

**Zirkuläre RNAs als diagnostische und prognostische
Biomarker für Patienten mit klarzelligem
Nierenzellkarzinom**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Lisa Johanna Frey

aus Wiesbaden

2022

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Jörg Ellinger
2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Muders (Institut für Pathologie)

Tag der Mündlichen Prüfung: 19.08.2022

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

Für meine Oma Elisabeth

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	6
1.	Deutsche Zusammenfassung	8
1.1	Einleitung	8
1.2	Material und Methoden	10
1.3	Ergebnisse	13
1.4	Diskussion	15
1.5	Zusammenfassung	18
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	18
2.	Veröffentlichung	22
	Abstract	22
	Introduction	22
	Materials and Methods	23
	Results	25
	Discussion	29
	References	32
	Supplementary Information	34
3.	Danksagung	38

Abkürzungsverzeichnis

AUC	Area under the curve/ Fläche unter der Kurve
ccRCC	clear cell renal cell carcinoma/ klarzelliges Nierenzellkarzinom
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
circRNA	circular ribonucleic acid/ zirkuläre Ribonukleinsäure
COL5A1	collagen type V alpha 1 chain
CREB1	cAMP response element-binding protein 1
DNA	deoxyribonucleic acid/ Desoxyribonukleinsäure
DNMT3A	DNA-Methyltransferase 3A
EDEM2	ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like 2
EGLN3	Egl Nine Homologue 3
EHD2	EH-domain containing 2
EIF4A3	Eukaryotic initiation factor 4A3
gDNA	genomic deoxyribonucleic acid/ genomische Desoxyribonukleinsäure
IRF7	Interferon regulatory factor 7
miRNA	micro ribonucleic acid
MIQE	The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments/ Mindestinformationen für die Veröffentlichung quantitativer Echtzeit-PCR-Experimente
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger ribonucleic acid
mTOR	mechanistic target of Rapamycin
NETO2	Neuropilin and tolloid-like protein 2

NTC	no template control/ Nicht-Template-Kontrolle (Wasser)
PCR	polymerase chain reaction/ Polymerase-Kettenreaktion
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
PD-1	programmed cell death protein 1
RNA	ribonucleic acid/ Ribonukleinsäure
ROC	receiver operating characteristic/ Operationscharakteristik eines Beobachters
RT	Reverse Transkriptase
SCARB1	Scavenger Receptor Class B Member 1
SDC3	Syndecan 3
SOD2	Superoxide dismutase 2
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TNM	Tumor, Nodus (Lymphknoten), Metastasen
VEGF	vascular endothelial growth factor

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Nierentumore gehören zu den häufigsten Krebserkrankungen in Deutschland. Die Gesellschaft für epidemiologische Krebsregister und das Zentrum für Krebsregisterdaten schätzen die Anzahl der Krebsneuerkrankungen im Jahr 2016 bei Männern auf 9280 und bei Frauen auf 5360 (GEKID - Homepage, 2021-07-04T08:42:53.000Z). Der mit Abstand häufigste histologische Subtyp ist das klarzellige Nierenzellkarzinom (ccRCC). Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt ca. 75 %, wobei der Diagnosezeitpunkt für die Prognose und damit den weiteren Krankheitsverlauf entscheidend ist. Bei Patienten mit operablem Tumor wird eine partielle oder radikale Nephrektomie als kurative Therapiestrategie durchgeführt (Hsieh et al., 2017). Wird die Diagnose erst im fortgeschrittenen Stadium gestellt, kann eine zielgerichtete Therapie mit PD-1 (programmed cell death protein 1) bzw. VEGF (vascular endothelial growth factor) -Antikörpern oder mTOR (mechanistic target of Rapamycin)- und Tyrosinkinase-Inhibitoren begonnen werden. Eine Heilung im metastasierten Stadium ist nicht möglich (Escudier et al., 2016; Hofmann et al., 2020). Ein besseres Verständnis des ccRCC auf molekularer Ebene könnte bei der Entwicklung neuer Therapiestrategien helfen. Darüber hinaus bestünde durch molekulare Biomarker die Möglichkeit, die individuelle Prognose aufzuzeigen, einen Tumorprogress frühzeitig zu erkennen und eine individuell abgestimmte Therapie einzuleiten.

In den 1970er Jahren wurde die Ribonukleinsäure(RNA)-Klasse der zirkulären RNA (circRNA) entdeckt. Zunächst wurde vermutet, dass es sich bei circRNAs um funktionslose Splicing-Produkte handelt (Hsu und Coca-Prados, 1979). circRNAs entstehen durch Back-Splicing oder Exon-Skipping aus prä messenger RNAs (mRNA) und besitzen im Gegensatz zu linearen RNAs weder eine 5'-Kappe noch einen 3'-Poly(A)-Schwanz, sondern sind über den 3'-Splicing Donor mit dem 5'-Akzeptor kovalent gebunden. Die Klassifizierung erfolgt anhand der Lokalisation der Splice-Stelle im Genom, wobei der überwiegende Anteil aus den Exons kodierender Sequenzen entsteht (Zhou et al., 2020). Die zirkuläre Struktur dieser RNAs bedingt eine erhöhte Stabilität und Resistenz gegenüber Endonukleasen, sodass die Halbwertszeit von circRNAs höher ist als die anderer RNAs (Wu et al., 2019).

Mittlerweile sind einige Funktionen von circRNAs bekannt: Durch ein microRNA (miRNA) Response Element, das miRNAs bindet, wird die Interaktion der miRNA mit der Ziel mRNA verhindert (sogenannter „miRNA Sponge“) (Hansen et al., 2013). circRNAs beteiligen sich durch das Bilden von Komplexen mit RNA-bindenden Proteinen an der Regulation des Zellzyklus (Du et al., 2016). Auch können sie Proteine kodieren (Pamudurti et al., 2017) und beeinflussen deren Expression auf translationaler und posttranslationaler Ebene (Li et al., 2015). Aufgrund der Tatsache, dass das Expressionsprofil von circRNAs eine hohe Tumor- und Gewebespezifität aufweist, besitzen circRNAs das Potential, als neue Biomarker etabliert zu werden.

Die Kenntnisse über die Expression von circRNAs im ccRCC sind begrenzt. Kürzlich veröffentlichte Genexpressionsanalysen zeigen eine ccRCC-spezifische circRNA Expression und erlauben eine Unterscheidung zwischen Tumor- und Normalgewebe (Franz et al., 2019; Li et al., 2020; Lv et al., 2020; Zhang et al., 2019). Um Kandidaten für eine Validierungsstudie zu identifizieren, wurden die Expressionsprofile bereits veröffentlichter Arbeiten studiert und sieben vielversprechende circRNAs ausgewählt. Mit dem Ziel, ihre Expression in einer größeren Kohorte zu betrachten, wurden folgende circRNAs genauer untersucht: circENGL3 (Egl Nine Homologue) (Franz et al., 2019; Lin und Cai, 2020), circCOL5A1 (collagen) (Lv et al., 2020), circEHD2 (EH-domain containing) (Franz et al., 2019), circNETO2 (Neuropilin and tolloid-like protein) (Franz et al., 2019), circSCARB1 (Scavenger Receptor Class B) (Franz et al., 2019), circSOD2 (Superoxide dismutase) (Lv et al., 2020) und circEDEM2 (ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like) (Lv et al., 2020). Kriterien für die Auswahl der Kandidaten waren eine ausgeprägte (Fold-change > 4) und signifikante ($p < 0,03$) Überexpression im ccRCC Gewebe. CircENGL3 zeigte bereits eine Hochregulation und eine Assoziation mit dem krebsspezifischen Überleben in einer größeren Kohorte von ccRCC (Franz et al., 2019). Die anderen sechs Kandidaten wurden bislang in keiner größeren Kohorte validiert.

Ziel der Studie war es, die Expression der erwähnten sieben circRNAs in einer großen Kohorte von ccRCC und normalem Nierengewebe zu untersuchen und so das Wissen über die Rolle der circRNAs als mögliche Biomarker für das ccRCC voranzubringen.

1.2 Material und Methoden

1.2.1. Patientenproben

Die Studie wurde zweistufig geplant: Zunächst wurden in einer Screening-Phase 20 Gewebeproben von Patienten mit ccRCC (zehn mit lokalisiertem und zehn von bereits metastasiertem ccRCC) und zehn normale nicht pathologisch veränderte Nierengewebe untersucht. Für die Validierungsphase wurden 101 Tumorproben und 81 normale Nierengewebe verwendet. Alle Gewebeproben wurden prospektiv in der Biobank im Zentrum für Integrierte Onkologie am Universitätsklinikum Bonn gesammelt. Sie stammen von Patienten, die sich entweder einer radikalen oder partiellen Nephrektomie an der Klinik für Urologie unterzogen. Alle normalen Nierengewebsproben stammen ebenfalls von Patienten, die sich einer Nephrektomie aufgrund eines Nierentumors unterzogen. Die Proben wurden allerdings aus möglichst weit vom Tumor entfernten Arealen gewonnen. Die Gewebe wurden schockgefroren und bei - 80 °C gelagert. Die Klassifizierung anhand der WHO Klassifikation von 2009 und die Begutachtung der Proben erfolgte durch einen Uro-Pathologen. In Tabelle 1 sind die klinischen Daten der Patientenproben aufgelistet. Die Durchführung der Studie wurde durch die Ethikkommission der Universität Bonn (Votum: 347/19) genehmigt.

1.2.2 RNA Isolierung, RNase R Behandlung und cel-miR-39 spike-in

Die Isolierung der RNA wurde mit dem mirVana miRNA Isolation Kit AM1560 (Ambion, Foster City, CA, USA) analog der Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden 50 mg Gefriergewebe unter Kühlung auf flüssigem Stickstoff abgemeißelt und der Lysis/Bindung Puffer hinzugegeben. Anschließend erfolgte durch Acid-Phenol: Chloroform die organische Extraktion. Die RNA in der wässrigen Phase wurde nach Zugabe von Ethanol über eine Silikagel-Säule aufgereinigt. Mögliche Spuren von genomischer Desoxyribonukleinsäure (gDNA) wurden durch einen DNase Verdau mit dem „DNA-free Kit“ AM 1906 (DNA-free Kit, Ambion) entfernt. Auch dies geschah analog der Herstellerangaben. Die RNA-Konzentrierung wurde mithilfe des NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) bestimmt und die Proben wurden bei - 80 °C eingelagert.

Die Qualität der isolierten RNA wurde darüber hinaus durch Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)-Gelelektrophorese überprüft.

Die aufgereinigte RNA besteht zum größten Teil aus linearer RNA und enthält in geringer Konzentration zirkuläre RNA. Zur Eliminierung der linearen RNA wurden die Proben mit RNase R MA266E (Lucigen, Teddington, United Kingdom) behandelt. 500 ng RNA wurden unter Hinzugabe von 0,5 U/ μ l RNase R, Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Wasser, einem zehnfachen Puffer und einem RNase Inhibitor N8080119 (Thermo Scientific) auf ein Gesamtvolumen von 20 μ l verdünnt. Danach erfolgte eine Inkubation für 90 Minuten bei 37 °C.

Zur erneuten Aufreinigung der RNA und Entfernung von PCR-Störfaktoren wurde zunächst eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Die RNA wurde mit Wasser auf ein Volumen von 80 μ l eingestellt und mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform ausgeschüttelt. Als "spike in" wurde die cel-miR-39-Taq (0,4 fmol) hinzugegeben. Der Extraktion schloss sich eine Ethanol-Präzipitation mit Natriumacetat (3 M) und absolutem Ethanol an. Es erfolgte eine Inkubation über Nacht bei - 80 °C, ein Waschschriff mit 70 %igem Ethanol und eine Zentrifugation bei 4 °C. Nach Entfernung des Alkohols und 15 minütiger Trocknung bei Raumtemperatur wurde die RNA mit 7 μ l Wasser aufgenommen.

Zur Erstellung der "spike in" cel-miR-39 (cel-miR-39-Taq) wurde die syn-cel-miR-39 (MSY0000010 Qiagen) mit dem miScript II Reverse Transkriptase (RT) Kit (Qiagen, Hilden, Germany) nach Angaben des Herstellers in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die Umschreibung beinhaltet eine Polyadenylierung und verwendet einen polydT-Primer, der gleichzeitig eine Taq-Sequenz einführt.

Bei der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wurde der cel-mir39 Primer (Qiagen Cat: MS00019789) und ein Universal Primer aus dem miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen 218073) verwendet.

1.2.3 cDNA Synthese und quantitative real-time PCR

Die cDNA Synthese wurde mit dem PrimeScript reagent Kit RR037A (Takara, Saint-Germain-en Laye, France) realisiert. Hierzu wurden 500 ng RNaseR behandelte RNA verdünnt in 7 μ l RNase freiem Wasser verwendet. Nach Hinzugabe des Puffers, des RT Enzyms und der Random Hexamers wurde das Gesamtvolumen von 10 μ l für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend für fünf Sekunden auf 85 °C erhitzt.

Die quantitative real-time PCR wurde mit dem TB Green Premix Ex Taq II RR820A (Takara, Saint-Germain-en Laye, France) mit 5 ng/ μ l cDNA und 10 pmol/ μ L forward/reverse Primer durchgeführt. Jede Probe wurde als Triplikat angesetzt und mit dem QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystem by Thermo Fisher Scientific) amplifiziert. Daneben wurden die Primer mit no template control (NTC), noRT Control und gDNA auf ihre Spezifität geprüft. Die Effizienz der Primer wurde mit einer relativen Eichkurve ermittelt. Zur Berechnung der relativen Expressionslevel wurde die QuantStudio 3D AnalysisSuite Cloud Software (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific) verwendet und die Proben wurden alle in Relation zur cel-miR-39 gesetzt. Die Berechnung hierfür erfolgte anhand der $\Delta\Delta C_t$ -Methode.

Die ausgewählten circRNAs haben bereits in kleineren Studien eine signifikante Überexpression und somit ein mögliches Potential als Biomarker gezeigt. Folgende Primer-Sequenzen wurden bereits früher veröffentlicht und für unsere Validierungsphase übernommen: circEGLN3 (Franz et al., 2019), circSOD2 (Ren et al., 2018) und circEDEM2 (Liu et al., 2018). Die anderen Primer wurden als divergente circRNA-spezifische Primer mit der Software CirclInteractome (Dudekula et al., 2016) konzipiert: circNETO2 (forward: 5'-AGT-GAT-TCG-AAT-GTG-GGC-AGA-3'; reverse: 5'-ATT-AAC-AAC-AGC-TCC-ACA-AAG-GA-3'), circSCARB1 (forward: 5'-AGG-TTC-AGT-TGA-CTT-CTG-GCA-3'; reverse: 5'-CTC-AGG-AGT-CAT-GAA-GGG-CG-3'), circEHD2 (forward: 5'-CTG-GTG-CGA-GCT-ACG-ACT-TC-3'; reverse: 5'-TCG-TCC-GAG-ATC-TCC-AGC-TT-3') und circCOL5A1 (forward: 5'-CCA-AGG-ATG-CTC-CAG-GGA-TT-3'; reverse: 5'-GGC-CCC-CTT-CGG-ACT-TCT-3'). Bei der Bestimmung der PCR Effizienz der Primer ergaben sich folgende Ergebnisse: 103,2 % für circEGLN3, 95,5 % für circEHD2 und 95,9 % für circNETO2. Bei der Durchführung der PCR wurde sich an den Richtlinien für Mindestinformationen für die

Veröffentlichung quantitativer Echtzeit-PCR-Experimente (MIQE guidelines; angefügtes Material S1) orientiert.

1.2.4 Statistik und Datenanalyse

Zur statistischen Auswertung wurde SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) IBM Statistics 25.0 verwendet und ein p-Wert von $< 0,05$ als statistisch signifikant festgelegt. Zum Vergleich der circRNA Expression mit klinischen Parametern wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet und um die Vorhersagefähigkeit der circRNAs zu prüfen, wurden receiver operating characteristic (ROC) curves mit area under the curve (AUC) Analysen durchgeführt. Zur Cutoff-Berechnung für die Überlebensanalysen wurde der Cutoff Finder algorithm (Budczies et al., 2012) genutzt. Die Kaplan-Meier Kurven für circNETO2 und circEHD2 wurden mithilfe von SPSS generiert und eine Cox Regressionsanalyse ist nach Dichotomisierung der klinischen Variablen erfolgt.

1.3 Ergebnisse

1.3.1 Screening-Phase

Zunächst wurden die Expressionslevel von sieben circRNAs an einer Kohorte bestehend aus 20 ccRCC und zehn normalen Nierengeweben untersucht. Es zeigte sich, dass die Expression von circEGLN3 ($p < 0,001$), circEHD2 ($p < 0,001$), circNETO2 ($p = 0,024$) und circEDEM2 ($p < 0,044$) in den ccRCC Proben signifikant erhöht war. Bei circCOL5A1 ($p = 0,307$), circSCARB1 ($p = 0,061$) und circSOD2 ($p = 0,055$) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen ccRCC und normalem Nierengewebe festgestellt werden (Abbildung 1). Mithilfe der ROC Analysen wurde eine Sensitivität von 80 % und eine Spezifität von 100 % für circEHD2, eine Sensitivität von 90 % und eine Spezifität von 80 % für circEGLN3, eine Sensitivität von 70 % und eine Spezifität von 70 % für circNETO2 sowie eine Sensitivität von 80 % und eine Spezifität von 100 % für circEDEM2 ermittelt.

1.3.2 Validierungsphase

Zur Validierung wurden die circRNAs mit einer signifikanten Dysregulation in der Screening-Phase (circEGLN3, circEHD2, circEDEM2 und circNETO2) in einer größeren Kohorte (101 ccRCC und 81 normale Nierengewebe) untersucht. Es zeigten sich drei der vier circRNAs (circEGLN3, circEHD2 und circNETO2) signifikant erhöht exprimiert im ccRCC Gewebe (alle $p < 0,001$). circEDEM2 war nicht differentiell exprimiert ($p = 0,431$). Durch die ROC Analysen konnte aufgezeigt werden, dass circEGLN3 die präziseste Unterscheidung zwischen ccRCC und normalem Nierengewebe besitzt (AUC = 0,879; Sensitivität 87,1 %, Spezifität 77,8 %). circEHD2 (AUC = 0,757; Sensitivität 52,5 %, Spezifität 85,2 %) und circNETO2 (AUC = 0,705; Sensitivität 59,4 %; Spezifität 82,7 %) wiesen eine herabgesetzte Abgrenzungskraft auf (s. Abbildung 2).

Danach wurde die prognostischen Aussagekraft der circRNA Expression untersucht. Es konnte bei keiner der untersuchten circRNAs eine Korrelation mit klinischen Parametern wie Tumor-/Lymphknoten-/Metastasen-Status (TNM), Grading oder Geschlecht festgestellt werden. Wie bereits oben erwähnt wurde zur Dichotomisierung der ccRCC-Proben der Cutoff-Finder verwendet (Budczies et al., 2012). So wurde durch den optimierten Cutoff jeweils eine Gruppe mit hoher und niedriger Expression erzeugt. Es stellte sich heraus, dass hohe circEHD2 Expressionslevel mit einem signifikant kürzeren sowohl progressionsfreien ($p = 0,002$) als auch krebsspezifischen ($p = 0,032$) Überleben assoziiert sind. Bei circNETO2 zeigte sich bei niedrigen Expressionsleveln eine Assoziation mit einem kürzeren progressionsfreien ($p = 0,001$), einem kürzeren krebsspezifischem ($p = 0,001$) und einem kürzeren Gesamtüberleben ($p = 0,001$). Die univariate und multivariate Cox Regressionsanalyse bewies ebenso die Korrelation von niedrigem circNETO2 und hohem circEHD2 mit progressionsfreiem (Tabelle 2), krebsspezifischem (Tabelle 3) und Gesamtüberleben (Tabelle 4). Da Patientenproben mit Fernmetastasen fehlten, wurden die Parameter gruppiert. Dennoch sind beide circRNAs als unabhängig von klinischen Parametern wie dem TNM-Status zu werten.

1.3.3 Analyse von circRNA Interaktionen

Anschließend wurde mithilfe der Software CircInteractome (Dudekula et al., 2016) das Interaktionspotential der drei circRNAs (circEGLN3, circEHD2, circNETO2) mit RNA-Bindungsproteinen untersucht. Sowohl an der flankierenden als auch an der bindenden Region der circRNA wurden mehrere mögliche Bindungsstellen von RNA-Bindungsproteinen aufgezeigt. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 4 zu sehen. Auch die Funktion als „miRNA sponge“ wurde mit der CircInteractome Software analysiert und es konnten verschiedene spezifische Bindungsstellen für miRNAs gezeigt werden (Abbildung 5).

1.4 Diskussion

Das Potential von circRNAs als neue Biomarker ergibt sich aufgrund von deren verlängerter Halbwertszeit im Vergleich zu anderen RNA Molekülen. Auch die hohe Tumor- und Gewebespezifität trägt entscheidend zu diesem Potential bei (Xia et al., 2017; Xia et al., 2018). Um dieses Potential genauer beurteilen zu können, wurden die Expressionsprofile von sieben circRNAs (circCOL5A1, circEHD2, circEGLN3, circEDEM2, circNETO2, circSCARB1, circSOD2) an der größten bisher untersuchten Kohorte von ccRCC und normalem Nierengewebe studiert.

circEHD2 kristallisierte sich schnell als einer der vielversprechenden Kandidaten heraus. Zunächst konnte bestätigt werden, dass die Expression von circEHD2 im ccRCC signifikant höher ist als im normalen Nierengewebe. Außerdem konnte festgestellt werden, dass circEHD2 ein unabhängiger Prädiktor für progressionsfreies und krebspezifisches Überleben ist. Bereits Franz et al. (2019) identifizierten in ihrer Studie circEHD2 als überexprimierte circRNA im ccRCC, jedoch erfolgte keine genauere Untersuchung. Es wird also zum ersten Mal die diagnostische und prognostische Relevanz von circEHD2 im ccRCC gezeigt. Eine Schwäche besteht bei circEHD2 in der moderaten diagnostischen Genauigkeit (AUC = 0,757). Da circEHD2 bisher noch nicht in anderen Tumorgeweben untersucht wurde, müsste dies noch geschehen, um eine Spezifität für das ccRCC bestätigen zu können.

circEGLN3 würde sich aufgrund der hohen Unterscheidungsfähigkeit zwischen ccRCC und normalem Nierengewebe (AUC = 0,879; Sensitivität = 83,2 %; Spezifität = 80,2 %) sehr gut als Biomarker eignen. Eine bereits mehrfach erwähnte Studie (Franz et al., 2019) ermittelte sogar noch höhere Werte für Sensitivität und Spezifität (beide 95 %). Jedoch handelte es sich im Vergleich zu unserer Studie um eine kleinere Kohorte (n = 82 lokalisierte und n = 17 metastasierte ccRCC) mit einer höheren Anzahl an metastasierten ccRCC. Auch in anderen Studien konnte eine Überexpression von circEGLN3 im ccRCC validiert werden (Lin und Cai, 2020). In Bezug auf die diagnostische Bedeutung kamen verschiedene Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen. So kamen Franz et al. (2019) zu dem Schluss, dass höhere Expressionslevels von circEGLN3 mit einem längeren Überleben assoziiert waren. Dem entgegengesetzt berichteten Lin und Cai (2020), dass hohe Expressionslevels dieser circRNA im Zusammenhang mit einem kürzeren Überleben nach Nephrektomie standen. In dieser Studie konnte weder eine Korrelation mit klinischen Parametern noch mit dem Überleben detektiert werden, was das Potenzial als Biomarker einschränkt. Der Knockdown von circEGLN3 führte zu einer beeinträchtigten Proliferation, Migration und Invasion und einer einfacheren Apoptose der RCC Zellen. Das onkogene Potential konnte über eine Herunterregulation von IRF7 (Interferon regulatory factor) und dadurch „sponging“ von miR-1299 im ccRCC aufgezeigt werden (Lin und Cai, 2020).

Wie circEHD2 wurde auch circNETO2 bereits von Franz et al. (2019) identifiziert, aber nicht näher untersucht. Es konnte die Überexpression von circNETO2 im ccRCC bestätigt werden und darüber hinaus festgestellt werden, dass circNETO2 eine unabhängige Vorhersage von progressionsfreiem, krebspezifischem und Gesamtüberleben erlaubt. Eine Limitation stellt wie bei circEDEM2 auch hier die diagnostische Genauigkeit von lediglich AUC = 0,705 dar. Dies ist das erste Mal, dass circNETO2 im RCC untersucht wurde. In Lungenkrebszellen konnten Xu et al. (2020) keinen Unterschied im Expressionslevel zwischen malignen und normalen Zellen feststellen.

Im Gegensatz zu anderen Studien konnte bei circSCARB1 (Franz et al., 2019), circCOL5A1, circSOD2 und circEDEM2 (Lv et al., 2020) kein signifikanter Unterschied im Expressionslevel von ccRCC und normalem Nierengewebe festgemacht werden. Erklären kann man diese abweichenden Ergebnisse unter anderem durch die größere Kohorte

und eine Überlegenheit der quantitativen real-time PCR gegenüber einer Microarray Analyse bezogen auf die Technik zur Quantifizierung. Auch wenn letztgenannte circRNAs kein Potential als Biomarker besitzen, so zeigen andere Studien deren Relevanz für das Verständnis der Tumorentstehung. circSCARB1 fördert das Wachstum von RCCs durch das Isolieren von miR-510-5p und indirekter Hochregulierung von SDC3 (Syndecan) (Sun et al., 2020). circCOL5A1 erfüllt die Funktion als miR-1224-5p Schwamm und fördert so über eine CREB1 (cAMP response element-binding protein) Aktivierung die Zellproliferation im Harnblasenkrebs (Zhuang et al., 2020). circSOD2 fördert sowohl Zellwachstum als auch Zellmigration und Zellzyklusprogression. Es konnte für circSOD2 gezeigt werden, dass das Wachstum von Leberkrebs beschleunigt wird. Dies geschieht über eine Hinderung der miR-502-5p Expression und eine Hochregulation der DNMT3A (DNA-Methyltransferase) Expression (Zhao et al., 2020).

Es konnte dargestellt werden, dass alle drei näher untersuchten und vielversprechenden circRNAs (circEHD2, circEGLN3 und circNETO2) potentielle Bindungsstellen für das RNA-Bindungsprotein EIF4A3 (Eukaryotic initiation factor) besitzen. Es ist unter anderem an der Initiierung der Translation, nukleärem und mitochondrialem Splicing und der Bildung von Ribosomen beteiligt. Möglicherweise besitzt EIF4A3 eine Rolle bei der Entstehung der circRNAs, da sich die Bindungsstellen häufig an der flankierenden Seite befinden. Außerdem konnten mehrere potentielle miRNA Bindungsstellen gefunden werden (15 für circEHD2, 19 für circNETO2 und 33 für circEGLN3), weswegen man darauf schließen könnte, dass die drei favorisierten Kandidaten als miRNA-Schwamm fungieren.

Als Einschränkung der Aussage dieser Studie sind das Fehlen von Patientenproben mit Lymphknotenmetastasen und die Unterrepräsentation von Patienten mit Fernmetastasen (n = 6) in der Validierungskohorte zu nennen. Dies kommt daher, dass nach aktueller Leitlinie nur bei sehr wenigen Patienten mit metastasierter Erkrankung eine zytoreduktive Nephrektomie indiziert ist und diese Patienten vielmehr eine Therapie mit Sunitinib erhalten (Méjean et al., 2018). Durch das Konzentrieren auf Patientenproben mit lokalisiertem ccRCC wird die prognostische Bedeutung dieser Studie deutlicher. Es könnte ein frühzeitiges Erkennen eines erhöhten Risikos für das Fortschreiten der Tumorerkrankung nach Nephrektomie ermöglicht werden und so früher eine Therapie mit kurativer Intention ein-

geleitet werden. Es wurde sich auf die nähere Untersuchung von sieben circRNAs beschränkt, da diese (circENGL3 (Franz et al., 2019; Lin und Cai, 2020), circCOL5A1 (Lv et al., 2020), circEHD2 (Franz et al., 2019), circNETO2 (Franz et al., 2019), circSCARB1 (Franz et al., 2019), circSOD2 (Lv et al., 2020), circEDEM2 (Lv et al., 2020)) als mögliche Biomarker besonders interessiert haben (Fold change > 4, signifikante Überexpression im ccRCC in vorherigen Studien).

1.5 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass circRNAs im ccRCC sowohl prognostische als auch diagnostische Informationen liefern können: circENGL3 ermöglicht eine präzise Unterscheidung zwischen ccRCC und normalem Nierengewebe. circEHD2 und circNETO2 erlauben eine Vorhersage über die Überlebensprognose nach Nephrektomie. Durch eine Beachtung der circRNAs könnte eine noch weiter auf den Patienten abgestimmte Therapie vom ccRCC ermöglicht werden und auf diese Weise das Überleben von Patienten mit ccRCC verbessert werden.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Budczies J, Klauschen F, Sinn BV, Györfy B, Schmitt WD, Darb-Esfahani S, Denkert C. Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PloS one* 2012; 7: e51862

Du WW, Yang W, Liu E, Yang Z, Dhaliwal P, Yang BB. Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2. *Nucleic acids research* 2016; 44: 2846-2858

Dudekula DB, Panda AC, Grammatikakis I, De S, Abdelmohsen K, Gorospe M. CircInteractome: A web tool for exploring circular RNAs and their interacting proteins and microRNAs. *RNA biology* 2016; 13: 34-42

Escudier B, Porta C, Schmidinger M, Rioux-Leclercq N, Bex A, Khoo V, Gruenvald V, Horwich A. Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2016; 27: v58-v68

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* 2019; 11: 1473

GEKID - Homepage. GEKID - Homepage. Verfügbar unter <https://www.gekid.de/> (Zugriffsdatum: 2021-07-04T08:42:53.364Z)

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: 384-388

Hofmann F, Hwang EC, Lam TB, Bex A, Yuan Y, Marconi LS, Ljungberg B. Targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma. *The Cochrane database of systematic reviews* 2020; 10

Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, Swanton C, Albiges L, Schmidinger M, Heng DY, Larkin J, Ficarra V. Renal cell carcinoma. *Nature reviews. Disease primers* 2017; 3: 1-19

Hsu MT, Coca-Prados M. Electron microscopic evidence for the circular form of RNA in the cytoplasm of eukaryotic cells. *Nature* 1979; 280: 339-340

Li W, Yang FQ, Sun CM, Huang JH, Zhang HM, Li X, Wang GC, Zhang N, Che JP, Zhang WT, Yan Y, Yao XD, Peng B, Zheng JH, Liu M. circPRRC2A promotes angiogenesis and metastasis through epithelial-mesenchymal transition and upregulates TRPM3 in renal cell carcinoma. *Theranostics* 2020; 10: 4395-4409

Li Z, Huang C, Bao C, Chen L, Lin M, Wang X, Zhong G, Yu B, Hu W, Dai L, Zhu P, Chang Z, Wu Q, Zhao Y, Jia Y, Xu P, Liu H, Shan G. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nature structural & molecular biology* 2015; 22: 256-264

Lin L, Cai J. Circular RNA circ-EGLN3 promotes renal cell carcinoma proliferation and aggressiveness via miR-1299-mediated IRF7 activation. *Journal of cellular biochemistry* 2020; 121: 4377-4385

Liu H, Hu Y, Zhuang B, Yin J, Chen XH, Wang J, Li MM, Xu J, Wang XY, Yu ZB, Han SP. Differential Expression of CircRNAs in Embryonic Heart Tissue Associated with Ventricular Septal Defect. *International journal of medical sciences* 2018; 15: 703-712

Lv Q, Ma C, Li H, Tan X, Wang G, Zhang Y, Wang P. Circular RNA microarray expression profile and potential function of circ0005875 in clear cell renal cell carcinoma. *Journal of Cancer* 2020; 11: 7146-7156

Méjean A, Ravaud A, Thezenas S, Colas S, Beauval JB, Bensalah K, Geoffrois L, Thiery-Vuillemin A, Cormier L, Lang H, Guy L, Gravis G, Rolland F, Linassier C, Lechevallier E, Beisland C, Aitchison M, Oudard S, Patard JJ, Theodore C, Chevreau C, Laguerre B, Hubert J, Gross-Goupil M, Bernhard JC, Albiges L, Timsit MO, Lebreton T, Escudier B. Sunitinib Alone or after Nephrectomy in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *The New England journal of medicine* 2018; 379: 417-427

Pamudurti NR, Bartok O, Jens M, Ashwal-Fluss R, Stottmeister C, Ruhe L, Hanan M, Wyler E, Perez-Hernandez D, Ramberger E, Shenzis S, Samson M, Dittmar G, Landthaler M, Chekulaeva M, Rajewsky N, Kadener S. Translation of CircRNAs. *Molecular cell* 2017; 66: 9-21.e7

Ren H, Liu Z, Liu S, Zhou X, Wang H, Xu J, Wang D, Yuan G. Profile and clinical implication of circular RNAs in human papillary thyroid carcinoma. *PeerJ* 2018; 6: e5363

Sun J, Pan S, Cui H, Li H. CircRNA SCARB1 Promotes Renal Cell Carcinoma Progression Via Mir- 510-5p/SDC3 Axis. *Current cancer drug targets* 2020; 20: 461-470

Wu J, Qi X, Liu L, Hu X, Liu J, Yang J, Lu L, Zhang Z, Ma S, Li H, Yun X, Sun T, Wang Y, Wang Z, Liu Z, Zhao W. Emerging Epigenetic Regulation of Circular RNAs in Human Cancer. *Molecular therapy. Nucleic acids* 2019; 16: 589-596

Xia S, Feng J, Chen K, Ma Y, Gong J, Cai F, Jin Y, Gao Y, Xia L, Chang H, Wei L, Han L, He C. CSCD: a database for cancer-specific circular RNAs. *Nucleic acids research* 2018; 46: D925-D929

Xia S, Feng J, Lei L, Hu J, Xia L, Wang J, Xiang Y, Liu L, Zhong S, Han L, He C. Comprehensive characterization of tissue-specific circular RNAs in the human and mouse genomes. *Briefings in bioinformatics* 2017; 18: 984-992

Xu L, Ma Y, Zhang H, Lu QJ, Yang L, Jiang GN, Liao WL. HMGA2 regulates circular RNA ASPH to promote tumor growth in lung adenocarcinoma. *Cell death & disease* 2020; 11: 1-10

Zhang D, Yang XJ, Luo QD, Fu DL, Li ZL, Zhang P, Chong T. Down-Regulation of Circular RNA_000926 Attenuates Renal Cell Carcinoma Progression through miRNA-411-Dependent CDH2 Inhibition. *The American journal of pathology* 2019; 189: 2469-2486

Zhao Z, Song J, Tang B, Fang S, Zhang D, Zheng L, Wu F, Gao Y, Chen C, Hu X, Weng Q, Yang Y, Tu J, Ji J. CircSOD2 induced epigenetic alteration drives hepatocellular carcinoma progression through activating JAK2/STAT3 signaling pathway. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 2020; 39: 1-16

Zhou M, Xiao MS, Li Z, Huang C. New progresses of circular RNA biology: from nuclear export to degradation. *RNA biology* 2020: 1365-1373

Zhuang C, Huang X, Yu J, Gui Y. Circular RNA hsa_circ_0075828 promotes bladder cancer cell proliferation through activation of CREB1. *BMB reports* 2020; 53: 82-87

2. Veröffentlichung



Article

CircEHD2, CircNETO2 and CircEGLN3 as Diagnostic and Prognostic Biomarkers for Patients with Renal Cell Carcinoma

Lisa Frey ¹, Niklas Klümper ¹, Doris Schmidt ¹, Glen Kristiansen ², Marieta Toma ², Manuel Ritter ¹, Abdullah Alajati ¹ and Jörg Ellinger ^{1,*}

¹ Department of Urology, University Hospital Bonn, 53127 Bonn, Germany; s4lifrey@uni-bonn.de (L.F.); niklas.kluemper@ukbonn.de (N.K.); doris.schmidt@ukbonn.de (D.S.); mritter@ukbonn.de (M.R.); abdullah.alajati@ukbonn.de (A.A.)

² Institute of Pathology, University Hospital Bonn, 53127 Bonn, Germany; glen.kristiansen@ukbonn.de (G.K.); marieta.toma@ukbonn.de (M.T.)

* Correspondence: joerg.ellinger@ukbonn.de; Tel.: +49 228-287-14180; Fax: +49-228-287-14185

Simple Summary: Circular RNA (circRNA) plays an important role in cancer, but little is known about its role in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC). The study was designed to analyze the role of circRNAs in ccRCC. We show that circEHD2, circENGLN3, and circNETO2 are upregulated in ccRCC compared with non-malignant renal tissue. Increased circEHD2 levels were significant and independent predictors of progression-free and cancer-specific survival of ccRCC patients. Thus, the analysis of circRNAs may be of diagnostic and prognostic relevance in patients with ccRCC.

Abstract: Background: Circular RNA (circRNA) plays an important role in the carcinogenesis of various tumors. It is assumed that circRNAs have a high tissue and tumor specificity, thus they are discussed as cancer biomarkers. The knowledge about circRNAs in clear cell renal carcinoma (ccRCC) is limited so far, and thus we studied the expression profile of seven circRNAs (circCOL5A1, circEHD2, circEDEM2, circENGLN3, circNETO2, circSCARB1, circSOD2) in a cohort of ccRCC patients. Methods: Fresh-frozen normal and cancerous tissues were prospectively collected from patients with ccRCC undergoing partial/radical nephrectomy. Total RNA was isolated from 121 ccRCC and 91 normal renal tissues, and the circRNA expression profile was determined using quantitative real-time PCR. Results: circEHD2, circENGLN3, and circNETO2 were upregulated in ccRCC compared with non-malignant renal tissue. circENGLN3 expression was highly discriminative between normal and cancerous tissue. None of the circRNAs was correlated with clinicopathological parameters. High circEHD2 and low circNETO2 levels were an independent predictor of a shortened progression-free survival, cancer-specific survival, and overall survival in patients with ccRCC undergoing nephrectomy. Conclusions: The analysis of circRNAs may provide diagnostic and prognostic information. Thus, circRNAs could help to optimize the individual treatment and ultimately improve ccRCC patients' survival.

Keywords: circular RNA; renal cell carcinoma; biomarker; circEHD2; circNETO2; circENGLN3

Citation: Frey, L.; Klümper, N.; Schmidt, D.; Kristiansen, G.; Toma, M.; Ritter, M.; Alajati, A.; Ellinger, J. CircEHD2, CircNETO2, and CircEGLN3 as Diagnostic and Prognostic Biomarkers for Patients with Renal Cell Carcinoma. *Cancers* **2021**, *13*, 2177. <https://doi.org/10.3390/cancers13092177>

Academic Editors: Ana Luisa Teixeira, Francisca Dias and Rui Medeiros

Received: 17 February 2021
Accepted: 26 April 2021
Published: 30 April 2021

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



Copyright: © 2021 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/>).

1. Introduction

Renal cell carcinoma (RCC) is one of the most frequent cancers with substantial mortality. Early-stage RCC may be cured by surgery, however, the prognosis of patients with metastasized RCC is poor. The armament of anticancer therapies has increased in the past years: immune checkpoint inhibitors, tyrosine kinase-inhibitors, VEGF-antibody, and mTOR inhibitors. These improved survival, but a cure is not achievable [1,2]. A better understanding of the molecular mechanisms underlying RCC could help to develop new therapeutic strategies. Furthermore, molecular biomarkers could indicate individual

prognosis, detect cancer recurrence/progression early, and allow a more individualized therapy.

Circular RNA (circRNA) was discovered in the 1970s and was initially considered as a functionless RNA splicing product [3]. circRNA has a loop structure with covalent bonds of head and tail. circRNAs lack a 3' end which protects them against exonuclease digestion and contributes to their higher stability compared with mRNA [4]. Circular and linear RNAs are derived from precursor mRNAs, and different splicing modes have been discovered. According to the location of splice junction in the genome, circRNAs are classified as exonic circRNA, circular intronic RNA, exonic-intronic circRNA, or tRNA intronic circRNA. Exonic circRNAs are formed by either single or several exons and are the most common circRNA [5]. Knowledge about the biological functions of circRNAs is still limited. However, circRNAs have various functions. They regulate gene expression on the transcriptional and the translational level, interact with proteins, act as miRNA sponges, translate proteins or peptides, modify rRNA processing, and generate pseudogenes [3]. Technological advances lead to the discovery of numerous circRNAs. Importantly, the cellular circRNA expression profile has a high tumor and tissue specificity [6,7], thus circRNAs have potential as a new cancer biomarker.

The knowledge of the expression of circRNAs in RCC is limited. In a recent publication, small-scaled gene expression analyses demonstrated a RCC-specific circRNA expression profile which allowed discrimination of tumor from normal renal tissue [8–11]. We systematically reviewed the former studies employing microarray expression profiling to study circRNA in ccRCC to identify circRNA candidates for a validation study. The small-scaled microarray analyses reported upregulation of various circRNAs, however most of them were not validated in a large cohort. Among these circRNAs, circENGL3 [8,12], circCOL5A1 [9], circEHD2 [8], circNETO2 [8], circSCARB1 [8], circSOD2 [9], and circEDEM2 [9] were of particular interest as biomarkers due to distinct overexpression in RCC (e.g., >4-fold). The analysis of circEGLN3 in an enlarged cohort confirmed specific upregulation in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) tissue. Furthermore, circEGLN3 expression was associated with cancer-specific survival following nephrectomy [8]. The remaining circRNAs have not been validated by independent studies so far. Our study was therefore designed to study the expression of seven circRNAs (circENGL3, circCOL5A1, circEHD2, circNETO2, circSCARB1, circSOD2, circEDEM2) in a large cohort of ccRCC and normal renal tissues to increase the knowledge on the potential role of circRNAs as biomarkers for ccRCC.

2. Materials and Methods

2.1. Patients

Tissue samples were collected prospectively in the biobank of the Centre for Integrated Oncology at the University Hospital Bonn from patients who underwent radical or partial nephrectomy at the Department of Urology. The study was composed of two cohorts. First, a discovery cohort with 20 tissues of patients with clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) and 10 normal tissues was studied. The ccRCC samples were selected to include each 10 patients with localized and metastatic ccRCC in order to allow identification of diagnostic and prognostic relevant circRNA biomarkers. Second, a validation cohort containing 101 ccRCC samples and 81 normal renal tissues was selected randomly from the biobank. All benign renal tissues were derived from nephrectomy specimens; the tissue was taken distantly from the tumor and histologically normal renal tissue. Fresh-frozen tissues were stored at -80°C . All used tissues were re-examined by a uro-pathologist and classified following the 2009 WHO classification. The clinicopathological information of the patients is provided in Table 1. The study was approved by the Ethics Committee of the University Bonn (vote: 347/19).

Table 1. Clinicopathological parameters of the study cohorts.

Clinical parameter	Discovery Cohort		Validation Cohort	
	ccRCC (n = 20)	Normal (n = 10)	ccRCC (n = 101)	Normal (n = 81)
Sex				
male	15 (75.0%)	6 (60.0%)	65 (64.4%)	59 (72.8%)
female	5 (25.0%)	4 (40.0%)	36 (35.6%)	22 (27.2%)
Age				
mean	65.4	58.7	63.7	64.1
min-max	43–78	43–78	36–89	36–89
pT-stage				
pT1	10 (50.0%)		61 (60.4%)	
pT2	0 (0%)		11 (10.9%)	
pT3	9 (45.0%)		28 (27.7%)	
pT4	1 (5.0%)		1 (1.0%)	
lymph node metastasis				
cN0/pN0	17 (85.0%)		101 (100%)	
pN1	3 (15.0%)		0 (0%)	
distant metastasis				
cM0	10 (50.0%)		95 (94.1%)	
cM1	10 (50.0%)		6 (5.9%)	
Grading				
grade 1	1 (5.0%)		11 (10.9%)	
grade 2	12 (60.0%)		74 (73.3%)	
grade 3	3 (15.0%)		14 (13.9%)	
grade 4	4 (20.0%)		2 (2.0%)	

2.2. RNA Isolation, RNase R Treatment, and cel-miR-39 Spike-in

The RNA isolation method was described in brief earlier [13]. Total RNA was isolated from 50 mg fresh-frozen renal tissue using the mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion, Foster City, CA, USA) and treated with DNase (DNA-free Kit, Ambion). All procedures were performed according to the manufacturers' recommendations. The RNA concentration was measured using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

To remove linear RNA, we treated the samples with RNase R (Lucigen, Teddington, United Kingdom). The RNA was diluted to 500 ng in a total volume of 20 μL and the treatment was done according to the manufacturers' instructions (RNase R 0.5 U/ μL , RNase R buffer 2.0 μL , and RNase Inhibitor N8080119 2.0 μL) at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 90 min.

Thereafter, the RNA was purified by a phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. cel-miR-39 (Qiagen, Hilden, Germany) (0.05 fmol/ μL) was spiked-in. After ten minutes of centrifugation, the upper aqueous phase was transferred to a new tube. Sodium acetate (3 M) and absolute ethanol were added and incubated overnight at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. After washing with ethanol and centrifugation at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, the ethanol was removed and the RNA resuspended in water.

2.3. cDNA Synthesis and Quantitative Real-Time PCR

cDNA synthesis and quantitative real-time PCR have been described earlier [14]. In brief, cDNA synthesis was performed with 500 ng RNA using the PrimeScript reagent Kit (Takara, Saint-Germain-en Laye, France). The manufacturers' protocol was used, with the exception of adding oligo(dT)-primer. It was incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min and heated to $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ for five seconds. Quantitative real-time PCR was done using the Takara TB Green Premix Ex Taq II with 1 ng/ μL RNA and 10 pmol/ μL forward/reverse primer on the QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystem by Thermo Fisher Scientific)

on 384-well plates (Thermo Fisher) in triplicates. No template controls, no reverse transcription controls, and genomic DNA controls were included and showed negative results. Relative circRNA expression levels were determined using the QuantStudio 3D AnalysisSuite Cloud Software (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific); cel-miR-39 was used as the reference gene.

Various circRNAs have been identified as potential diagnostic biomarkers in small-scaled microarray experiments; among these circRNAs, circCOL5A1, circEHD2, circEDEM2, circNETO2, circSCARB1, and circSOD2 demonstrated a significant and at least 4-fold overexpression and were thus chosen for validation in our study. The primer sequences of circEGLN3 [6], circSOD2 [15], and circEDEM2 [16] were published earlier. Divergent circRNA-specific PCR primers were designed for circNETO2 (forward: 5'-AGT-GAT-TCG-AAT-GTG-GGC-AGA-3'; reverse: 5'-ATT-AAC-AAC-AGC-TCC-ACA-AAG-GA-3'), circSCARB1 (forward: 5'-AGG-TTC-AGT-TGA-CTT-CTG-GCA-3'; reverse: 5'-CTC-AGG-AGT-CAT-GAA-GGG-CG-3'), circEHD2 (forward: 5'-CTG-GTG-CGA-GCT-ACG-ACT-TC-3'; reverse: 5'-TCG-TCC-GAG-ATC-TCC-AGC-TT-3'), and circCOL5A1 (forward: 5'-CCA-AGG-ATG-CTC-CAG-GGA-TT-3'; reverse: 5'-GGC-CCC-CCT-CGG-ACT-TCT-3') using CircInteractome [17]. The PCR efficiency was 103.2% for circEGLN3, 95.5% for circEHD2, and 95.9% for circNETO2. The PCR primer for cel-miR-39 (used as reference gene) was purchased from Qiagen (miScript Primer Assay, catalog no. 218300). See Supplementary Information for more information on the design of divergent PCR primers and the MIQE-report (Supplementary Material File S1).

2.4. Statistics and Data Analysis

SPSS IBM Statistics 25.0 was used for statistical analysis; $p < 0.05$ (two-sided) was considered as statistically significant. The Mann-Whitney U test was used to compare the circRNA expression with clinicopathological parameters. To identify the prediction capacity receiver operating characteristic (ROC) curves with area under the curve (AUC), analyses were done. To determine the optimal cutoff for each circRNA for the prediction of survival, we used the Cutoff Finder algorithm [18]. Kaplan–Meier curves for circNETO2 and circEHD2 were then generated using SPSS. For survival analysis, Kaplan–Meier estimates and Cox proportional regression analysis (using the dichotomized circRNA variables) were applied.

3. Results

3.1. Discovery Cohort

We first studied the circRNA expression of seven circRNAs in a discovery cohort including 20 ccRCC and 10 normal renal tissues (NAT). The expression of circEGLN3 ($p < 0.001$), circEHD2 ($p < 0.001$), circNETO2 ($p = 0.024$), and circEDEM2 ($p < 0.001$) was significantly increased in ccRCC. The expression of circCOL5A1 ($p = 0.307$), circSCARB1 ($p = 0.061$), and circSOD2 ($p = 0.055$) was not significantly different in ccRCC and NAT; see Figure 1. Using ROC analysis, a sensitivity of 80% and a specificity of 100% for circEHD2; a sensitivity of 90% and a specificity of 80% for circEGLN3; a sensitivity of 70% and a specificity of 70% for circNETO2; and a sensitivity of 80% and a specificity of 100% for circEDEM2 was determined.

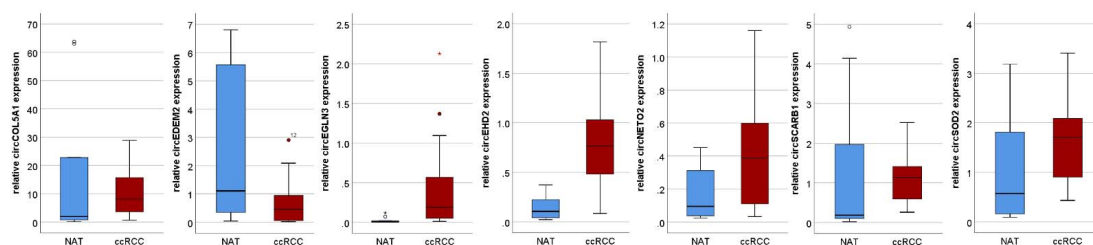


Figure 1. The expression of circEHD2, circEGLN3, and circNETO2 is increased in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) compared with normal adjacent renal (NAT) tissues, whereas expression levels of circSCARB1, circCOL5A1, and circSOD2 are not different in ccRCC and NAT. Circles indicate outliers.

3.2. Validation Cohort

We next studied circEGLN3, circEHD2, and circNETO2 expression in a validation cohort consisting of an independent cohort of 101 patients with ccRCC and 81 NAT. As expected, circEGLN3, circEHD2, and circNETO2 (all $p < 0.001$) levels were increased in patients with ccRCC. circEDEM2 showed no significant difference in the expression level ($p = 0.431$) in the validation cohort. ROC analysis indicated that circEGLN3 allowed the most accurate discrimination of ccRCC and NAT (AUC = 0.879; sensitivity 87.1%, specificity 77.8%) followed by circEHD2 (AUC = 0.757; sensitivity 52.5%, specificity 85.2%) and circNETO2 (AUC = 0.705; sensitivity 59.4%; specificity 82.7%); see Figure 2.

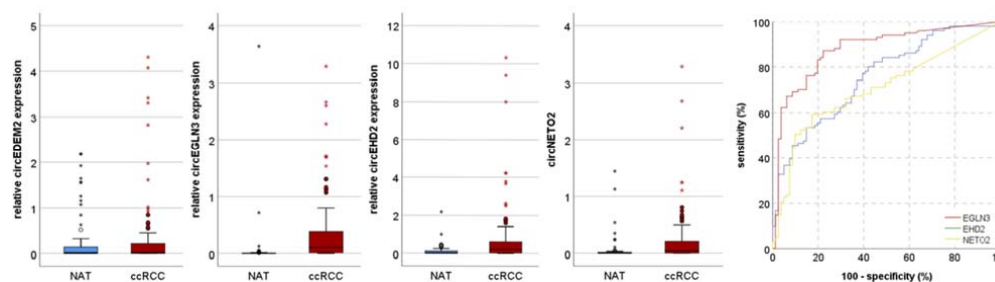


Figure 2. The expression of circEHD2 ($p < 0.001$), circEGLN3 ($p < 0.001$), and circNETO2 ($p < 0.001$) is increased in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) compared with normal renal (NAT) tissues. The Receiver Operator Characteristic analysis demonstrates that circEGLN3 allows discrimination of NAT and ccRCC with high accuracy. Circles indicate outliers, asterix extreme values.

We next analyzed the prognostic relevance of circRNA expression. None of the studied circRNAs were correlated with adverse clinicopathological parameters (i.e., TNM-stage, grade, gender). For survival analysis, we dichotomized the ccRCC using the Cutoff Finder [18] cohort into a high and a low expression group based on an optimized cut-off discriminating between survivors and deaths. High circEHD2 levels were associated with a significantly shortened progression-free survival ($p = 0.002$) and cancer-specific survival ($p = 0.032$). Low circNETO2 expression levels were predictive of a shortened progression-free survival ($p = 0.001$), cancer-specific survival ($p = 0.001$), and overall survival ($p = 0.001$) (see Figure 3). Furthermore, univariate and multivariate Cox regression analyses demonstrated that low circNETO2 and high circEHD2 were correlated with progression-free survival (see Table 2), overall-survival (see Table 3), and cancer-specific (see Table 4) survival. We decided to group the parameters and not to use continuous variables due to a lack of distant metastasis and a bigger and more representative cohort of each group. Thus, both circRNAs are predictors of patients' outcome independent of clinicopathological parameters like tumor grade, pT-stage, and cM-stage.

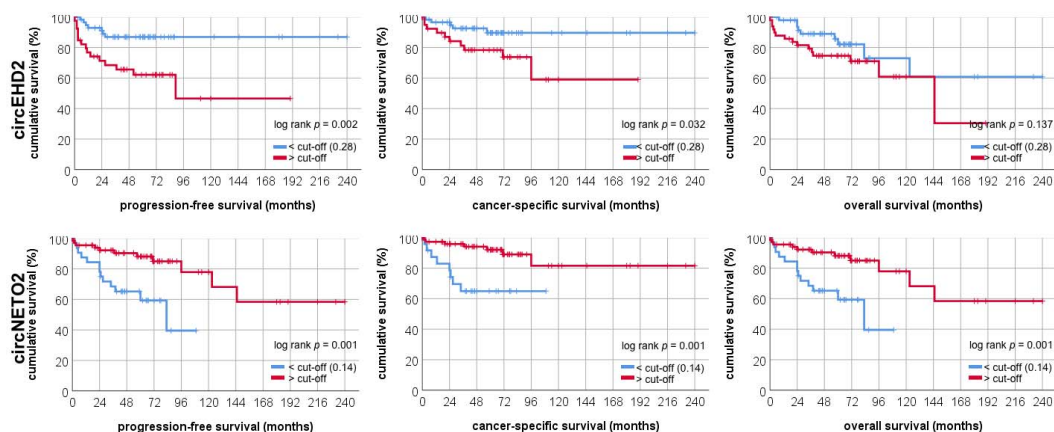


Figure 3. Kaplan–Meier estimates demonstrate that circRNA expression of circEHD2 and circNETO2 is associated with clear cell renal cell carcinoma patients’ survival following nephrectomy.

Table 2. Uni- and multivariate Cox regression analysis for progression-free survival.

Parameter	Univariate Analysis		Multivariate Analysis	
	<i>p</i> -Value	HR (95% CI)	<i>p</i> -Value	HR (95% CI)
Expression of circRNA				
Low (<cut-off)		1.00		1.00
High circEDEM2	0.246	1.68 (0.70–4.02)		
High circEGLN3	0.492	0.70 (0.26–1.92)		
High circEHD2	0.005	3.64 (1.48–8.92)	0.009	3.58 (1.37–9.38)
High circNETO2	0.002	0.26 (0.11–0.61)	0.001	0.17 (0.60–0.50)
Clinicopathological parameters				
Grading				
G1/2		1.00		1.00
G3/4	<0.001	5.40 (2.29–12.72)	<0.001	9.40 (3.38–26.09)
pT-stage				
pT1/2		1.00		1.00
pT3/4	0.002	3.76 (1.61–8.75)	0.009	3.32 (1.34–8.20)
cM-stage				
cM0		1.00		1.00
cM1	0.002	5.79 (1.94–17.25)	<0.001	11.91 (3.03–46.82)

Table 3. Uni- and multivariate Cox regression analysis for cancer-specific survival.

Parameter	Univariate Analysis		Multivariate Analysis	
	<i>p</i> -Value	HR (95% CI)	<i>p</i> -Value	HR (95% CI)
Expression of circRNA				
Low (<cut-off)		1.00		1.00
High circEDEM2	0.232	1.68 (7.16–3.97)		
High circEGLN3	0.883	0.938 (0.40–2.20)		
High circEHD2	0.005	3.64 (1.48–8.92)	0.042	2.67 (1.04–6.85)
High circNETO2	0.001	0.24 (0.10–0.56)	0.001	0.14 (0.05–0.43)
Clinicopathological parameters				
Grading				

G1/2		1.00		1.00
G3/4	<0.001	5.40 (2.29–12.72)	<0.001	11.66 (3.95–34.40)
pT-stage				
pT1/2		1.00		1.00
pT3/4	0.002	3.76 (1.61–8.75)	0.024	2.87 (1.15–7.17)
cM-stage				
cM0		1.00		1.00
cM1	0.002	5.78 (1.94–17.25)	<0.001	13.82 (3.386–56.39)

Table 4. Uni- and multivariate Cox regression analysis for overall survival.

Parameter	Univariate Analysis		Multivariate Analysis	
	<i>p</i> -Value	HR (95% CI)	<i>p</i> -Value	HR (95% CI)
Expression of circRNA				
Low (<cut-off)		1.00		1.00
High circEDEM2	0.541	1.30 (0.56–3.03)		
High circEGLN3	0.677	0.81 (0.30–2.21)		
High circEHD2	0.019	3.07 (1.20–7.85)	0.008	3.91 (1.43–10.67)
High circNETO2	0.010	0.32 (0.13–0.76)	0.001	0.15 (0.05–0.46)
Clinicopathological parameters				
Grading				
G1/2		1.00		1.00
G3/4	<0.001	5.40 (2.29–12.72)	<0.001	9.95 (3.56–27.85)
pT-stage				
pT1/2		1.00		1.00
pT3/4	0.002	3.76 (1.61–8.75)	0.007	3.52 (1.42–8.70)
cM-stage				
cM0		1.00		1.00
cM1	0.002	5.79 (1.94–17.25)	<0.001	14.03 (3.51–56.13)

3.3. Analysis of circRNA Interactions

We next analyzed potential interactions of circRNA (circEGLN3, circED2, circNETO2) with RNA-binding proteins. Using the CircInteractome [17] tool, we observed that multiple RNA-binding proteins have putative binding sites at the circRNA junction site but also the flanking region. The putative binding sites are displayed schematically in Figure 4. circRNAs may function as miRNA sponges. The CircInteractome tool revealed numerous target sites for specific miRNAs. The algorithm predicted up to two binding sites per miRNA in circEGLN3, circED2, circNETO2; see Figure 5.

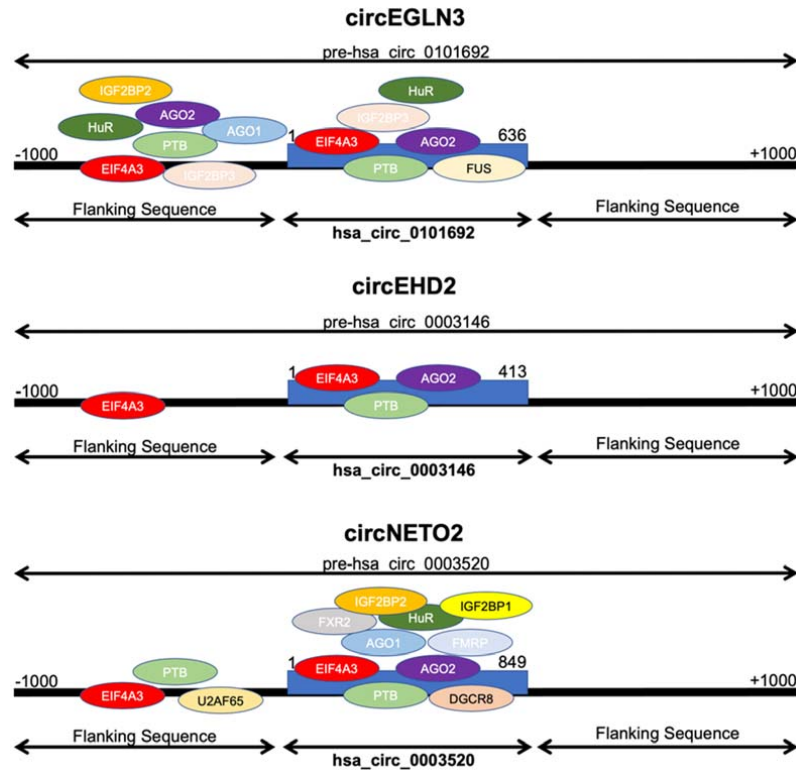


Figure 4. The circRNAs circEHD2, circEGLN3, and circNETO2 have several putative RNA-binding protein binding sites in circRNA junction and the 5'-flanking sites.



Figure 5. The circRNAs circEHD2, circEGLN3, and circNETO2 have multiple putative binding sites for miRNAs.

4. Discussion

circRNA expression profiles provide a high tumor and tissue specificity [6,7]. circRNAs are highly resistant to RNase R digestion resulting in an increased half-life compared with other RNA molecules. They represent therefore a potential new cancer biomarker. It should be noted that a recent study questioned whether circRNAs have an increased stability compared with mRNA in tissue samples [19]. However, Rochow et al. [19] observed

that circRNA expression is not altered in clinical samples with a high RNA integrity number ($RIN > 6$). We exclusively used fresh-frozen tissues in order to achieve a high RNA integrity, and therefore do not expect a bias in the circRNA expression. circRNA expression is also of interest for RCC research [20], although the knowledge of circRNAs in ccRCC is limited so far. We therefore studied the expression of seven circRNAs (circCOL5A1, circEHD2, circEGLN3, circEDEM2, circNETO2, circSCARB1, circSOD2) in a large cohort of ccRCC patients. Our study includes the largest number of normal and ccRCC tissues so far, and thus powerful statistical analyses are feasible.

One of the most promising circRNA ccRCC biomarkers is circEHD2. circEHD2 expression was significantly increased in ccRCC compared with normal renal tissue. Furthermore, high circEHD2 expression was an independent predictor of progression-free and cancer-specific survival in patients undergoing radical or partial nephrectomy. circEHD2 was identified by Franz et al. [8] using a microarray screening approach; the study included seven matched normal and ccRCC tissues. However, circEHD2 was not further validated. We therefore show for the first time that circEHD2 may be of diagnostic/prognostic relevance in patients with ccRCC. However, circEHD2 had a moderate diagnostic accuracy in our study ($AUC = 0.757$), and circEGLN3 may be better suited as a diagnostic biomarker due to an increased accuracy ($AUC = 0.879$). So far, circEHD2 has not been studied in other malignancies, and thus it is speculative whether this circRNA is specifically dysregulated in ccRCC.

circEGLN3 was distinctly upregulated in ccRCC tissue in our study; using analyses we observed that circEGLN3 allowed discrimination of ccRCC and normal renal tissue with an AUC of 0.879, thus the diagnostic sensitivity was 83.2% and the specificity was 80.2%. A former study [6] indicated an even more accurate diagnostic classification, with a sensitivity and specificity of 95%. However, the patient cohort in the study by Franz et al. [8] was smaller-sized ($n = 82$ non-metastatic and $n = 17$ metastatic ccRCC) and included a higher percentage of advanced ccRCC compared with our study (metastatic ccRCC in the validation cohort: $n = 6$; 5%). Significant overexpression was also observed by Lin and Cai [12]. Furthermore, Franz et al. observed low circEGLN3 expression levels as a poor prognostic parameter which correlated with survival following nephrectomy. In contrast, Lin and Cai [12] reported high circEGLN3 expression as a risk factor for shortened survival after nephrectomy. We did not observe any correlation with adverse parameters nor survival with circEGLN3. Knockdown of circEGLN3 resulted in an impaired proliferation, migration, and invasion, and facilitated apoptosis of RCC cells. It was shown that circEGLN3 acts as an oncogene through upregulating IRF7 via sponging miR-1299 in ccRCC [12].

Franz et al. [8] identified increased circNETO2 expression in the small-scaled microarray screening but did not validate this finding in a larger cohort. Our results confirm circNETO2 overexpression in ccRCC. Furthermore, survival analyses demonstrated that circNETO2 was a predictor of progression-free, cancer-specific and overall survival independent from clinicopathological parameters. The diagnostic relevance of circNETO2 may be limited as the diagnostic accuracy was moderate in our study ($AUC = 0.705$); circNETO2 has not been studied in RCC by other researchers so far. In lung cancer cells, circNETO2 expression was not different in normal and cancerous lung tissue [21].

The expression of circSCARB1 [8], circCOL5A1, circSOD2, and circEDEM2 [9] was reported as dysregulated in earlier studies, and we aimed to study these circRNAs in a larger cohort. In contrast to former studies ($n = 99$; $n = 64$), our study was enlarged, and the quantification technique (quantitative real-time PCR) had an increased accuracy compared with microarray analyses. Although we could not confirm a diagnostic relevance for any of these circRNA, they have been associated with oncogenic functions in cancer in former studies: circSCARB1 promoted RCC progression by sequestering miR-510-5p and indirectly up-regulating SDC3 expression [22], and circCOL5A1 acted as a miR-1224-5p sponge, thereby activating CREB1 expression and promoting cellular proliferation in bladder cancer [23]. circSOD2 expression enhanced cancer cell growth, cell migration, cell

cycle progression, and in vivo tumor growth in hepatocellular cancer; circSOD2 inhibited miR-502-5p expression, thereby upregulating DNMT3A expression [24].

We finally addressed circRNA interactions with RNA-binding proteins and miRNAs. We observed that circEHD2, circEGLN3, and circNETO2 had putative binding sites for the RNA-binding protein EIF4A3 at the junction and 5'-flanking sites. EIF4A3 is implicated in cellular processes involving the alteration of RNA secondary structure, such as translation initiation, nuclear and mitochondrial splicing, and ribosome and spliceosome assembly. EIF4A3 binding sites are common in the flanking region of circRNA junctions and may indicate a role of EIF4A3 in circRNA biogenesis [17]. In fact, EIF4A3 induced circMMP9 expression in glioblastoma [25] and circSEPT9 in breast cancer cells [26]. In addition, several putative miRNA target sites are located in circEHD2, circEGLN3, and circNETO2. Thus, these circRNAs may act as miRNA-sponge. We identified 15 (circEHD2), 19 (circNETO2), and 33 (circEGLN3) different miRNAs that had putative binding sites in the circRNAs, and thus these circRNAs may have complex functions on the miRNome of ccRCC.

Some limitations of our study should be acknowledged. The validation cohort included only few patients with distant metastases ($n = 6$) and no patients with lymph node metastases, and thus advanced stages are probably somewhat underrepresented in our cohort. However, cytoreductive nephrectomy is nowadays only indicated in a very small number of patients with metastatic disease, as the CARMENA [27] trial indicated improved outcome in patients undergoing sunitinib therapy without cytoreductive nephrectomy. The lack of metastatic cases in the validation cohort is on the other hand a strength of our study. The survival analyses indicate a prognostic value of circRNA expression in patients undergoing nephrectomy for localized RCC. Thus, the analysis of circRNA expression could aid the clinician to identify patients at increased risk of RCC recurrence after surgery with curative intention and thereby help to personalize therapy. Furthermore, these patients could be of special interest for adjuvant tumor therapy. As the number of patients with metastatic ccRCC was very small, we did not include risk groups (i.e., Heng or Motzer criteria) as a variable in the Cox regression analysis. We have chosen to validate only a limited number of circRNAs ($n = 7$); these circRNAs had in previous studies (circENGL3 [8,12], circCOL5A1 [9], circEHD2 [8], circNETO2 [8], circSCARB1 [8], circSOD2 [9], circEDEM2 [9]) a significant and distinct overexpression in RCC (e.g., >4-fold) and seemed, in our opinion, the most interesting biomarker candidates.

5. Conclusions

circRNAs in ccRCC tissue provide diagnostic and prognostic information: circEGLN3 expression levels allow discrimination of ccRCC and normal renal tissue, and circEHD2 and circNETO2 levels provide independent prognostic information regarding patients' survival following nephrectomy. Thus, circRNAs could help to optimize individual treatment and ultimately improve ccRCC patients' survival.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/2072-6694/13/9/2177/s1, Supplementary Material File S1: Supplementary Information.

Author Contributions: Conceptualization, L.F., J.E.; methodology, L.F., N.K., D.S., A.A.; resources, M.T., G.T., M.R.; writing—original draft preparation, L.F., J.E.; writing—review and editing, N.K., D.S., G.K., M.T., M.R., A.A.; visualization, L.F., J.E.; supervision, A.A., J.E.; project administration, M.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the University Bonn (vote number 347/19, 24.10.2019).

Informed Consent Statement: Written informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The raw PCR data are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: The collection of tissue samples was performed within the framework of the Biobank of the Centre for Integrated Oncology at the University Hospital Bonn.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- Hofmann, F.; Hwang, E.C.; Lam, T.B.; Bex, A.; Yuan, Y.; Marconi, L.S.; Ljungberg, B. Targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2020**, *10*, CD012796, doi:10.1002/14651858.CD012796.pub2.
- Escudier, B.; Porta, C.; Schmidinger, M.; Rioux-Leclercq, N.; Bex, A.; Khoo, V.; Gruenvald, V.; Horwich, A. Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med Oncol.* **2016**, *27*, v58–v68, doi:10.1093/annonc/mdw328.
- Li, W.; Liu, J.Q.; Chen, M.; Xu, J.; Zhu, D. Circular RNA in cancer development and immune regulation. *J. Cell. Mol. Med.* **2020**, doi:10.1111/jcmm.16102.
- Wu, J.; Qi, X.; Liu, L.; Hu, X.; Liu, J.; Yang, J.; Lu, L.; Zhang, Z.; Ma, S.; Li, H.; et al. Emerging Epigenetic Regulation of Circular RNAs in Human Cancer. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2019**, *16*, 589–596, doi:10.1016/j.omtn.2019.04.011.
- Zhou, M.; Xiao, M.S.; Li, Z.; Huang, C. New progresses of circular RNA biology: From nuclear export to degradation. *RNA Biol.* **2020**, *1–9*, doi:10.1080/15476286.2020.1853977.
- Xia, S.; Feng, J.; Lei, L.; Hu, J.; Xia, L.; Wang, J.; Xiang, Y.; Liu, L.; Zhong, S.; Han, L.; et al. Comprehensive characterization of tissue-specific circular RNAs in the human and mouse genomes. *Brief. Bioinform.* **2017**, *18*, 984–992, doi:10.1093/bib/bbw081.
- Xia, S.; Feng, J.; Chen, K.; Ma, Y.; Gong, J.; Cai, F.; Jin, Y.; Gao, Y.; Xia, L.; Chang, H.; et al. CSCD: A database for cancer-specific circular RNAs. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, D925–D929, doi:10.1093/nar/gkx863.
- 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* **2019**, *11*, 1473, doi:10.3390/cancers11101473.
- Lv, Q.; Ma, C.; Li, H.; Tan, X.; Wang, G.; Zhang, Y.; Wang, P. Circular RNA microarray expression profile and potential function of circ0005875 in clear cell renal cell carcinoma. *J. Cancer* **2020**, *11*, 7146–7156, doi:10.7150/jca.48770.
- Zhang, D.; Yang, X.J.; Luo, Q.D.; Fu, D.L.; Li, Z.L.; Zhang, P.; Chong, T. Down-Regulation of Circular RNA_000926 Attenuates Renal Cell Carcinoma Progression through miRNA-411-Dependent CDH2 Inhibition. *Am. J. Pathol.* **2019**, *189*, 2469–2486, doi:10.1016/j.ajpath.2019.06.016.
- Li, W.; Yang, F.Q.; Sun, C.M.; Huang, J.H.; Zhang, H.M.; Li, X.; Wang, G.C.; Zhang, N.; Che, J.P.; Zhang, W.T.; et al. circPRRC2A promotes angiogenesis and metastasis through epithelial-mesenchymal transition and upregulates TRPM3 in renal cell carcinoma. *Theranostics* **2020**, *10*, 4395–4409, doi:10.7150/thno.43239.
- Lin, L.; Cai, J. Circular RNA circ-EGLN3 promotes renal cell carcinoma proliferation and aggressiveness via miR-1299-mediated IRF7 activation. *J. Cell. Biochem.* **2020**, *121*, doi:10.1002/jcb.29620.
- Blondeau, J.J.; Deng, M.; Syring, I.; Schrödter, S.; Schmidt, D.; Perner, S.; Müller, S.C.; Ellinger, J. Identification of novel long non-coding RNAs in clear cell renal cell carcinoma. *Clin. Epigenetics* **2015**, *7*, 10, doi:10.1186/s13148-015-0047-7.
- Strick, A.; von, H.F.; Gundert, L.; Klümper, N.; Tolkach, Y.; Schmidt, D.; Kristiansen, G.; Toma, M.; Ritter, M.; Ellinger, J. The N6-methyladenosine (m6A) erasers alkylolation repair homologue 5 (ALKBH5) and fat mass and obesity-associated protein (FTO) are prognostic biomarkers in patients with clear cell renal carcinoma. *BJU Int.* **2020**, *125*, 617–624, doi:10.1111/bju.15019.
- Ren, H.; Liu, Z.; Liu, S.; Zhou, X.; Wang, H.; Xu, J.; Wang, D.; Yuan, G. Profile and clinical implication of circular RNAs in human papillary thyroid carcinoma. *PeerJ* **2018**, *6*, doi:10.7717/peerj.5363.
- Liu, H.; Hu, Y.; Zhuang, B.; Yin, J.; Chen, X.H.; Wang, J.; Li, M.M.; Xu, J.; Wang, X.Y.; Yu, Z.B.; et al. Differential Expression of CircRNAs in Embryonic Heart Tissue Associated with Ventricular Septal Defect. *Int. J. Med. Sci.* **2018**, *15*, 703–712, doi:10.7150/ijms.21660.
- Dudekula, D.B.; Panda, A.C.; Grammatikakis, I.; De, S.; Abdelmohsen, K.; Gorospe, M. CircInteractome: A web tool for exploring circular RNAs and their interacting proteins and microRNAs. *RNA Biol.* **2016**, *13*, 34–42, doi:10.1080/15476286.2015.1128065.
- Budczies, J.; Klauschen, F.; Sinn, B.V.; Györfy, B.; Schmitt, W.D.; Darb-Esfahani, S.; Denkert, C. Cutoff Finder: A comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e51862, doi:10.1371/journal.pone.0051862.
- 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.
- Wang, Y.; Zhang, Y.; Wang, P.; Fu, X.; Lin, W. Circular RNAs in renal cell carcinoma: Implications for tumorigenesis, diagnosis, and therapy. *Mol. Cancer* **2020**, *19*, 1–10, doi:10.1186/s12943-020-01266-7.
- Xu, L.; Ma, Y.; Zhang, H.; Lu, Q.J.; Yang, L.; Jiang, G.N.; Liao, W.L. HMGA2 regulates circular RNA ASPH to promote tumor growth in lung adenocarcinoma. *Cell Death Dis.* **2020**, *11*, 1–10, doi:10.1038/s41419-020-2726-3.

22. Sun, J.; Pan, S.; Cui, H.; Li, H. CircRNA SCARB1 Promotes Renal Cell Carcinoma Progression via Mir- 510-5p/SDC3 Axis. *Curr. Cancer Drug Targets* **2020**, *20*, 461–470, doi:10.2174/1568009620666200409130032.
23. Zhuang, C.; Huang, X.; Yu, J.; Gui, Y. Circular RNA hsa_circ_0075828 promotes bladder cancer cell proliferation through activation of CREB1. *BMB Rep.* **2020**, *53*, 82–87, doi:10.5483/BMBRep.2020.53.2.059.
24. Zhao, Z.; Song, J.; Tang, B.; Fang, S.; Zhang, D.; Zheng, L.; Wu, F.; Gao, Y.; Chen, C.; Hu, X.; et al. CircSOD2 induced epigenetic alteration drives hepatocellular carcinoma progression through activating JAK2/STAT3 signaling pathway. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2020**, *39*, 1–16, doi:10.1186/s13046-020-01769-7.
25. Wang, R.; Zhang, S.; Chen, X.; Li, N.; Li, J.; Jia, R.; Pan, Y.; Liang, H. EIF4A3-induced circular RNA MMP9 (circMMP9) acts as a sponge of miR-124 and promotes glioblastoma multiforme cell tumorigenesis. *Mol. Cancer* **2018**, *17*, 1–17, doi:10.1186/s12943-018-0911-0.
26. Zheng, X.; Huang, M.; Xing, L.; Yang, R.; Wang, X.; Jiang, R.; Zhang, L.; Chen, J. The circRNA circSEPT9 mediated by E2F1 and EIF4A3 facilitates the carcinogenesis and development of triple-negative breast cancer. *Mol. Cancer* **2020**, *19*, 1–22, doi:10.1186/s12943-020-01183-9.
27. Méjean, A.; Ravaud, A.; Thezenas, S.; Colas, S.; Beauval, J.B.; Bensalah, K.; Geoffrois, L.; Thiery-Vuillemin, A.; Cormier, L.; Lang, H.; et al. Sunitinib Alone or after Nephrectomy in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 417–427, doi:10.1056/NEJMoa1803675

Inhibition testing (Cq dilutions, spike or other)	E	No	
Reverse Transcription			
Complete reaction conditions	E	Yes	Main text: Material and Methods
Amount of RNA and reaction volume	E	Yes	Main text: Material and Methods
Priming oligonucleotide (if using GSP) and concentration	E	Yes	Main text: Material and Methods
Reverse transcriptase and concentration	E	Yes	Main text: Material and Methods
Temperature and time	E	Yes	Main text: Material and Methods
Manufacturer of reagents and catalogue numbers	D	Yes	Main text: Material and Methods
Cqs with and without RT	D	Yes	methodology: negative results
Storage conditions of cDNA	D	Yes	Main text. Materials and Methods; storage at -20°C
qPCR Target Information			
Gene symbols	E	Yes	Main text: Materials and Methods
If multiplex, efficiency and LOD of each assay.	E	No	Not applicable
Sequence accession number	E	Yes	Main text: has_circ_nr.
Location of amplicon	D	Yes	Main text: Materials and Methods
Amplicon length	E	Yes	Main text: Materials and Methods
<i>In silico</i> specificity screen (BLAST, etc)	E	Yes	Main text: Materials and Methods
Pseudogenes, retropseudogenes or other homologs?	D	No	Not applicable
Sequence alignment	D	Yes	Main text: Materials and Methods
Secondary structure analysis of amplicon	D	No	Not applicable
Location of each primer by exon or intron (if applicable)	E	Yes	Supplementary Information S1: the self-designed primers by Circinteractome
What splice variants are targeted?	E	Yes	only one splice variant
qPCR Oligonucleotides			
Primer sequences	E	Yes	Main text: Materials and Methods (self-designed primers by Circinteractome)
RTPrimerDB Identification Number	D	No	Not applicable
Probe sequences	D	No	Not applicable
Location and identity of any modifications	E	No	Not applicable
Manufacturer of oligonucleotides	D	Yes	Thermo Fisher Scientific
Purification method	D	Yes	desalted
qPCR Protocol			
Complete reaction conditions	E	Yes	Main text: Materials and Methods.
Reaction volume and amount of cDNA/DNA	E	Yes	Main text: Materials and Methods.
Primer, (probe), Mg ⁺⁺ and dNTP concentrations	E	Yes	Main text: Materials and Methods.
Polymerase identity and concentration	E	Yes	Main text: Materials and Methods.
Buffer/kit identity and manufacturer	E	Yes	Main text: Materials and Methods.
Exact chemical constitution of the buffer	D	Yes	Kit Takara Nr. RR037A

Additives (SYBR Green I, DMSO, etc.)	E	Yes	Main text: Materials and Methods.
Manufacturer of plates/tubes and catalogue number	D	Yes	384 Well PCR plate (Thermo Fisher 732-4961)
Complete thermocycling parameters	E	Yes	Main text: Materials and Methods
Reaction setup (manual/robotic)	D	Yes	Manual setup Main text: Materials and Methods: QuantStudio
Manufacturer of qPCR instrument	E	Yes	5 Real-Time PCR System; Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific
qPCR Validation			
Evidence of optimisation	D	Yes	Melt Curve Plot analysis
Specificity (gel, sequence, melt, or digest)	E	Yes	Gel electrophoresis
For SYBR Green I, Cq of the NTC	E	Yes	undetermined
Standard curves with slope and y-intercept	E	Yes	Calculated by QS5 software
PCR efficiency calculated from slope	E	Yes	Main text: Materials and Methods.
Confidence interval for PCR efficiency or standard error	D	Yes	95
r2 of standard curve	E	Yes	Calculated by QS5 software
Linear dynamic range	E	Yes	Standard curve dilution
Cq variation at lower limit	E	Yes	
Confidence intervals throughout range	D	No	
Evidence for limit of detection	E	No	
If multiplex, efficiency and LOD of each assay.	E	Not applicable	
Data Analysis			
qPCR analysis program (source, version)	E	Yes	Main text: Materials and Methods (ThermoFisher Cloud 2.0)
Cq method determination	E	Yes	QS5 standard analysis settings
Outlier identification and disposition	E	Not applicable	
Results of NTCs	E	Yes	Main text: Materials and Methods.
Justification of number and choice of reference genes	E	Yes	Main text: Materials and Methods.
Description of normalisation method	E	Yes	Main text: Materials and Methods.
Number and concordance of biological replicates	D	No	Not applicable
Number and stage (RT or qPCR) of technical replicates	E	Yes	triplicates
Repeatability (intra-assay variation)	E	Yes	Inter-calibration settings -> positive control
Reproducibility (inter-assay variation, %CV)	D	No	
Power analysis	D	No	
Statistical methods for result significance	E	Yes	Main text: Materials and Methods: Statistics and Data Analysis.
Software (source, version)	E	Yes	Main text: Materials and Methods: Statistics and Data Analysis.
Cq or raw data submission using RDML	D	No	Available upon request

3. Danksagung

Bedanken möchte ich mich ganz herzlich für die exzellente Betreuung meiner Doktorarbeit. Besonders möchte ich hier meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Jörg Ellinger und Frau Doris Schmidt für ihre vielfältige und konstruktive Unterstützung danken.

Meiner Familie, meinen Freunden und Freundinnen, die mich in dieser Zeit begleitet haben, gilt ebenso mein Dank. Hier möchte ich Rebecca Schweiger besonders hervorheben.