microarray and RT-qPCR data of the eight circRNAs showed discrepant results for circSTIL and circLPP (Table 4). For the other examined circRNAs, the results of the RT-qPCR and microarray analyses were found to be congruent. The downregulation of circSTIL and circLPP in the malignant vs. adjacent normal PCa tissue samples was confirmed via RT-qPCR measurements of the 79 paired samples (Figure 4). Inconsistent differential expression of circRNAs in microarray or sequencing vs. in the RT-qPCR analyses has also been observed in previous studies of PCa and other cancers. Shan et al. [85] identified consistent expression between microarray and RT-qPCR analyses in four of five selected circRNAs using 90 PCa and paired non-cancerous tissue samples. Yan et al. [86] reported that three of four selected circRNAs in PCa cells analyzed by RT-qPCR showed consistent high-throughput sequencing results. Qui et al. [87] found an upregulation of circCASP8AP2 in hepatocellular carcinoma compared to adjacent normal tissue by sequencing, but in RT-qPCR analyses, this circRNA was downregulated. The reason for these discrepancies between microarray/sequencing data and RT-qPCR results is not clear. Since the same samples were used for the different analytical techniques, it can be assumed that there can only be analytical or post-analytical reasons for these results [31]. The use of different normalization approaches, dependence on the digestion effect of RNase R on circRNAs and linear mRNAs, and method-dependent effect of RNA integrity on the measurement results might be the reasons for these discrepancies [88–91]. Considering these aspects, the expression evaluation of circRNAs in isolated total RNA samples using RT-qPCR measurements combined with validated cancer-specific reference genes, as done in the present study, might be a practical way to minimize such discrepancies [88]. Further research is needed in this respect, but this was beyond the scope of this study. Furthermore, regarding these discrepancies, the inconsistent results reported for the same circRNAs when examined in different studies should be mentioned. For example, Kong et al. [92] found that *hsa\_circ\_0006404* was upregulated in 53 paired PCa samples. In contrast, Shen et al. [48] showed that the same circRNA was downregulated in 22 low-grade and 22 high-grade PCa tissue samples in comparison with 18 normal prostate tissue samples. In addition to the above-mentioned possible analytical and post-analytical reasons, different clinicopathological characteristics of the investigated study cohorts, but also pre-analytical interferences due to the different “quality” of the tissue samples used in different studies may be responsible for these differences [88].

The comparison of the expression levels of circRNAs and linRNAs in the 79 paired PCa tissue samples revealed interesting relationships (Figure 4). Here, we found that all linRNAs except for linCSNK1G3 had significantly higher expression levels than the circular RNAs. This observation was concordant with results shown in earlier circRNA studies [23,24,93]. Additionally, circSTIL showed significantly lower expression in tumor samples than in normal tissue samples, while linSTIL was

significantly higher expressed in tumor samples. Moreover, the normalized expression of *linNEAT1* was nearly 17,000-fold higher than the expression level of *circNEAT1* (Figure 4 and Table S10), while the ratio between tumor and normal tissue was equal for both RNAs (*circNEAT1*: +1.70 vs. *linNEAT1*: +1.75). A possible explanation for the high *linRNA* expression could be the similarly abundant expression of the *lncRNA NEAT1* (*lncNEAT1*) in PCa, which may be an indicator of the independent expression of *circRNAs* and *linRNAs/lncRNAs* [94,95]. However, because of the limited performance data from the *circNEAT1* RT-qPCR analyses and the incomplete detection of this analyte in all samples, we did not include this *circRNAs* in the multivariable analyses. Nevertheless, more analytically sensitive quantification techniques like the droplet digital polymerase chain reaction should be used to allow this *circRNA* to be included in future studies.

The differential expression of the malignant and adjacent normal tissue samples identified *circATXN10* and *linSTIL* as strong biomarkers in terms of differentiating between tumor and normal tissue. The AUC value for these two markers combined was 0.892 (95% CI: 0.834–0.925). The decision curve analysis also showed a higher discriminative ability when combining *circATXN10* and *linSTIL*, compared with applying them alone (Figure 5). Xia et al. [47] evaluated the diagnostic potential of the two *circRNAs* *circ\_0057558* and *circ\_0062019* in PCa. When applying these two *circRNAs* in combination, an AUC value of 0.861 was achieved. Another working group identified *hsa\_circ\_0001633*, *hsa\_circ\_0001206*, and *hsa\_circ\_0009061* as possible discriminative tissue biomarkers with respective AUCs of 0.809, 0.774, and 0.711 [58]. Although these results are promising, the ability of *circRNAs* to differentiate between malignant and non-malignant tissue in other cancer types is much higher. In a recent study on *circRNAs* in clear cell renal cell carcinoma, we identified *circEGLN3* (*hsa\_circ\_0101692*) as a strong marker for differentiation between normal and cancerous tissue, with an AUC of 0.98 when used alone and an AUC of 0.99 when combined with its linear counterpart [22]. Nevertheless, in the future, *circRNAs* might be used as components of a molecular pattern to improve diagnostic accuracy in the pathological evaluation of cancerous tissue and to provide possible helpful information on the development processes of cancer.

The associations of *circRNAs* and *linRNAs* with each other and with standard clinicopathological variables is of special interest. The following distinctive features were noteworthy: (i) the expressions of all *circRNAs* were found to be strongly correlated in both the adjacent normal and malignant tissue samples, except for *circNEAT1* and partly for *circRHOTB3*, while this correlation feature was mainly lost between paired samples (Tables S12–S14); (ii) different correlation coefficients between *circRNAs* and the linear transcripts were observed in paired malignant and normal tissue samples (Table S15); and (iii) all *circRNAs* except *circNEAT1* and *circRHOTB3* were significantly correlated with the ISUP grade but not with other relevant clinicopathological variables such as preoperative PSA, the tumor stage, and the surgical margin (Table S11). Thus, in comparison with other studies that examined other *circRNAs* [44,51,58–62], few associations with generally relevant clinicopathological PCa variables were identified. This is by no means a primary disadvantage with regard to their potential clinical validity as prognostic/predictive markers. In contrast, this expression of RNAs mostly independent from clinicopathological variables and the other mentioned particular correlations is a key characteristic of orthogonal biomarkers [96]. Biomarkers of this kind are a real prerequisite for gaining information additional to that derived from established variables and for improving, for example, the prediction accuracy of a clinical outcome endpoint [97].

In the introduction, we described the aim of this study as being to evaluate the clinical validity of *circRNAs* and their linear transcripts with regard to BCR after radical prostatectomy. The essential problems in this respect were explained and need not be repeated, but it should be stressed that data on *circRNAs* and BCR are lacking. It was therefore particularly important to follow the REMARK guidelines, which recommend the use of continuous expression data in Cox regression analyses as predictive variables of an endpoint and the rejection of primary dichotomized data applications [82]. This study investigated the ability of the *circRNAs* and linear transcripts to predict BCR occurrence alone and in combination with clinicopathological variables in a step-by-step process. *CircATXN10*, *circGUCY1A*, and *circLPP* remained after a multivariable Cox regression analysis of the examined



circRNAs with backward elimination in a model of BCR prediction (Table 6). On the other hand, in combination with the linear RNAs, these circRNAs were eliminated in the multivariable Cox regression analysis and thus were found to have no role in BCR prediction in comparison to the linRNAs. Only *linGUCY1A2*, *linNEAT1*, and *linSTIL* were identified as relevant BCR predictor variables, and these were subsequently termed the “RNA signature” (Table 7). This result is by no means surprising. By comparing circRNA expression with the expression of linear counterparts, the independent clinical value of circRNAs and linear transcripts has already been reported in other studies [44,98]. Therefore, it makes sense to take this functional aspect into account in an integrative approach by simultaneously determining circRNAs and their linear transcripts. Loss of information could thus be avoided. However, this requires that RT-qPCR determinations, as in our study, are performed on isolated total RNA without RNase R pretreatment and that validated reference genes are used to normalize relative expression quantities. This problem was also recently highlighted when the database MiOncoCirc was introduced [39]. The authors recommended the use of a special capture exome RNA-sequencing protocol without RNase R pretreatment [99] in order to determine the actual relationship between circRNA and linRNA in the tissue [39].

Furthermore, the linRNAs were evaluated as BCR predictors in a univariable Cox regression analysis with the TCGA dataset (Table S17). Especially noteworthy was *linSTIL*, which was found to be significantly associated with the risk of BCR. In contrast, *circCSNK1G3*, which was selected by Chen et al. [44] as an example for demonstration of its functional mechanisms, was not found to be a relevant BCR predictor in our study (Table 6) or in the TCGA dataset (Table S17).

To assess the clinical validity of this final RNA signature, we compared the C-statistic data of the prognostic indices of the RNA signature with those of four established models frequently used in clinical practice and our developed model based on using only clinicopathological variables. The C-statistic data of the RNA signature did not differ from those of established clinical models, except for the model developed by D’Amico et al. [10], which showed statistically significantly lower values. However, most importantly, when the clinical models were combined with the RNA signature, statistically significant improvements in the BCR predictive accuracy or at least corresponding tendencies were evident (Table 9). This improved predictive accuracy was confirmed by decision curve analyses (Figure S4). Decision curve analysis has been postulated as the most informative metric for an incremental predictive benefit [100]. These results support the view that there is considerable potential for improvement of the current prognostic models based only on clinicopathological factors by including molecular RNA markers [17–21]. Recently, the NCCN Prostate Cancer Guideline Panel suggested that tissue-based tests like Decipher, OncoType, Dx Prostate, Prolaris, and ProMark could be considered for initial PCa risk assessment [101].

Of the 16 RNAs examined, a total of six RNAs were represented in the combined models after ROC and multivariable Cox regression analyses (Tables 5 and 6). These were *circATXN10* and *linSTIL* as tissue differentiation markers and BCR predictors (Table 5 and Table 6), and *circGUCY1A2* and its linear counterpart, *circLPP*, and *linNEAT1* for BCR prediction. As explained above, ultimately only *linGUCY1A2*, *linNEAT1*, and *linSTIL* remained in the final model as the RNA signature for BCR prediction. So far, there are few data on the listed RNAs in the context of PCa and other cancers. Expression data that could be used for the differentiation of tissue samples as well as BCR markers are missing. Reference to possible biological functions has only been made in few cases, and the validity as a biomarker has only been considered for *linNEAT1* [95]. Since our intention in this study was primarily to investigate the clinical validity of the selected RNAs as possible biomarkers, we deliberately refrained from undertaking functional investigations. Furthermore, the clinical validity of a marker and thus its applicability in a clinical setting is not primarily linked to its functional significance [102]. The development of an applicable biomarker should focus on demonstrating a benefit in comparison to the methods used to date [79]. To formulate this opinion in exaggerated terms, only proof of the meaningful use of a biomarker for a specific clinical problem should be a justified reason to characterize its possible biological background experimentally. Thus, a brief summary of the current state regarding the biological backgrounds of the relevant RNAs identified herein as potential biomarkers is given to provide directions for future work.

In detail, this is as follows:

CircATXN10 has not yet been discussed in connection with cancer. Our data here represent the first results in this area.

CircGUCY1A2 was found to be of particular importance in PCa pathogenesis in an investigation of various PCa cells based on differential expression and bioinformatics information [45]. Experimental findings and data on human PCa tissue samples, as well as on linGUCY1A2, are not yet available. In this respect, our data represent the first information in this area.

For linSTIL, Wu et al. [63] found increased expression in PCa tissue, similar to the results of our study. In cell experiments, these linSTIL changes were shown to be responsible for stimulating the proliferation of PCa cells and suppressing apoptosis through interactions with various signaling pathways. An investigation on gastric cancer confirmed these effects of upregulated linSTIL [103].

CircLPP has not yet been investigated in PCa or other cancers regarding to its biological functions or its potential as a biomarker. Reduced expression of the host gene has been described in lung cancer, similar to the results of the present PCa study [66]. Cell culture experiments on myeloma cells showed that a loss of *LPP* leads to the upregulation of N-cadherin, subsequently promoting tumor cell invasion and metastasis through epithelial-mesenchymal transition.

LinNEAT1 has been described in some studies as upregulated mRNA with different oncogenic effects on PCa cells. In PCa, it promotes the expression of the oncogene *HMG A2* through the sponging of miR-98-5p, as well as leading to docetaxel resistance by sponging miR-34a-5p and miR-204-5p [65,104]. Furthermore, *NEAT1* promotes the proliferation of PCa cells in connection with the steroid receptor co-activator (*SCRC3*) through the insulin-like growth factor 1 receptor/AKT serine/threonine kinase 1 (*IGF1R/AKT*) signaling pathway [105]. As shown in the present study using BCR as the clinical endpoint, Bai et al. [95] reported increased expression of *NEAT1* mRNA as being an independent prognostic factor for overall patient survival.

Despite our efforts to make this study as comprehensive and bias-free as possible, particularly taking into account the REMARK, MIQE, and STARD guidelines, it had inherent limitations. These include the retrospective nature of this study, the lack of external validation, and the choice of BCR as an endpoint without consideration of alternative clinical endpoints such as metastasis-free survival or cancer-specific survival. On the other hand it should be emphasized that our data calculated with the bootstrapping method as preferable approach for internal validation [106] confirmed the reliability of results obtained with the constructed models in this study.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Patients and Tissue Samples

The Ethics Committee of the Charité-University Medicine Berlin approved the study (EA1/134/12; approval date: 22 June 2012). Informed consent was obtained from all patients. The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki. Corresponding study guidelines (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE), Updated List of Essential Items for Reporting Diagnostic Accuracy Studies (STARD 2015), and Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK)) were taken into account [76,79,82].

Tissue samples from PCa patients undergoing radical prostatectomy were snap-frozen in liquid nitrogen immediately after surgery and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  or were immediately transferred into RNAlater stabilization reagent (Qiagen, Hilden, Germany) and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until RNA isolation as described previously [81,107,108]. Tumor staging and grading (Table 1) was reviewed by two experienced uropathologists (E.K., S.E.) according to the criteria of the International Union against Cancer (UICC TNM, 8th edition) and the World Health Organization/International Society of Urological Pathology (WHO/ISUP) [109,110], respectively.

## 4.2. Analytical Methods

### 4.2.1. Total RNA Samples and Their Characteristics

Total RNA was isolated from tissue pieces of 31 mg (median value, 95% CI: 30–32) collected from the abovementioned preserved tissue specimens using a special punch-biopic technique as reported in our previous publications [108,111,112]. This procedure allows to obtain tumor tissue (>90%) and matched normal tissue completely free of tumor filtrates and without inflammation or atrophy. Prominent inflammatory infiltrates, lack of epithelium due to stromal hyperplasia, and prostatic intraepithelial neoplasia were used as exclusion criteria. Taking into account these criteria, a largely bias-free comparison of the expression data between the adjacent normal and malignant tissue samples can be considered. The miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) with an on-column DNA digestion step, according to the producer's instructions, was used for total RNA isolation [107,108,112]. Spectrophotometric quantification and quality assessment of the total RNA samples were performed using the NanoDrop 1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) and the Bioanalyzer 2100 with the Agilent RNA 6000 Nano Chip Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), as detailed reported in our previous publications [81,107,108]. The RNA samples, isolated with 30  $\mu$ L nuclease-free water, showed the following characteristics: a median absorbance ratio at 260 to 280 nm of 2.12 (95% CI: 2.12 to 2.13), a median absorbance ratio at 260 to 230 nm of 1.99 (95% CI: 1.97 to 2.03), a median RNA integrity number (RIN) value of 7.00 (95% CI: 6.90 to 7.20), and a median RNA concentration of 1096 ng/ $\mu$ L (95% CI: 1001 to 1214). RNA samples were stored at  $-80$  °C. Further details are listed in the checklist of the MIQE guidelines (Table S1).

### 4.2.2. Microarray Detection of circRNAs

Using isolated total RNA samples from six paired adjacent normal and malignant tissue samples of PCa specimens (1 $\times$  pT3a with ISUP 2, 1 $\times$  pT3b with ISUP 2, 2 $\times$  pT3a with ISUP 3, 2 $\times$  pT3b with ISUP 3), microarray analyses were performed as a custom order by ArrayStar Inc. (Rockville, MD, USA), as previously reported [22]. Briefly, RNA samples were digested with RNase R to destroy linear RNAs and enrich circular RNAs. Afterwards, the circRNAs were amplified, transcribed, fluorescently labeled, and hybridized on the ArrayStar Human Circular RNA Array. This array is designed to detect 13,617 circRNAs. The Agilent scanner (G2505C) and softwares (Agilent Feature Extraction software version 11.0.1.1 and Agilent GeneSpring GX) were used for imaging scanning and analysis. Quantile normalization was used to normalize the obtained probe intensities. The R Bioconductor "limma" package was applied to calculate the differential expression between the matched pairs. All data were compiled in the accompanying separate Excel file with all additional information and annotation details (Supplementary Microarray Data File.xlsx (Supplementary Materials)).

### 4.2.3. RT-qPCR Methodology and circRNA Validation Methods

RT-qPCR measurements were performed according to the recommendations in the MIQE guidelines [76]. The corresponding comments are listed in the abovementioned checklist of the MIQE guidelines and applied for all assays (Supplementary Information S3 with Table S1 and the additional Tables S2–S7).

Detailed validation procedures based on the general characteristics of circRNAs regarding their resistance to RNase R digestion, their lack of a poly(A) tail using separate reverse transcription with random hexamer and oligo(dT)<sub>18</sub> primers, and the proof of the backsplice junctions by Sanger sequencing, were described in our previous report on circRNAs in kidney cancer [22] and are briefly summarized in Supplementary Information S4 to explain the data in Figure 3. A melting curve analysis and gel electrophoresis were additionally carried out as confirmatory approaches to verify the analytical specificity of the RT-qPCR products of all circRNAs (Figures S2 and S3).

The Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; Cat.No. K1642) was used for cDNA synthesis of circRNAs and their linear counterparts,

as this kit contains a ready-to-use mixture of random hexamer and oligo(dT)<sub>18</sub> primers (Table S2A). For the validation of circRNAs, we addressed the issue of reliability of reverse transcription using another cDNA synthesis kit (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Life Science Roche, Mannheim, Germany; Cat. No. 04379012001) that allows separate priming with either random hexamer or oligo(dT)<sub>18</sub> primers (Table S2B).

The LightCycler 480 Instrument (Roche Molecular Diagnostics, Mannheim, Germany) with white 96-well plates (Cat.No. 04729692001) and a reaction volume of 10 µL was used for all real-time qPCR runs. The Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific; Cat.No. K0252) was used. Primers were designed using the blasting tool provided by Primer3 [113] and synthesized by TIB MOLBIOL GmbH (Berlin, Germany). The reaction conditions with the list of primers, measurement details, setup of the assays, and performance data for all eight circRNAs and their linear counterparts as well as the reference genes *ALAS1* and *HPRT1* as a combined pair for normalizing expression data in PCa samples [81] are compiled in Table S6 with the protocols A–I. No-template controls and no-reverse transcriptase controls were always included and showed negative results. All cDNA samples were measured at least in duplicate and the resulting mean values of the quantification cycles were used for further calculations.

The software qBase+ version 3.2 (Biogazelle, Zwijnaarde, Belgium; www.qbaseplus.com) was used for Cq data evaluation [114,115]. This program is based on a generalized model of the 2<sup>-ΔΔCq</sup> approach with correction of the amplification efficiency. Cq values were converted into relative quantities (RQs) with respect to equal amounts of total RNA for all samples used for the cDNA synthesis, and they were converted into normalized relative quantities (NRQs) based on the expression of the two cancer-specific reference genes mentioned above, *ALAS1* and *HPRT1*.

#### 4.3. Statistics and Data Analysis

The statistical programs SPSS Version 25 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) with the bootstrap module, GraphPad Prism version 8.4.3 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA), and MedCalc version 19.4 (MedCalc Software bvba, 8400 Ostend, Belgium) with bootstrapping C-statistics were used.  $p < 0.05$  (two-sided) represented statistical significance. The Mann-Whitney *U*-test, Wilcoxon test, *t*-test, and Spearman rank correlation coefficients were used for continuous data and Chi-squared or Fisher's exact tests were used for categorical data. Univariable and multivariable Cox proportional hazard regression analyses were used for survival analysis of the endpoint BCR. C-statistic values based on ROC analyses with AUC calculation of prognostic indices of Cox regression analyses and corresponding decision curve analyses were determined to characterize the discrimination/prediction capacity of the different variables and models [116–119]. Sample size and power calculations were performed using the programs GPower version 3.1.9.4 [120], GraphPad StatMate version 2.0 (GraphPad Software), and MedCalc version 19.4 (MedCalc Software bvba), and the results were used to design the study. The prediction tool CircInteractome [69] was used for the in silico analysis of circRNAs to identify potential miRNA-gene interactions using the miRDB and TargetScan databases [70,71]. TCGA-PRAD RNAseq data were downloaded and analyzed with R (version 3.6) using the "TCGA2stat" library and the "survival" library for univariable Cox regression analyses of the linear counterparts of the eight circRNAs.

## 5. Conclusions

This study investigated the value of circRNAs and their linear counterparts as potential diagnostic and prognostic biomarkers in PCa using a genome-wide, integrative, and exploratory approach. We showed that the combination of circ*ATXN10* and lin*STIL* provides a strong marker pair that can be used to discriminate between normal and malignant PCa tissue samples. Furthermore, we identified lin*GUCY1A2*, lin*NEAT1*, and lin*STIL* as potentially useful prognostic biomarkers to increase the accuracy of BCR prediction in PCa patients in combination with standard risk prediction models based only on clinicopathological variables. These results support the thesis that there is considerable potential to improve the current clinical prognostic models by including molecular RNA markers. In future studies, it will be advantageous to include circRNAs into the

clinico-genomic models in addition to the established RNA classes such as miRNA, mRNA, piwiRNA or lncRNA.

**Supplementary Materials:** The following are available online at [www.mdpi.com/1422-0067/21/21/7812/s1](http://www.mdpi.com/1422-0067/21/21/7812/s1), Supplementary Microarray Data File.xlsx, Supplementary Information S1: Sample size and power calculations, Supplementary Information S2 with Supplementary Figure S1, Supplementary Information S3: RT-qPCR methodology, Supplementary Information S4: CircRNA validation methods, Supplementary Information S5: Associations between circRNAs, linear transcripts and clinicopathological variables, Supplementary Information S6: Cox regressions analyses, C-statistics, and decision curve analyses of BCR prediction tool, Figure S1: Bioinformatic analysis of circRNA–miRNA–gene interaction, Figure S2: Melting curve analysis of circular and linear qPCR products on LightCycler 480, Figure S3: Gel views of analyzed amplicons of (A) circRNAs and (B) linear RNAs, Figure S4: Decision curve analysis of clinicopathological-based BCR prediction tools, Table S1: MIQE checklist according to Bustin et al., Table S2A: Decision curve analysis of clinicopathological-based BCR prediction tools, Table S2B: cDNA synthesis using Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Table S3: Sequences of amplicons of circRNAs with marked backsplice junctions, primer sequences, and their locations in the host genes, Table S4: qPCR target information of the linear RNAs and the reference genes, Table S5: Primer sequences of circRNAs, linear RNAs, and normalizers, Table S6: Protocols for LightCycler 480 qPCR runs, Table S7: Characteristics of the PCR standard curves, Table S8: Expression ratios of circular and linear RNAs in 79 paired tumor tissue to adjacent normal tissue samples, Table S9: Expression of circRNAs and their linear transcripts in paired adjacent normal tissue samples and malignant tissue samples compared, Table S10: Expression ratios of linear to circular RNAs in paired adjacent normal tissue and prostate carcinoma tissue samples, Table S11: Associations of circRNAs and linear transcripts with clinicopathological variables, Table S12: Spearman rank correlation coefficients between all circRNAs in adjacent normal tissue samples, Table S13: Spearman rank correlation coefficients between all circRNAs in malignant tissue samples, Table S14: Spearman rank correlation coefficients between circRNAs in paired adjacent normal tissue samples and malignant tissue samples, Table S15: Spearman rank correlation coefficients between circRNAs and their linear counterparts in paired adjacent normal tissue and tumor samples, Table S16: C-statistics of prognostic indices of the two RNA-based prediction models, Table S17: Univariate Cox regression data of 8 linear RNAs as BCR predictors of TCGA data, References.

**Author Contributions:** Conceptualization, H.R., K.J., A.F. (Annika Fendler) and A.F. (Antonia Franz); data curation, H.R., M.J., S.W. and K.J.; formal analysis, H.R., M.J., S.W., C.S., Z.Z., A.F. (Annika Fendler) and A.F. (Antonia Franz); funding acquisition, H.R., C.S., K.J. and A.F. (Annika Fendler); investigation, H.R., M.J., S.W., S.E., E.K., Z.Z. and A.F. (Antonia Franz); methodology, H.R., M.J., S.W., S.E., E.K., Z.Z. and K.J.; project administration, B.R., M.J., S.W., and K.J.; resources, B.R., C.S. and K.J.; supervision, C.S., K.J., A.F. (Annika Fendler) and A.F. (Antonia Franz); validation, H.R., M.J. and S.W.; visualization, H.R., M.J., S.W., Z.Z., K.J., A.F. (Annika Fendler) and A.F. (Antonia Franz); writing—original draft, H.R., M.J., K.J., A.F. (Annika Fendler) and A.F. (Antonia Franz); writing—review & editing, H.R., M.J., S.W., B.R., C.S., S.E., E.K., Z.Z., K.J., A.F. (Annika Fendler) and A.F. (Antonia Franz). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was partly funded by Foundation for Urologic Research, Berlin, Germany (grant number BFIU 2018/2019-HR).

**Acknowledgments:** The authors would like to thank Dieter Beule und Andranik Ivanov (Berlin Institute of Health, Bioinformatics Core Unit) for interpretation of the microarray data and for helpful discussions. The support of the study through the Foundation for Urologic Research, Berlin, Germany by a research fellowship to cand. med. Hannah Rochow is greatly acknowledged. The authors thank Siegrun Blauhut for her 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.

## Abbreviations

%RSD	percent relative standard deviation
AKT	AKT serine/threonine kinase 1
ALAS1	5'-aminolevulinate synthase 1
ATXN10	ataxin 10

AUC	area under the ROC curve
BCR	biochemical recurrence
CAPRAS	Cancer of the Prostate Risk Assessment Postsurgical Score
cDNA	complementary DNA
CI	confidence interval
circ	circular (used in composition with gene symbols to define examined circRNAs)
circRNA	circular RNA
Cq	quantification cycle
CRIM1	cysteine rich transmembrane BMP regulator 1
CSNK1G3	casein kinase 1 gamma 3
DRE	digital rectal examination
GUCY1A2	guanylate cyclase 1 soluble subunit alpha 2
HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
HR	hazard ratio
IGF1R	insulin like growth factor 1 receptor
IQR	interquartile range
ISUP	International Society of Urologic Pathology
lin	lin (in composition with gene symbols to define examined linRNAs)
linRNA	linear RNA (mRNA)
lnc	long non-coding (used in composition with gene symbols)
LPP	LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma
MIQE	The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NEAT1	nuclear paraspeckle assembly transcript 1
NRQ	normalized relative quantity
PCa	prostate cancer
pN	pathological lymph node status
PSA	prostate-specific antigen
pT	pathological tumor classification
REMARK	Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies
RHOBTB3	rho related BTB domain containing 3
RIN	RNA integrity number
ROC	receiver operating characteristic
RQ	relative quantity
RT-qPCR	reverse-transcription quantitative real-time polymerase chain reaction
SCRC3	steroid receptor co-activator
STARD	Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy Studies
STIL	STIL centriolar assembly protein
TCGA (PRAD)	The Cancer Genome Atlas Prostate Cancer
T/N	expression index of circRNA or linRNA in tumor to adjacent normal tissue
TNM	Tumor, Node, Metastases

## References

1. Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Mathers, C.; Parkin, D.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Bray, F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int. J. Cancer* **2018**, *144*, 1941–1953, doi:10.1002/ijc.31937.
2. Cookson, M.S.; Aus, G.; Burnett, A.L.; Canby-Hagino, E.D.; D'Amico, A.V.; Dmochowski, R.R.; Eton, D.T.; Forman, J.D.; Goldenberg, S.L.; Hernandez, J.; et al. Variation in the Definition of Biochemical Recurrence in Patients Treated for Localized Prostate Cancer: The American Urological Association Prostate Guidelines for Localized Prostate Cancer Update Panel Report and Recommendations for a Standard in the Reporting of Surgical Outcomes. *J. Urol.* **2007**, *177*, 540–545, doi:10.1016/j.juro.2006.10.097.
3. Cornford, P.; Bellmunt, J.; Bolla, M.; Briers, E.; De Santis, M.; Gross, T.; Henry, A.; Joniau, S.; Lam, T.B.; Mason, M.D.; et al. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part II: Treatment of Relapsing, Metastatic, and Castration-Resistant Prostate Cancer. *Eur. Urol.* **2017**, *71*, 630–642, doi:10.1016/j.eururo.2016.08.002.

4. Broeck, T.V.D.; Bergh, R.C.V.D.; Arfi, N.; Gross, T.; Moris, L.; Briers, E.; Cumberbatch, M.; De Santis, M.; Tilki, D.; Fanti, S.; et al. Prognostic Value of Biochemical Recurrence Following Treatment with Curative Intent for Prostate Cancer: A Systematic Review. *Eur. Urol.* **2019**, *75*, 967–987, doi:10.1016/j.eururo.2018.10.011.
5. Pound, C.R.; Partin, A.W.; Eisenberger, M.A.; Chan, D.W.; Pearson, J.D.; Walsh, P.C. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *JAMA* **1999**, *281*, 1591–1597.
6. Zhao, Z.; Weickmann, S.; Jung, M.; Lein, M.; Kilic, E.; Stephan, C.; Erbersdobler, A.; Fendler, A.; Jung, K. A novel predictor tool of biochemical recurrence after radical prostatectomy based on a five-microRNA tissue signature. *Cancers* **2019**, *11*, 1603.
7. Stephenson, A.J.; Scardino, P.T.; Eastham, J.A.; Bianco, F.J., Jr.; Dotan, Z.A.; Diblasio, C.J.; Reuther, A.; Klein, E.A.; Kattan, M.W. Postoperative Nomogram Predicting the 10-Year Probability of Prostate Cancer Recurrence After Radical Prostatectomy. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 7005–7012, doi:10.1200/jco.2005.01.867.
8. Brockman, J.A.; Alane, S.; Vickers, A.J.; Scardino, P.T.; Wood, D.P.; Kibel, A.S.; Lin, D.W.; Bianco, F.J., Jr.; Rabah, D.M.; Klein, E.A.; et al. Nomogram Predicting Prostate Cancer-specific Mortality for Men with Biochemical Recurrence After Radical Prostatectomy. *Eur. Urol.* **2015**, *67*, 1160–1167, doi:10.1016/j.eururo.2014.09.019.
9. Cooperberg, M.R.; Pasta, D.J.; Elkin, E.P.; Litwin, M.S.; Latini, D.M.; Du Chane, J.; Carroll, P.R. The University of California, San Francisco Cancer of the Prostate Risk Assessment Score: A Straightforward and Reliable Preoperative Predictor of Disease Recurrence after Radical Prostatectomy. *J. Urol.* **2005**, *173*, 1938–1942, doi:10.1097/01.ju.0000158155.33890.e7.
10. D’Amico, A.V.; Whittington, R.; Malkowicz, S.B.; Schultz, D.; Blank, K.; Broderick, G.A.; Tomaszewski, J.E.; Renshaw, A.A.; Kaplan, I.; Beard, C.J.; et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA* **1998**, *280*, 969–974.
11. Mohler, J.L. The 2010 NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology on Prostate Cancer. *J. Natl. Compr. Cancer Netw.* **2010**, *8*, 145, doi:10.6004/jnccn.2010.0010.
12. Kang, M.; Jeong, C.W.; Choi, W.S.; Park, Y.H.; Cho, S.Y.; Lee, S.; Lee, S.B.; Ku, J.H.; Hong, S.K.; Byun, S.-S.; et al. Pre- and Post-Operative Nomograms to Predict Recurrence-Free Probability in Korean Men with Clinically Localized Prostate Cancer. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e100053, doi:10.1371/journal.pone.0100053.
13. Shariat, S.F.; Karakiewicz, P.I.; Suardi, N.; Kattan, M.W. Comparison of Nomograms with Other Methods for Predicting Outcomes in Prostate Cancer: A Critical Analysis of the Literature. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 4400–4407, doi:10.1158/1078-0432.ccr-07-4713.
14. Remmers, S.; Verbeek, J.F.M.; Nieboer, D.; Van Der Kwast, T.; Roobol-Bouts, M. Predicting biochemical recurrence and prostate cancer-specific mortality after radical prostatectomy: Comparison of six prediction models in a cohort of patients with screening- and clinically detected prostate cancer. *BJU Int.* **2019**, *124*, 635–642, doi:10.1111/bju.14790.
15. Meurs, P.; Galvin, R.; Fanning, D.M.; Fahey, T. Prognostic value of the CAPRA clinical prediction rule: A systematic review and meta-analysis. *BJU Int.* **2012**, *111*, 427–436, doi:10.1111/j.1464-410x.2012.11400.x.
16. Lorent, M.; Maalmi, H.; Tessier, P.; Supiot, S.; Dantan, E.; Foucher, Y. Meta-analysis of predictive models to assess the clinical validity and utility for patient-centered medical decision making: Application to the CAncer of the Prostate Risk Assessment (CAPRA). *BMC Med. Inform. Decis. Mak.* **2019**, *19*, 1–12, doi:10.1186/s12911-018-0727-2.
17. Spratt, D.E.; Zhang, J.; Santiago-Jiménez, M.; Dess, R.T.; Davis, J.W.; Den, R.B.; Dicker, A.P.; Kane, C.J.; Pollack, A.; Stoyanova, R.; et al. Development and Validation of a Novel Integrated Clinical-Genomic Risk Group Classification for Localized Prostate Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, 581–590, doi:10.1200/jco.2017.74.2940.
18. Ross, A.E.; Johnson, M.H.; Yousefi, K.; Davicioni, E.; Netto, G.J.; Marchionni, L.; Fedor, H.L.; Glavaris, S.; Choerung, V.; Buerki, C.; et al. Tissue-based Genomics Augments Post-prostatectomy Risk Stratification in a Natural History Cohort of Intermediate- and High-Risk Men. *Eur. Urol.* **2016**, *69*, 157–165, doi:10.1016/j.eururo.2015.05.042.
19. Hiser, W.M.; Sangiorgio, V.; Bollito, E.; Esnakula, A.; Feely, M.; Falzarano, S.M. Tissue-based multigene expression tests for pretreatment prostate cancer risk assessment: Current status and future perspectives. *Future Oncol.* **2018**, *14*, 3073–3083, doi:10.2217/fon-2018-0287.

20. Fine, N.; Lapolla, F.W.Z.; Epstein, M.; Loeb, S.; Dani, H. Genomic classifiers for treatment selection in newly diagnosed prostate cancer. *BJU Int.* **2019**, *124*, 578–586, doi:10.1111/bju.14799.
21. Alam, S.; Tortora, J.; Staff, I.; McLaughlin, T.; Wagner, J. Prostate cancer genomics: Comparing results from three molecular assays. *Can. J. Urol.* **2019**, *26*, 9758–9762.
22. Franz, A.; Ralla, B.; Weickmann, S.; Rochow, H.; Stephan, C.; Erbersdobler, A.; Kilic, E.; Fendler, A.; Jung, M.; 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* **2019**, *11*, 1473, doi:10.3390/cancers11101473.
23. 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* **2012**, *19*, 141–157, doi:10.1261/rna.035667.112.
24. 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. *Nat. Cell Biol.* **2013**, *495*, 333–338, doi:10.1038/nature11928.
25. 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, doi:10.1007/s00109-017-1582-9.
26. 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.
27. 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. *Nat. Cell Biol.* **2013**, *495*, 384–388, doi:10.1038/nature11993.
28. Li, Z.; Huang, C.; Bao, C.; Chen, L.; Lin, M.; Wang, X.; Zhong, G.; Yu, B.; Hu, W.; Dai, L.; et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2015**, *22*, 256–264, doi:10.1038/nsmb.2959.
29. Abdelmohsen, K.; Panda, A.C.; Munk, R.; Grammatikakis, I.; Dudekula, D.B.; De, S.; Kim, J.; Noh, J.H.; Kim, K.M.; Martindale, J.L.; et al. Identification of HuR target circular RNAs uncovers suppression of PABPN1 translation by CircPABPN1. *RNA Biol.* **2017**, *14*, 361–369, doi:10.1080/15476286.2017.1279788.
30. Pamudurti, N.R.; Bartok, O.; Jens, M.; Ashwal-Fluss, R.; Stottmeister, C.; Ruhe, L.; Hanan, M.; Wyler, E.; Perez-Hernandez, D.; Ramberger, E.; et al. Translation of CircRNAs. *Mol. Cell* **2017**, *66*, 9–21, doi:10.1016/j.molcel.2017.02.021.
31. 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, doi:10.1515/cclm-2018-0231.
32. Aufiero, S.; Reckman, Y.J.; Pinto, Y.M.; Creemers, E.E. Circular RNAs open a new chapter in cardiovascular biology. *Nat. Rev. Cardiol.* **2019**, *16*, 503–514, doi:10.1038/s41569-019-0185-2.
33. Guria, A.; Sharma, P.; Natesan, S.; Pandi, G. Circular RNAs—The Road Less Traveled. *Front. Mol. Biosci.* **2020**, *6*, 146, doi:10.3389/fmolb.2019.00146.
34. Ng, W.L.; Mohidin, T.B.M.; Shukla, K. Functional role of circular RNAs in cancer development and progression. *RNA Biol.* **2018**, *15*, 1–11, doi:10.1080/15476286.2018.1486659.
35. Yang, Z.; Xie, L.; Han, L.; Qu, X.; Yang, Y.; Zhang, Y.; He, Z.; Wang, Y.; Li, J. Circular RNAs: Regulators of Cancer-Related Signaling Pathways and Potential Diagnostic Biomarkers for Human Cancers. *Theranostics* **2017**, *7*, 3106–3117, doi:10.7150/thno.19016.
36. Bachmayr-Heyda, A.; Reiner, A.T.; Auer, K.; Sukhbaatar, N.; Aust, S.; Bachleitner-Hofmann, T.; Mesteri, I.; Grunt, T.W.; Zeillinger, R.; Pils, D. Correlation of circular RNA abundance with proliferation—Exemplified with colorectal and ovarian cancer, idiopathic lung fibrosis and normal human tissues. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 8057, doi:10.1038/srep08057.
37. Sun, D.; Chen, L.; Lv, H.; Gao, Y.; Liu, X.; Zhang, X. Circ\_0058124 Upregulates MAPK1 Expression to Promote Proliferation, Metastasis and Metabolic Abilities in Thyroid Cancer Through Sponging miR-940a. *Onco Targets Ther.* **2020**, *13*, 1569–1581, doi:10.2147/ott.s237307.
38. Wang, M.; Yu, F.; Li, P. Circular RNAs: Characteristics, Function and Clinical Significance in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers* **2018**, *10*, 258, doi:10.3390/cancers10080258.
39. 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.e13, doi:10.1016/j.cell.2018.12.021.



40. Li, D.; Li, Z.; Yang, Y.; Zeng, X.; Li, Y.; Du, X.; Zhu, X. Circular RNAs as biomarkers and therapeutic targets in environmental chemical exposure-related diseases. *Environ. Res.* **2020**, *180*, 108825.
41. Zhang, H.; Shen, Y.; Li, Z.; Ruan, Y.; Li, T.; Xiao, B.; Sun, W. The biogenesis and biological functions of circular RNAs and their molecular diagnostic values in cancers. *J. Clin. Lab. Anal.* **2019**, *34*, e23049, doi:10.1002/jcla.23049.
42. Chen, X.; Yang, T.; Wang, W.; Xi, W.; Zhang, T.; Li, Q.; Yang, A.; Wang, T. Circular RNAs in immune responses and immune diseases. *Theranostics* **2019**, *9*, 588–607, doi:10.7150/thno.29678.
43. Liu, J.; Li, D.; Luo, H.; Zhu, X. Circular RNAs: The star molecules in cancer. *Mol. Asp. Med.* **2019**, *70*, 141–152, doi:10.1016/j.mam.2019.10.006.
44. 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.e22, doi:10.1016/j.cell.2019.01.025.
45. Zhang, C.; Xiong, J.; Yang, Q.; Wang, Y.; Shi, H.; Tian, Q.; Huang, H.; Kong, D.; Lv, J.; Liu, D.; et al. Profiling and bioinformatics analyses of differential circular RNA expression in prostate cancer cells. *Futur. Sci. OA* **2018**, *4*, FSOA340, doi:10.4155/fsoa-2018-0046.
46. Ge, S.; Sun, C.; Hu, Q.; Guo, Y.; Xia, G.; Mi, Y.; Zhu, L. Differential expression profiles of circRNAs in human prostate cancer based on chip and bioinformatic analysis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2020**, *13*, 1045–1052.
47. Xia, Q.; Ding, T.; Zhang, G.; Li, Z.; Zeng, L.; Zhu, Y.; Guo, J.; Hou, J.; Zhu, T.; Zheng, J.; et al. Circular RNA Expression Profiling Identifies Prostate Cancer-Specific circRNAs in Prostate Cancer. *Cell. Physiol. Biochem.* **2018**, *50*, 1903–1915, doi:10.1159/000494870.
48. Shen, Z.; Zhou, L.; Zhang, C.; Xu, J. Reduction of circular RNA Foxo3 promotes prostate cancer progression and chemoresistance to docetaxel. *Cancer Lett.* **2020**, *468*, 88–101, doi:10.1016/j.canlet.2019.10.006.
49. Gao, Y.; Liu, J.; Huan, J.; Che, F. Downregulation of circular RNA hsa\_circ\_0000735 boosts prostate cancer sensitivity to docetaxel via sponging miR-7. *Cancer Cell Int.* **2020**, *20*, 1–13, doi:10.1186/s12935-020-01421-6.
50. Liu, F.; Fan, Y.; Ou, L.; Li, T.; Fan, J.; Duan, L.; Yang, J.; Luo, C.; Wu, X. CircHIPK3 facilitates the G2/M transition in prostate cancer cells by sponging miR-338-3p. *Oncotargets Ther.* **2020**, *13*, 4545–4558.
51. Weng, X.-D.; Yan, T.; Liu, C.-L. Circular RNA\_LARP4 inhibits cell migration and invasion of prostate cancer by targeting FOXO3A. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2020**, *24*, 5303–5309.
52. Dong, C.; Fan, B.; Ren, Z.; Liu, B.; Wang, Y. CircSMARCA5 Facilitates the Progression of Prostate Cancer Through miR-432/PDCD10 Axis. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2020**, doi:10.1089/cbr.2019.3490.
53. Dai, Y.; Li, N.; Chen, X.; Tan, X.; Gu, J.; Chen, M.; Zhang, X. Circular RNA Myosin Light Chain Kinase (MYLK) Promotes Prostate Cancer Progression through Modulating Mir-29a Expression. *Med. Sci. Monit.* **2018**, *24*, 3462–3471, doi:10.12659/MSM.908009.
54. Kong, Z.; Wan, X.; Zhang, Y.; Zhang, P.; Zhang, Y.; Zhang, X.; Qi, X.; Wu, H.; Huang, J.; Li, Y. Androgen-responsive circular RNA circSMARCA5 is up-regulated and promotes cell proliferation in prostate cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *493*, 1217–1223, doi:10.1016/j.bbrc.2017.07.162.
55. Luo, J.; Li, Y.; Zheng, W.; Xie, N.; Shi, Y.; Long, Z.; Xie, L.; Fazli, L.; Zhang, D.; Gleave, M.; et al. Characterization of a Prostate- and Prostate Cancer-Specific Circular RNA Encoded by the Androgen Receptor Gene. *Mol. Ther.-Nucleic Acids* **2019**, *18*, 916–926, doi:10.1016/j.omtn.2019.10.015.
56. Cao, S.; Ma, T.; Ungerleider, N.; Roberts, C.; Kobelski, M.; Jin, L.; Concha, M.; Wang, X.; Baddoo, M.; Nguyen, H.M.; et al. Circular RNAs add diversity to androgen receptor isoform repertoire in castration-resistant prostate cancer. *Oncogene* **2019**, *38*, 7060–7072, doi:10.1038/s41388-019-0947-7.
57. Greene, J.; Baird, A.-M.; Casey, O.; Brady, L.; Blackshields, G.; Lim, M.; O'Brien, O.; Gray, S.G.; McDermott, R.; Finn, S.P. Circular RNAs are differentially expressed in prostate cancer and are potentially associated with resistance to enzalutamide. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 10739, doi:10.1038/s41598-019-47189-2.
58. Song, Z.; Zhuo, Z.; Ma, Z.; Hou, C.; Chen, G.; Xu, G. Hsa\_Circ\_0001206 is downregulated and inhibits cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2019**, *47*, 2449–2464, doi:10.1080/21691401.2019.1626866.
59. Umemori, M.; Kurata, M.; Yamamoto, A.; Yamamoto, K.; Ishibashi, S.; Ikeda, M.; Tashiro, K.; Kimura, T.; Sato, S.; Takahashi, H.; et al. The expression of MYC is strongly dependent on the circular PVT1 expression in pure Gleason pattern 4 of prostatic cancer. *Med. Mol. Morphol.* **2020**, *53*, 156–167, doi:10.1007/s00795-020-00243-9.

60. Wang, X.; Wang, R.; Wu, Z.; Bai, P. Circular RNA ITCH suppressed prostate cancer progression by increasing HOXB13 expression via spongy miR-17-5p. *Cancer Cell Int.* **2019**, *19*, 1–11, doi:10.1186/s12935-019-0994-8.
61. Huang, E.; Chen, X.; Yuan, Y. Downregulated circular RNA itchy E3 ubiquitin protein ligase correlates with advanced pathologic T stage, high lymph node metastasis risk and poor survivals in prostate cancer patients. *Cancer Biomark.* **2019**, *26*, 41–50, doi:10.3233/cbm-182111.
62. Huang, C.; Deng, H.; Wang, Y.; Jiang, H.; Xu, R.; Zhu, X.; Huang, Z.; Zhao, X. Circular RNA circABCC4 as the ceRNA of miR-1182 facilitates prostate cancer progression by promoting FOXP4 expression. *J. Cell. Mol. Med.* **2019**, *23*, 6112–6119, doi:10.1111/jcmm.14477.
63. Wu, X.; Xiao, Y.; Yan, W.; Ji, Z.; Zheng, G. The human oncogene SCL/TAL1 interrupting locus (STIL) promotes tumor growth through MAPK/ERK, PI3K/Akt and AMPK pathways in prostate cancer. *Gene* **2019**, *686*, 220–227, doi:10.1016/j.gene.2018.11.048.
64. Hudson, B.D.; Hum, N.R.; Thomas, C.B.; Kohlgruber, A.; Sebastian, A.; Collette, N.M.; Coleman, M.; Christiansen, B.A.; Loots, G.G. SOST Inhibits Prostate Cancer Invasion. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0142058, doi:10.1371/journal.pone.0142058.
65. Guo, Z.; He, C.; Yang, F.; Qin, L.; Lu, X.; Wu, J. Long non-coding RNA-NEAT1, a sponge for miR-98-5p, promotes expression of oncogene HMGA2 in prostate cancer. *Biosci. Rep.* **2019**, *39*, BSR20190635, doi:10.1042/bsr20190635.
66. Kuriyama, S.; Yoshida, M.; Yano, S.; Aiba, N.; Kohno, T.; Minamiya, Y.; Goto, A.; Tanaka, M. LPP inhibits collective cell migration during lung cancer dissemination. *Oncogene* **2015**, *35*, 952–964, doi:10.1038/onc.2015.155.
67. 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 $\alpha$  through facilitating hydroxylation and suppresses the Warburg effect. *Cell Res.* **2015**, *25*, 1025–1042, doi:10.1038/cr.2015.90.
68. Wang, L.; Liang, Y.; Mao, Q.; Xia, W.; Chen, B.; Shen, H.; Xu, L.; Jiang, F.; Dong, G. Circular RNA circCRIM1 inhibits invasion and metastasis in lung adenocarcinoma through the microRNA (miR)-182/miR-93-leukemia inhibitory factor receptor pathway. *Cancer Sci.* **2019**, *110*, 2960–2972.
69. 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.* **2015**, *13*, 34–42, doi:10.1080/15476286.2015.1128065.
70. Wong, N.; Wang, X. miRDB: An online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *43*, D146–D152, doi:10.1093/nar/gku1104.
71. Agarwal, V.; Bell, G.W.; Nam, J.-W.; Bartel, D.P. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife* **2015**, *4*, e05005, doi:10.7554/elife.05005.
72. Bender, R.; Lange, S. Adjusting for multiple testing—When and how? *J. Clin. Epidemiol.* **2001**, *54*, 343–349, doi:10.1016/s0895-4356(00)00314-0.
73. Goeman, J.J.; Solari, A. Multiple hypothesis testing in genomics. *Stat. Med.* **2014**, *33*, 1946–1978, doi:10.1002/sim.6082.
74. Rubin, M. Do p Values Lose Their Meaning in Exploratory Analyses? It Depends How You Define the Familywise Error Rate. *Rev. Gen. Psychol.* **2017**, *21*, 269–275, doi:10.1037/gpr0000123.
75. Glažar, P.; Papavasileiou, P.; Rajewsky, N. circBase: A database for circular RNAs. *RNA* **2014**, *20*, 1666–1670, doi:10.1261/rna.043687.113.
76. Bustin, S.A.; Benes, V.; Garson, J.; Hellemans, J.; Huggett, J.F.; Kubista, M.; Mueller, R.; Nolan, T.; Pfaffl, M.W.; Shipley, G.L.; et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* **2009**, *55*, 611–622, doi:10.1373/clinchem.2008.112797.
77. Jeck, W.R.; Sharpless, N.E. Detecting and characterizing circular RNAs. *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 453–461, doi:10.1038/nbt.2890.
78. Szabo, L.; Salzman, J. Detecting circular RNAs: Bioinformatic and experimental challenges. *Nat. Rev. Genet.* **2016**, *17*, 679–692, doi:10.1038/nrg.2016.114.
79. 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. *Clin. Chem.* **2015**, *61*, 1446–1452.

80. Lee, J.W.; Devanarayan, V.; Barrett, Y.C.; Weiner, R.; Allinson, J.; Fountain, S.; Keller, S.; Weinryb, I.; Green, M.; Duan, L.; et al. Fit-for-Purpose Method Development and Validation for Successful Biomarker Measurement. *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 312–328, doi:10.1007/s11095-005-9045-3.
81. Ohl, F.; Jung, M.; Xu, C.; Stephan, C.; Rabien, A.; Burkhardt, M.; Nitsche, A.; Kristiansen, G.; Loening, S.A.; Radonic, A.; et al. Gene expression studies in prostate cancer tissue: Which reference gene should be selected for normalization? *J. Mol. Med.* **2005**, *83*, 1014–1024, doi:10.1007/s00109-005-0703-z.
82. Sauerbrei, W.; Taube, S.E.; McShane, L.M.; Cavenagh, M.M.; Altman, D.G. Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK): An Abridged Explanation and Elaboration. *J. Natl. Cancer Inst.* **2018**, *110*, 803–811, doi:10.1093/jnci/djy088.
83. 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**, *20*, 1420–1433, doi:10.1093/bib/bby006.
84. Pandey, P.R.; Munk, R.; Kundu, G.; De, S.; Abdelmohsen, K.; Gorospe, M. Methods for analysis of circular RNAs. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2019**, *11*, e1566, doi:10.1002/wrna.1566.
85. Shan, G.; Shao, B.; Liu, Q.; Zeng, Y.; Fu, C.; Chen, A.; Chen, Q. circFMN2 Sponges miR-1238 to Promote the Expression of LIM-Homeobox Gene 2 in Prostate Cancer Cells. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2020**, *21*, 133–146, doi:10.1016/j.omtn.2020.05.008.
86. Yan, Z.; Xiao, Y.; Chen, Y.; Luo, G. Screening and identification of epithelial-to-mesenchymal transition-related circRNA and miRNA in prostate cancer. *Pathol. Res. Pr.* **2019**, *216*, 152784, doi:10.1016/j.prp.2019.152784.
87. Qiu, L.; Huang, Y.; Li, Z.; Dong, X.; Chen, G.; Xu, H.; Zeng, Y.; Cai, Z.; Liu, X.; Liu, J. Circular RNA profiling identifies circ ADAMTS 13 as a miR-484 sponge which suppresses cell proliferation in hepatocellular carcinoma. *Mol. Oncol.* **2019**, *13*, 441–455, doi:10.1002/1878-0261.12424.
88. Rochow, H.; Franz, A.; Jung, M.; Weickmann, S.; Ralla, B.; Kilic, E.; Stephan, C.; Fendler, A.; Jung, K. Instability of circular RNAs in clinical tissue samples impairs their reliable expression analysis using RT-qPCR: From the myth of their advantage as biomarkers to reality. *Theranostics* **2020**, *10*, 9268–9279, doi:10.7150/thno.46341.
89. Westholm, J.O.; Miura, P.; Olson, S.; Shenker, S.; Joseph, B.; Sanfilippo, P.; Celniker, S.E.; Graveley, B.R.; Lai, E.C. Genome-wide Analysis of Drosophila Circular RNAs Reveals Their Structural and Sequence Properties and Age-Dependent Neural Accumulation. *Cell Rep.* **2014**, *9*, 1966–1980, doi:10.1016/j.celrep.2014.10.062.
90. Zhong, S.; Zhou, S.; Yang, S.; Yu, X.; Xu, H.; Wang, J.; Zhang, Q.; Lv, M.; Feng, J. Identification of internal control genes for circular RNAs. *Biotechnol. Lett.* **2019**, *41*, 1111–1119, doi:10.1007/s10529-019-02723-0.
91. Lu, T.; Cui, L.; Zhou, Y.; Zhu, C.; Fan, D.; Gong, H.; Zhao, Q.; Zhou, C.; Zhao, Y.; Lu, D.; et al. Transcriptome-wide investigation of circular RNAs in rice. *RNA* **2015**, *21*, 2076–2087, doi:10.1261/rna.052282.115.
92. Kong, Z.; Wan, X.; Lu, Y.; Zhang, Y.; Huang, Y.; Xu, Y.; Liu, Y.; Zhao, P.; Xiang, X.; Li, L.; et al. Circular RNA circFOXO3 promotes prostate cancer progression through sponging miR-29a-3p. *J. Cell. Mol. Med.* **2020**, *24*, 799–813, doi:10.1111/jcmm.14791.
93. Gao, Y.; Wang, J.; Zheng, Y.; Zhang, J.; Chen, S.; Zhao, F. Comprehensive identification of internal structure and alternative splicing events in circular RNAs. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12060, doi:10.1038/ncomms12060.
94. Chakravarty, D.; Sboner, A.; Nair, S.S.; Giannopoulou, E.; Li, R.; Hennig, S.; Mosquera, J.M.; Pauwels, J.; Park, K.; Kossai, M.; et al. The oestrogen receptor alpha-regulated lncRNA NEAT1 is a critical modulator of prostate cancer. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5383, doi:10.1038/ncomms6383.
95. Bai, J.; Huang, G. Role of long non-coding RNA NEAT1 in the prognosis of prostate cancer patients. *Medicine* **2020**, *99*, e20204, doi:10.1097/md.00000000000020204.
96. Gerszten, R.E.; Wang, T.J. The search for new cardiovascular biomarkers. *Nat. Cell Biol.* **2008**, *451*, 949–952, doi:10.1038/nature06802.
97. 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, doi:10.3390/cancers10090321.
98. 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, doi:10.1093/cvr/cvw250.

99. 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, doi:10.1101/gr.189621.115.
100. Steyerberg, E.W.; Pencina, M.J.; Lingsma, H.F.; Kattan, M.W.; Vickers, A.J.; Van Calster, B. Assessing the incremental value of diagnostic and prognostic markers: A review and illustration. *Eur. J. Clin. Investig.* **2011**, *42*, 216–228, doi:10.1111/j.1365-2362.2011.02562.x.
101. Mohler, J.L.; Antonarakis, E.S.; Armstrong, A.J.; D'Amico, A.V.; Davis, B.J.; Dorff, T.; Eastham, J.A.; Enke, C.A.; Farrington, T.A.; Higano, C.S.; et al. Prostate Cancer, Version 2.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J. Natl. Compr. Cancer Netw.* **2019**, *17*, 479–505, doi:10.6004/jnccn.2019.0023.
102. Burke, H.B. Predicting Clinical Outcomes Using Molecular Biomarkers. *Biomark. Cancer* **2016**, *8*, BIC.S33380–99, doi:10.4137/bic.s33380.
103. Wang, J.; Zhang, Y.; Dou, Z.; Jiang, H.; Wang, Y.; Gao, X.; Xin, X. Knockdown of STIL suppresses the progression of gastric cancer by down-regulating the IGF-1/PI3K/AKT pathway. *J. Cell. Mol. Med.* **2019**, *23*, 5566–5575.
104. Jiang, X.; Guo, S.; Zhang, Y.; Zhao, Y.; Li, X.; Jia, Y.; Xu, Y.; Ma, B. LncRNA NEAT1 promotes docetaxel resistance in prostate cancer by regulating ACSL4 via sponging miR-34a-5p and miR-204-5p. *Cell. Signal.* **2020**, *65*, 109422, doi:10.1016/j.cellsig.2019.109422.
105. Xiong, W.; Huang, C.; Deng, H.; Jian, C.; Zen, C.; Ye, K.; Zhong, Z.; Zhao, X.; Zhu, L. Oncogenic non-coding RNA NEAT1 promotes the prostate cancer cell growth through the SRC3/IGF1R/AKT pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2018**, *94*, 125–132.
106. Steyerberg, E.W.; Harrell, F.E.; Borsboom, G.J.; Eijkemans, M.; Vergouwe, Y.; Habbema, J.F. Internal validation of predictive models. *J. Clin. Epidemiol.* **2001**, *54*, 774–781, doi:10.1016/s0895-4356(01)00341-9.
107. Jung, M.; Mollenkopf, H.J.; Grimm, C.H.; 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, doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00705.x.
108. Schaefer, A.; Jung, M.; Mollenkopf, H.-J.; Wagner, I.; Stephan, C.; Jentzmik, F.; Miller, K.; Lein, M.; Kristiansen, G.; Jung, K. Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *Int. J. Cancer* **2009**, *126*, 1166–1176, doi:10.1002/ijc.24827.
109. O'Sullivan, B.; Brierley, J.; Byrd, D.; Bosman, F.; Kehoe, S.; Kossary, C.; Piñeros, M.; Van Eycken, E.; Weir, H.K.; Gospodarowicz, M. The TNM classification of malignant tumours—towards common understanding and reasonable expectations. *Lancet Oncol.* **2017**, *18*, 849–851, doi:10.1016/s1470-2045(17)30438-2.
110. Humphrey, P.A.; Amin, M.B.; Berney, D.M.; Billis, A.; Cao, D.; Cheng, L.; Delahunt, B.; Egevad, L.; Epstein, J.I.; Fine, S.W.; et al. Acinar Adenocarcinoma. In *WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*, 4th ed.; Moch, H., Humphrey, P.A., Ulbright, T.M., Reuter, V.E., Eds.; International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 2016; pp. 152–154.
111. Jentzmik, F.; Stephan, C.; Lein, M.; Miller, K.; Kamlage, B.; Bethan, B.; Kristiansen, G.; Jung, K. Sarcosine in Prostate Cancer Tissue is not a Differential Metabolite for Prostate Cancer Aggressiveness and Biochemical Progression. *J. Urol.* **2011**, *185*, 706–711, doi:10.1016/j.juro.2010.09.077.
112. Jung, K.; Reszka, R.; Kamlage, B.; Bethan, B.; Stephan, C.; Lein, M.; Kristiansen, G. Tissue metabolite profiling identifies differentiating and prognostic biomarkers for prostate carcinoma. *Int. J. Cancer* **2013**, *133*, 2914–2924, doi:10.1002/ijc.28303.
113. 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, doi:10.1093/nar/gks596.
114. D'Haene, B.; Mestdagh, P.; Hellemans, J.; Vandesompele, J. miRNA Expression Profiling: From Reference Genes to Global Mean Normalization. In *Next-Generation MicroRNA Expression Profiling Technology*; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2012; pp. 261–272, doi:10.1007/978-1-61779-427-8\_18.
115. Hellemans, J.; Mortier, G.; De Paepe, A.; Speleman, F.; Vandesompele, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* **2007**, *8*, R19, doi:10.1186/gb-2007-8-2-r19.
116. Vickers, A.J.; Elkin, E.B. Decision Curve Analysis: A Novel Method for Evaluating Prediction Models. *Med. Decis. Mak.* **2006**, *26*, 565–574, doi:10.1177/0272989X06295361.
117. Stephan, C.; Jung, K.; Semjonow, A.; Schulze-Forster, K.; Cammann, H.; Hu, X.; Meyer, H.-A.; Bögemann, 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, doi:10.1373/clinchem.2012.195560.
118. Pencina, M.J.; D’Agostino, R.B. Overall C as a measure of discrimination in survival analysis: Model specific population value and confidence interval estimation. *Stat. Med.* **2004**, *23*, 2109–2123, doi:10.1002/sim.1802.
119. Harrell, F.E., Jr.; Lee, K.L.; Mark, D.B. Multivariable prognostic models: Issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors. *Stat. Med.* **1996**, *15*, 361–387.
120. 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, doi:10.3758/bf03193146.

**Publisher’s Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 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/>).

### **13. Curriculum Vitae**

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

## 14. Publikationsliste

1. **Rochow H**, Jung M, Weickmann S, Ralla B, Stephan C, Elezkurtaj S, Kilic E, Zhao Z, Jung K, Fendler A, Franz A. Circular RNAs and their linear transcripts as diagnostic and prognostic tissue biomarkers in prostate cancer after prostatectomy in combination with clinicopathological factors. *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 22;21(21):E7812.
2. **Rochow H**, Franz A, Jung M, Weickmann S, Ralla B, Kilic E, Stephan C, Fendler A, Jung K. Instability of circular RNAs in clinical tissue samples impairs their reliable expression analysis using RT-qPCR: from the myth of their advantage as biomarkers to reality. *Theranostics.* 2020 Jul 23;10(20):9268-9279.
3. 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 Sep 30;11(10):1473.
4. Stephan C, Jung K, Lein M, **Rochow H**, Friedersdorff F, Maxeiner A. PHI density prospectively improves prostate cancer detection. *World J Urol*, 2020 accepted.

## 15. Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Stefan Loening, Prof. Dr. Dietmar Schnorr sowie allen Mitgliedern der Stiftung Urologische Forschung. Das Promotionsstipendium der Stiftung Urologische Forschung ermöglichte es mir während eines Freisemesters an meinem Forschungsprojekt zu arbeiten und hatte somit großen Einfluss auf den Entstehungsprozess der vorliegenden Dissertation.

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Klaus Jung für die hervorragende Betreuung und außerordentliche Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit. Sein Engagement und seine Begeisterung für die Wissenschaft haben mich bei der Durchführung dieser Arbeit motiviert und werden mir auch für zukünftige Forschungsprojekte vorbildhaft in Erinnerung bleiben.

Ich bedanke mich weiterhin bei allen Mitarbeiterinnen der urologischen Forschungsabteilung für die gute Zusammenarbeit in der Arbeitsgruppe. Hierbei gilt mein besonderer Dank Frau Sabine Weickmann, die mein Projekt hilfsbereit und geduldig begleitete und mit immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Frau Dr. Monika Jung danke ich für ihren wertvollen wissenschaftlichen Input und ihre tatkräftige Hilfe bei der Umsetzung und Fertigstellung des Projekts. Frau Dr. Antonia Franz danke ich für die Hilfe bei der Planung dieser Arbeit und für die geduldigen Erklärungen im Verlauf.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Carsten Stephan und Herrn Dr. Bernhard Ralla aus der Klinik für Urologie für die Unterstützung bei der Zusammenstellung der klinischen Daten und die gute Betreuung.

Schließlich gilt mein besonderer Dank meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere meinen Eltern Sylvia und Claudius. Eure Ermutigungen und euer Zuspruch haben mich durchweg begleitet und mir Tag für Tag geholfen.