

# **$N^6$ -Methyladenosin ( $m^6A$ )-Reader sind im klarzelligen Nierenzellkarzinom dysreguliert**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Felix von Hagen**

aus Bonn

2023

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Jörg Ellinger
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Peter Brossart

Tag der Mündlichen Prüfung: 27.10.2022

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

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>4</b>
<b>1.</b>	<b>Deutsche Zusammenfassung</b>	<b>6</b>
1.1	Einleitung	6
1.2	Material und Methoden	12
1.3	Ergebnisse	15
1.4	Diskussion	17
1.5	Zusammenfassung	23
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	24
<b>2.</b>	<b>Veröffentlichung</b>	<b>31</b>
	Abstract	31
	Introduction	32
	Materials and Methods	32
	Results	34
	Discussion	36
	Conclusion	37
	References	37
<b>3.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>40</b>

## Abkürzungsverzeichnis

3'UTRs	3'-untranslated region
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AKT/GSK3beta/cyclin D1	Protein kinase B/glycogen synthase kinase 3 beta/cyclinD1
ALKBH5	Alkylation repair homolog 5
BRD4	Bromodomain-containing protein 4
EGFR	Epidermal growth factor receptor
FTO	fat mass and obesity associated protein
GAS5	Growth arrest specific 1
HIF- $\alpha$	Hypoxia-induced factor 1, $\alpha$ -subunit
HNRNPA2B1 /-C /-G	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 / C /G
IGF2BP1-3	Insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 1 / 2 / 3
KIAA1429 (VIRMA)	Vir like m6A methyltransferase associated
METTL3 /-4 /-14 /-16	Methyltransferase like 3 / 4 / 14 / 16
MYC	Myelocytomatose-oncogene
PCR	Polymerase chain reaction
PD-L1	Programmed cell death 1 ligand 1
RBM15	RNA-binding protein 15
RBMX	RNA binding motif protein X-linked
SOCS2	suppressor of cytokine signaling 2
WTAP	Wilms tumor 1 associated protein
YAP	Yes 1 associated protein 1
YTHDC1 /-2	YTH-domain-containing protein 1 / 2

YTHDF1 /-2 /-3

YTH-domain-containing family protein 1 / 2 / 3

ZC3H13

Zink finger CCCH-type containing 13

# 1. Deutsche Zusammenfassung

## 1.1 Einleitung

### 1.1.1 Nierenkarzinome

Nierenkarzinome sind weltweit eine der häufigsten Krebsentitäten, sowohl bei Männern, als auch bei Frauen. So schätzte die American Cancer Society für das Jahr 2019 73.820 neue Fälle von Nierenkarzinomen und 14.770 Todesfälle. Das bedeutet, dass es sich bei Männern jährlich bei 5 % aller neuen Krebserkrankungen um Nierenkarzinome handelt, bei Frauen bei 3 %. Somit waren Nierenkarzinome bei Männern die sechsthäufigste, bei Frauen die achthäufigste neue Krebserkrankung im Jahre 2019 (Siegel et al., 2019). Weltweit gehen die Schätzungen von etwa 270.000 jährlichen Neuerkrankungen aus (Stukalin et al., 2016). Unter allen Nierenkarzinomen ist das Nierenzellkarzinom (Renal Cell Carcinoma, RCC) mit etwa 90 % das mit großem Abstand Häufigste (Stukalin et al., 2016) und darüber hinaus die am häufigsten zum Tode führende Krebserkrankung des Urogenitaltrakts (Zhou et al., 2019). Innerhalb der Nierenzellkarzinome wiederum ist das klarzellige Nierenzellkarzinom (clear cell RCC (ccRCC)) mit etwa 80 % der häufigste Subtyp. Besonders das metastasierte Nierenzellkarzinom wird durch seine jährlich etwa um 2 % steigende Inzidenz zu einem immer größer werdenden Problem (Stukalin et al., 2016), die Mortalität von Nierenzellkarzinomen erhöht sich jährlich um 1,5 bis 5,9 % (Li et al., 2019b). 25 bis 30 % aller Patienten mit RCC stellen sich bereits initial mit metastasiertem Nierenzellkarzinom vor und etwa 30 % der behandelten Patienten mit lokalem RCC erleben ein Rezidiv (Stukalin et al., 2016).

Der Goldstandard zur Behandlung von nicht-metastasierten Nierenzellkarzinomen besteht nach wie vor aus kurativer partieller oder radikaler Nephrektomie, Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom werden in der Regel systemisch mit palliativer Intention behandelt (Rini et al., 2009; Ellinger et al., 2016). Ein entscheidender Fortschritt in der Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms war die Entwicklung von Immuntherapien und Targeted Drugs, doch Resistenzen gegenüber Medikamenten und

Bestrahlung stellen in der klinischen Praxis nach wie vor große Probleme dar (Wang et al., 2020; Shih et al., 2011; Rini et al., 2009), weshalb das mittlere Überleben von Patienten mit metastasiertem RCC immer noch unter 3 Jahren liegt (Greef und Eisen, 2016). All dies sind Gründe, wieso die weitere Erforschung der Pathogenese des ccRCC und die Erschließung neuer therapeutischer Ziele so wichtige und dringliche Vorhaben sind (Wang et al., 2020). Durch weitere Erforschung von Therapien, die spezifische und relevante, biologische Pathways der Karzinogenese zum Ziel haben, könnten weitere therapeutische Ansätze erschlossen werden (Ellinger et al., 2016; Rini et al., 2009).

Da  $N^6$ -Methyladenosin ( $m^6A$ ) eine wichtige Rolle in Entstehung und Progression des ccRCC (Wang et al., 2020) und vielen weiteren Krebsarten spielt, könnte  $m^6A$  eine wichtige Rolle in der Diagnostik, Prognostik und Therapie gerade des metastasierten ccRCC einnehmen. So könnte es als Tumormarker dienen, weitere Informationen zur individuellen Prognose geben und als Ziel für innovative Krebstherapien dienen.

### 1.1.2 $N^6$ -Methyladenosin ( $m^6A$ )

#### 1.1.2.1 Einführung

$m^6A$  ist eine RNA-Modifikation, welche eine elementare Rolle in fast allen zellulären Prozessen (Cao et al., 2016) und Stadien des mRNA-Metabolismus (Zhao et al., 2017), sowie der Entstehung und Progression von Krebs (Li et al., 2019b) und zahlreichen anderen Krankheiten spielt. Es ist die häufigste mRNA-Modifikation bei Säugetieren (Fu et al., 2014), so sind etwa 0,1 bis 0,4 % aller Adenosinrückstände methyliert (Zhou et al., 2019) und es ist genomweit in etwa 25 % aller Transkripte vorhanden (Lan et al., 2019). Es ist im ganzen Transkriptom zahlreich vertreten, so findet es sich in der mRNA von über 7600 Genen und über 300 nichtcodierenden, sogenannten „noncoding RNAs“ (Zhou et al., 2019). Das „Epitranskriptom“, also die posttranslationale Modifikation von mRNA, entwickelte sich in den letzten Jahren zu einem sehr wichtigen Feld der Biowissenschaften, zu dem weltweit eine große Anzahl an Studien entstand (Niu et al., 2018), denn man weiß, dass es eine wichtige Rolle in zahlreichen biologischen und pathologischen Abläufen, vor allem in der Entstehung von Krebs, spielt (Davalos et al., 2018).

m<sup>6</sup>A wurde bereits in den 1970er-Jahren entdeckt. Die genauen Mechanismen der Regulation konnten allerdings erst vor wenigen Jahren identifiziert werden. Die entscheidende Entdeckung dabei war die Identifizierung von FTO als Demethylase oder „Eraser“ der m<sup>6</sup>A-Modifikation (s.u.) (Deng et al., 2017). Ein weiterer Meilenstein in der Forschung zu m<sup>6</sup>A waren die Entwicklungen von transkriptomweiten Sequenzierungen wie *m<sup>6</sup>A-sequencing* (m<sup>6</sup>A-seq), *combined m<sup>6</sup>A-specific methylated RNA immunoprecipitation with next generation sequencing* (MeRIP-seq), *m<sup>6</sup>A-level and isoform characterization sequencing* (m<sup>6</sup>A-LAIC-seq) (Zhao et al., 2020a) und Weiterer. Mithilfe dieser neuen Techniken konnte gezeigt werden, dass die m<sup>6</sup>A-Modifikation ein reversibler und dynamischer Prozess ist, der mehr als 7600 Gene mit 12.000 m<sup>6</sup>A-Stellen beeinflusst (Zhou et al., 2019; Ma et al., 2019). m<sup>6</sup>A ist evolutionär stark konserviert (Lan et al., 2019) und tritt vor allem an den RRm<sup>6</sup>ACH-Sequenzen (R = A, G, oder U; R = A oder G; und H = A, C, oder U) auf (Zhao et al., 2017). Besonders hohe Konzentrationen findet man in 3'UTRs, um Stoppcodone und in langen internen Exons (Zhao et al., 2017). Darüber hinaus findet man es in precursor mRNAs (pre-RNAs) und long noncoding RNAs (lnc-RNAs) (Sun et al., 2019).

Die m<sup>6</sup>A-Modifikation wird auf dynamische Art von drei Gruppen von Proteinen reguliert. Durch Methylasen, auch „Writer“ genannt, wird die Bindung der Methylgruppe katalysiert. Besonders hervorzuheben ist hier der *m<sup>6</sup>A methyltransferase complex* (MTC), bestehend aus METTL3, METTL14 und WTAP, doch auch andere Proteine wie METTL4 und -16, ZC3H13, KIAA1429 und RBM15 funktionieren als Writer (Deng et al., 2017; Zhao et al., 2020b). Die Abspaltung der Methylgruppe wird durch Demethylasen oder „Eraser“ unterstützt, bisher sind FTO und ALKBH5 bekannt (Deng et al., 2017). Verschiedene spezifische, m<sup>6</sup>A-bindende Proteine, „Reader“ genannt, erkennen die Methylgruppe und übersetzen sie in verschiedenste biologische Signale und Prozesse (Zhou et al., 2019). Bisher sind einige Reader identifiziert worden: YTHDC1 und -2, YTHDF1, -2 und -3, eIF3, HNRNPA2B1, HNRNPC, HNRNPG, RBMX und IGF2BP1, -2 und -3 (Liu et al., 2020a; Liang et al., 2020; Zheng et al., 2020). Diese Reader sind Gegenstand dieser Arbeit, wir untersuchten die 6 Reader HNRNPA2B1, HNRNPC, YTHDC1 und YTHDF1-3.



### 1.1.2.2 Funktionen von m<sup>6</sup>A

m<sup>6</sup>A ist involviert in den kompletten mRNA-Metabolismus und beeinflusst viele wesentliche Aspekte, wie beispielsweise RNA-Prozessierung, Transport der RNA vom Nukleus ins Zytoplasma und RNA-Translation, -Abbau und -Splicing (Dai et al., 2018). Darüber hinaus reguliert es die Sekundärstruktur der RNA (Niu et al., 2018). Weiterhin steuert es den Metabolismus von verschiedenen noncoding-RNAs wie long-noncoding RNAs (lnc-RNAs), microRNA (miRNA) und zirkulären RNAs (circRNAs) (Dai et al., 2018; Ma et al., 2019). Auf diesem Wege nimmt m<sup>6</sup>A eine wichtige regulatorische Rolle in zahlreichen entscheidenden zellulären Prozessen wie Genexpression, Meiose, zirkadianem Rhythmus, (Cao et al., 2016) zellulären Stressantworten (Zhang et al., 2016) Stammzellenrenewierung, Antworten auf DNA-Schädigung, sowie in Tumorigenese und Neurogenese ein (Zheng et al., 2020).

Die Kontrolle der mRNA-Translation in eukaryotischen Zellen ist entscheidend, um die Dauer und Quantität der Genexpression zu steuern (Wang et al., 2015). Aufgrund ihrer dynamischen Natur hat die posttranskriptionelle Regulierung einige Vorteile gegenüber der transkriptionellen mRNA-Regulierung, denn sie kann deutlich schneller auf Stimuli reagieren, kann eine Feinabstimmung der Proteinmengen bewirken und lokalisierte Kontrolle gewährleisten (Moore, 2005). Dies erlangt besondere Bedeutung bei der Entwicklung und Differenzierung von Zellen, wenn das stadiumsspezifische Transkriptom schnell verändert werden muss, um eine neue Identität zu entwickeln oder während Stresssituationen wie extremen Temperaturen, Sauerstoff- oder Nährstoffmangel und der Exposition von Giften (Zhang et al., 2016).

### 1.1.2.3 m<sup>6</sup>A und Krankheiten

m<sup>6</sup>A spielt eine essentielle Rolle in der Entstehung und Entwicklung von Krebs (Li et al., 2018) sowie weiteren Erkrankungen (Cao et al., 2016).

In den letzten Jahren hat sich das Verständnis von m<sup>6</sup>A und seiner Rolle bei Krebserkrankungen stark gemehrt. Diese neuen Informationen besitzen wesentliche klinische Relevanz, denn die m<sup>6</sup>A-Modifikation spielt eine wichtige Rolle in der Biologie

von Karzinomen und zahlreiche m<sup>6</sup>A-Regulatorproteine korrelieren nachgewiesenermaßen mit der Prognose und dem klinischen Outcome von Krebspatienten. All dies sind Gründe für die Relevanz der m<sup>6</sup>A-Modifikation und der Grund dafür, dass m<sup>6</sup>A großes Potenzial in der Entwicklung neuartiger Krebstherapien besitzt (Liang et al., 2020). Auch die Biologie der RNA als solche erhält in der Biowissenschaft immer größere Relevanz und Aufmerksamkeit (Dai et al., 2018). Besonders die Epigenetik von RNAs entwickelte sich zu einem wichtigen Forschungsfeld, das wichtige Neuerungen in Therapie verschiedener Krankheiten des Menschen verspricht (Cui et al., 2017). Als häufigste mRNA-Modifikation erhielt m<sup>6</sup>A somit in den letzten Jahren viel Beachtung, (Zheng et al., 2020) aus der eine Vielzahl an Studien entstand (Niu et al., 2018).

Es ist bekannt, dass m<sup>6</sup>A eine essentielle Rolle in der Entstehung vieler verschiedener Krebsentitäten, wie Mammakarzinomen (Zheng et al., 2020), malignen hämatologischen Erkrankungen (Zhou et al., 2019) - besonders gut erforscht bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) (Zheng et al., 2020) - hepatozellulären Karzinomen (HCC) (Zheng et al., 2020), Glioblastomen (Zheng et al., 2020), Pankreaskarzinomen (Taketo et al., 2018), kolorektalen Karzinomen (CRC) (Nishizawa et al., 2018) und vielen weiteren spielt. Darüber hinaus könnte es in diversen Krebsentitäten als therapeutisches Ziel genutzt werden, beispielsweise bei Glioblastomen (Cui et al., 2017) und der AML (Sun et al., 2019).

Es gibt zahlreiche Wege, auf denen m<sup>6</sup>A Tumorentstehung beeinflusst: Besonders stark beeinflusst m<sup>6</sup>A die Tumorigenese, indem es die Expression von Genen, die entscheidend für die Biologie von Krebserkrankungen sind, also von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, verändert. Diese Veränderungen haben eine besondere Signifikanz, da die Dysregulation der Genexpression einer der Schlüsselmechanismen in der Entstehung von Krebs ist (Jaffrey und Kharas, 2017). Die Veränderungen der Genexpression kommen dadurch zustande, dass in Karzinomen die m<sup>6</sup>A-regulierenden Proteine, sprich Writer, Eraser und Reader und somit die m<sup>6</sup>A-Konzentration häufig dysreguliert sind (Zheng et al., 2020). Diese Dysregulation beeinflusst durch den Effekt auf die Genexpression zahlreiche zelluläre Prozesse und kann unter Anderem zu verminderter Zellproliferation, beeinträchtigter Selbsterneuerungskapazität, Entwicklungsfehlern und Zelltod führen (Zhou et al., 2019), was wiederum auch

verschiedene Krankheiten wie Übergewicht, Infertilität und Wachstumsretardierung zur Folge hat (Cao et al., 2016). Darüber hinaus fördert sie insbesondere die Initiation und Progression von Krebserkrankungen (Zheng et al., 2020), da sie auch entscheidend für Proliferation, Migration und Invasion von Krebszellen verantwortlich ist (Liu et al., 2020a). Darüber hinaus konnte bewiesen werden, dass die m<sup>6</sup>A-Konzentration in zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) signifikant dysreguliert ist, was auch auf einen Beitrag zur Metastasierung schließen lässt (Ma et al., 2019).

Das m<sup>6</sup>A-Level korreliert signifikant mit der Aktivität vieler, wichtiger Signalwege oder Pathways der Tumorentstehung (Li et al., 2019b) wie beispielsweise BRD4, MYC, SOCS2 oder EGFR (He et al., 2019), indem es die mRNA-Expression sowohl von Onkogenen, als auch von Tumorsuppressorgenen reguliert (Zhao et al., 2020a) und somit Krebsentstehung entweder fördern oder hemmen kann. Im klarzelligen Nierenzellkarzinom beispielsweise, beeinflusst m<sup>6</sup>A laut Zhou et al. (2019) den VHL-gesteuerten Hypoxie-Pathway und p53-vermittelte Zellprozesse, welche synergistisch Pathogenese und Progress von ccRCCs befördern, welche schlechtere klinische Parameter und ein kürzeres Überleben zur Folge haben.

Diese Dysregulationen von m<sup>6</sup>A-regulierenden Proteinen und den entsprechenden Genen könnten somit als potentielle Marker zur molekularen Tumordiagnostik und -prognostik dienen und neue Ziele in der Erforschung und Entwicklung neuartiger molekularer „targeted therapies“ bieten.

Eine weitere Einflussnahme von m<sup>6</sup>A auf Krebsentstehung ist die Tatsache, dass alternatives Splicing von pre-mRNA häufig in Tumoren zu finden ist und diese von m<sup>6</sup>A reguliert wird (Dai et al., 2018). Auch die Regulierung von anderen RNA-Arten wie miRNA und lnc-RNA beeinflusst Tumorigenese (Dai et al., 2018). Darüber hinaus ist m<sup>6</sup>A an der Selbsterneuerung von Krebsstammzellen und der Entstehung von Resistenzen gegen Bestrahlung und Chemotherapien beteiligt (Dai et al., 2018).

2019 konnten Zhou et al. (2019) zum erstem Mal zeigen, dass Dysregulationen der m<sup>6</sup>A-modifizierenden Proteine die Prognose von Patienten mit ccRCC signifikant verändern. Das m<sup>6</sup>A-Level im ccRCC war herunterreguliert, so wie man es beispielweise schon in Brustkrebs oder Glioblastomen nachweisen konnte. Diese Herunterregulation führte zu

einer schlechteren Prognose und schlechteren klinischen Parametern. Zheng et al. (2020) und Wang et al. (2020) konnten aufzeigen, dass viele m<sup>6</sup>A-regulierende Proteine in klarzelligen Nierenzellkarzinomen dysreguliert sind, was nahelegt, dass diese eine große Rolle in der Entstehung von ccRCCs spielen. Darüber hinaus konnten sie, ähnlich zu Zhao et al. (2020c) ein m<sup>6</sup>A-bezogenes Risikoprofil als prognostisches Werkzeug bei Patienten mit ccRCC entwickeln, was auch das prognostische Potential von m<sup>6</sup>A weiter unterstreicht. Außerdem wurde deutlich gemacht, dass die Expressionslevel der m<sup>6</sup>A-regulierenden Proteine als Biomarker zur Unterscheidung einzelner RCC-Subtypen dienen könnten (Zheng et al., 2020).

Aufgrund der Relevanz von m<sup>6</sup>A und ihrer regulierenden Proteine in der Entstehung von Krebs im Allgemeinen und von ccRCC im Speziellen, untersuchten wir in dieser Studie die 6 Reader HNRNPA2B1, HNRNPC, YTHDC1 und YTHDF1-3 auf mRNA- und Proteinebene auf eine mögliche Dysregulation und die Folgen, die eine Solche auf Prognose und klinisch-pathologische Parameter hat. Als direkte, ausführende Proteine der m<sup>6</sup>A-regulierten Prozesse vermuten Zhao et al. (2020b), dass gerade die Reader eine besonders wichtige Rolle in der Entstehung von Tumoren spielen.

## 1.2 Material und Methoden

### 1.2.1 Patienten

Die Gewebeproben wurden von der Biobank des Centrums für Integrierte Onkologie (CIO) Köln-Bonn gesammelt. Alle Patienten wurden in der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie radikal oder partiell nephrektomiert. Alle Patienten gaben eine informierte schriftliche Einwilligung zur Sammlung des biologischen Materials. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Bonn unter der Nummer 127/17 anerkannt.

Frisch gefrorenes ccRCC- und korrespondierendes gesundes Nierengewebe wurde bei -80 °C aufbewahrt und für die Versuche auf mRNA-Ebene genutzt. Für die Immunhistochemie wurden archiviertes, formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe in Form eines TMA (Tissue Multiarray) genutzt. Alle Gewebeproben wurden von einem Uropathologen erneut untersucht und gemäß der WHO-Klassifikation von 2009

beurteilt. Die klinisch-pathologischen Daten sind in der Tabelle S1 des Anhangs der Originalpublikation zu finden.

### 1.2.2 Quantitative Echtzeit-PCR

Die RNA-Isolation wurde in einer vorangegangenen Publikation detailliert erläutert (Deng et al., 2015). Zusammenfassend wurde zunächst das Gefriergewebe auf flüssigem Stickstoff gekühlt in etwa 50 mg schwere Stücke geschnitten und anschließend mittels Yttrium-stabilisierten Zirkonoxid-Beads (*Silibeads*, Sigmund-Lindner, Warmensteinach, Deutschland) im *Precellys24 Tissue Homogenizer* (Peglab, Erlangen, Deutschland) homogenisiert. Anschließend nutzten wir das *mirVana miRNA Isolation Kit* (Ambion, Foster City, CA, USA), um Gesamt-RNA aus dem Gefriergewebe zu isolieren. Diese wurde mit DNase (Ambion) behandelt, um sie von verbliebenen DNA-Resten zu reinigen. Der RNA-Gehalt wurde mithilfe eines *NanoDrop 2000 Spektrophometers* (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) bestimmt und die RNA-Integrität wurde durch Evaluation der ribosomalen 28S- und 18S-Banden in einer Gelelektrophorese überprüft.

Die Genexpression von HNRNPA2B1, HNRNPC, YTHDC1 und YTHDF1-3 wurde mithilfe einer quantitativen Echtzeit-PCR gemessen. Die benötigte komplementäre DNA (cDNA) wurde mittels des *PrimeScript RT Reagent Kits mit genomischem DNA (gDNA)-Eraser* (Takara Bio, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) aus 1 µg der Gesamt-RNA gewonnen. Für die PCR-Experimente nutzten wir 2,5 ng/µl cDNA-Templates, *SYBR Premix Ex Taq II* und den Farbstoff *Rox Plus* und je 10 pmol/µl Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer auf einem *QuantStudio™* (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Die relativen Expressionslevel wurden mithilfe der *QuantStudio 3D AnalysisSuite Cloud Software* (Applied Biosystems) bestimmt. Als Vergleichswert der Genexpression wurden die jeweiligen Genexpressionen ins Verhältnis zu den Expressionen von Beta-Actin (ACTB), Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Peptidylprolyl-Isomerase A (PPIA) gesetzt, wie in einer vorherigen Publikation beschrieben (Ellinger et al., 2015). Die Primersequenzen sind in der Tabelle S2 im Anhang der Originalpublikation aufgeführt.

### 1.2.3 Immunhistochemie (IHC)

Um die Ergebnisse auf Proteinebene zu bestätigen, wurden die Expressionen der sechs Reader mittels einer Immunhistochemie untersucht. Mithilfe eines Tissue Microarray (TMA) evaluierten wir die Expressionslevel in Gewebe aus verschiedenen Nierenzellkarzinomen: aus ccRCC, papillärem RCC (pRCC), chromophobem RCC (chRCC), sarkomatoidem RCC (sRCC) und Onkozytomen sowie aus gesundem Nierengewebe, wie bereits von Schrödter et al. (2016) beschrieben. Formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes, archiviertes Gewebe, in 5 µm Dicke geschnitten, wurde zur Expansion für 45 Minuten in ein Wasserbad bei 45 °C gegeben, anschließend auf Objektträger überführt, und für 60 Minuten bei 65 °C getrocknet. Danach wurden die Objektträger im *Benchmark Ultra System* (Ventana Medical Systems, Illkirch, Frankreich) behandelt, mithilfe wessen sie deparaffinisiert, mit zellkonditionierendem Puffer (CC1-Puffer, pH 8) vorbehandelt und anschließend mit den primären Antikörpern (HNRNPA2B1: 1:110; HNRNPC: 1:100; YTHDC1: 1:350; YTHDF1: 1:100; YTHDF2: 1:100; YTHDF3: 1:1000) bei 37 °C für 36 Minuten inkubiert wurden. Die Signalstärke wurde mit der *HRP Multimer Technology des UltraView DAB IHC Detection Kits* (Ventana) gemessen. Abschließend wurden die Gewebeschnitte mit Hämalaunlösung sauer nach Mayer (Ventana) gegengefärbt. Die Farbintensitäten wurden quantitativ mithilfe der *QuPath* Software gemessen (Bankhead et al., 2017). Die klinisch-pathologischen Daten der IHC-Kohorte sind in der Tabelle S3 im Anhang der Originalpublikation aufgeführt.

### 1.2.4 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen (t-Test, Mann-Whitney-U-Test, Kruskal-Wallis-Test, uni- und multivariate Cox-Regressionsanalysen, Kaplan-Meier-Analysen und Spearman-Korrelation) wurden mit dem *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS ®)*, Version 26/27 (SPSS Inc., IBM Corp., Armonk, NY, USA) durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde ab  $p < 0.05$  angenommen.

## 1.3 Ergebnisse

### 1.3.1 mRNA-Expression

Die Genexpression der sechs Reader wurde in 166 ccRCC- und 102 Normalgeweben untersucht. Die klinischen Parameter dieser PCR-Kohorte sind in Tabelle S1 im Anhang der Originalpublikation zu finden. Die Expressionslevel aller 6 Gene war im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe signifikant herunterreguliert ( $p$  jeweils  $<0.001$ ) (Abb. 1 der Originalpublikation). Auch die Spearman-Korrelation zeigte darüber hinaus eine signifikante Korrelation zwischen allen sechs Readern (Tabelle S4 im Anhang der Originalpublikation). Darüber hinaus korrelierte die Herunterregulation aller Reader mit einem erhöhten M-Stadium bei ccRCC-Patienten ( $p$  jeweils  $<0,05$ ) (siehe Abbildung S1 im Anhang der Originalpublikation). Korrelationen mit anderen klinischen Parametern konnten nicht gefunden werden (Tabelle S3 im Anhang der Originalpublikation). Die prognostische Relevanz der Dysregulation wurde mithilfe von Kaplan-Meier-Analysen untersucht. Für YTHDC1 und YTHDF3 konnte eine Korrelation mit verkürztem Gesamt-, progressionsfreiem und krebsspezifischem Überleben festgestellt werden (YTHDC1: Overall Survival (OS): log-rank  $p = 0,004$ ; Progression-Free Survival (PFS): log-rank  $p = 0,031$ ; Cancer-Specific Survival (CSS): log-rank  $p = 0,037$ ) (Abb. 2 der Originalpublikation) (YTHDF1: OS: log-rank  $p = 0,008$ ; PFS: log-rank  $p = <0,001$ ; CSS: log-rank  $p = 0,007$ ) (Abb. 2 der Originalpublikation) Darüber hinaus korrelierte YTHDF1 mit einem kürzeren Gesamtüberleben (OSS: log-rank  $p = 0,035$ ) (Abb. 2 der Originalpublikation). Univariate Cox-Analysen bestätigten die Ergebnisse der Kaplan-Meier-Analysen ( $p$  jeweils  $<0,05$ ) und zeigten somit ebenfalls den prognostischen Wert der m<sup>6</sup>A-Reader bei Patienten mit ccRCC. Darüber hinaus konnten wir in der univariaten Cox-Analyse eine Korrelation von klinisch-pathologischen Daten wie Grading (G1/2 vs. G3/4), pT-Stadium (pT1/2 vs. 3/4), pN-Stadium (pNX/0 vs. pN+) und M-Stadium (pM+ vs. pM1) mit dem Überleben (OSS, PFS, CSS) feststellen (mit Ausnahme des pN-Stadiums bezogen auf PFS). In der multivariaten Cox-Analyse konnten diese prädiktiven Aussagen nicht beobachtet werden (siehe Tabellen S6a-c im Anhang der Originalpublikation). Um die Ergebnisse noch weiter zu validieren, glichen wir unsere Ergebnisse mit den Daten aus der KIRC (Kidney Renal Clear Cell Carcinoma)-TCGA-Datenbank ab, wodurch unsere Ergebnisse teilweise bestätigt werden konnten: HNRNPA2B1 ( $p <0,01$ ), YTHDF2

( $p = 0,01$ ) und YTHDF3 ( $p < 0,01$ ) sind laut der TCGA-Datenbank wie in unseren Ergebnissen herunterreguliert (Abbildung S2 im Anhang der Originalpublikation). Die anderen Gene waren allerdings nicht dysreguliert. Auch die Überlebensanalysen validierten wir mit der TCGA-Datenbank, dafür erstellten wir Kaplan-Meier-Analysen mithilfe der *GEPIA*-Website. Es zeigte sich, dass die meisten untersuchten Gene mit einem kürzeren Überleben korrelierten, so waren HNRNPC ( $p = 0,02$ ), YTHDC1 ( $p < 0,01$ ), YTHDF1 ( $p = 0,03$ ), YTHDF2 ( $p < 0,01$ ) und YTHDF3 ( $p < 0,01$ ) mit einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert und YTHDC1 ( $p < 0,01$ ), YTHDF1 ( $p < 0,01$ ), YTHDF2 ( $p = 0,01$ ) und YTHDF3 ( $p = 0,03$ ) außerdem mit einem verkürzten PFS (Abb. S3 im Anhang der Originalpublikation).

### 1.3.2. Protein-Expression

Die immunhistochemische Färbung wurde mit einem TMA (Tissue Microarray) durchgeführt, welcher 154 ccRCC-, 35 pRCC-, 14 sRCC-, 10 Onkozytom- und 30 Normalnierengewebe enthielt. Die klinisch-pathologischen Daten dieser Kohorte sind im Anhang der Originalpublikation in Tabelle S5 aufgeführt, exemplarische Bilder in Abbildung S4 ebendort. Die Bestimmung der Proteinexpression unterstützte zu großen Teilen unsere Ergebnisse aus der Auswertung der mRNA-Expression, so waren mit Ausnahme von YTHDF3 alle Gene im ccRCC dysreguliert. HNRNPC und YTHDF2 waren jedoch im Gegensatz zum mRNA-Level hochreguliert, alle anderen Gene waren wie erwartet herunterreguliert (HNRNPA2B1, YTHDC1 und YTHDF:  $p = < 0,001$ ; YTHDF1:  $p = 0,001$ ) (Abb. 3 der Originalpublikation). Bezüglich der Herunterregulation von YTHDF2 fanden wir eine Korrelation mit einem niedrigeren Grading, was mit der speziellen Rolle, die YTHDF2 in der Entstehung von diversen Krebsentitäten spielt (s.u.) erklärt werden könnte. In den Kaplan-Meier-Analysen zeigte sich ein kürzeres PFS bezüglich der Dysregulation von YTHDC1 (log-rank  $p = 0,036$ ) (Abb. 4 der Originalpublikation). Die univariate Cox-Analyse bestätigte diese prognostische Aussage, darüber hinaus stellten wir eine Korrelation zwischen niedrigeren YTHDC1-Levels und einem kürzeren CSS fest. Auch hier konnten wir teilweise eine Korrelation zwischen fortgeschrittenen klinisch-pathologischen Daten (Grading (G1/2 vs. G3/4), pT-Stadium (pT1/2 vs. 3/4), pN-Stadium (pNX/0 vs. pN+) und M-Stadium (pM+ vs. pM1)) und Überleben (OS, PFS, CSS)



feststellen (Grading und pM-Stadium korrelierten mit OS, PFS und CSS, das pT-Stadium korrelierte mit PFS und CS,  $p$  jeweils  $<0,05$ ). In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse konnten diese Beobachtungen jedoch nicht bestätigt werden (siehe Tabelle S6d-f im Anhang der Originalpublikation). Bei den anderen RCC-Subtypen waren fast alle Gene signifikant dysreguliert (siehe Tabelle S7 im Anhang der Originalpublikation). Im pRCC waren alle Proteine hochreguliert ( $p$  jeweils  $<0,05$ ) (Abb. 3 der Originalpublikation), im chRCC waren HNRNPC und YTHDF1-3 hochreguliert ( $p$  jeweils  $<0,01$ ) (Abb. 3 der Originalpublikation). Im sRCC war die Dysregulation komplexer: HNRNPC, YTHDF2 und -3 waren im Gegensatz zu Normalgewebe hoch-, YTHDC1 und YTHDF1 herunterreguliert ( $p$  jeweils  $<0,05$ ), für HNRNPA2B1 wurde keine signifikante Dysregulation festgestellt (Abb. 3 der Originalpublikation). Im Onkozytom waren alle Gene hochreguliert ( $p$  jeweils  $<0,01$ ) (Abb. 3 der Originalpublikation).

#### 1.4 Diskussion

In der vorliegenden Studie zeigten wir, dass im ccRCC im Vergleich zu gesundem Nierengewebe alle 6 Reader auf mRNA-Ebene und 5 Reader auf Proteinebene signifikant dysreguliert sind. Diese Erkenntnis passt zu dem allgemeinen Kenntnisstand, dass die  $m^6A$ -regulierenden Proteine in vielen verschiedenen Krebsarten dysreguliert sind. Besonders stimmen unsere Ergebnisse mit den Feststellungen von Zhou et al. (2019) bezüglich ccRCC überein, dort konnte bereits gezeigt werden, dass erniedrigte Level von  $m^6A$  im ccRCC zu schlechteren klinischen Parametern und zu einem kürzeren Überleben führen und die  $m^6A$ -Dysregulation eine wichtige Rolle in der Progression des ccRCC spielt. Auch die von uns festgestellte, aus der Dysregulation folgende, schlechtere Prognose geht mit den Ergebnissen vieler Studien wie Zhou et al. (2019) konform. Auch die TCGA-Datenbank bestätigt in Teilen unsere Ergebnisse und deutet ebenfalls darauf hin, dass  $m^6A$  im ccRCC herunterreguliert ist und diese Dysregulation mit einer schlechteren Prognose korreliert. Aufgrund dieser Hinweise entsprachen unsere Ergebnisse unseren Erwartungen.

Besonders vielversprechende Ergebnisse erhielten wir für HNRNPA2B1, YTHDC1 und – F1, da diese 3 Gene sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene herunterreguliert sind.

Von diesen 3 Genen wiederum konnten wir für YTHDC1 die besten Ergebnisse messen, denn es ist nicht nur auf mRNA- und Proteinebene herunterreguliert, sondern diese Dysregulation geht auch mit einem schlechteren Überleben (kürzeres OS, PFS und CSS) einher, was die Bedeutung, die YTHDC1 als diagnostisches und prognostisches Werkzeug bietet, deutlich macht. Auch diese mit der Herunterregulierung von YTHDC1 einhergehende schlechtere Prognose war von uns erwartet worden, da sie auch bereits von Zhou et al. (2019) beschrieben worden war. Die Herunterregulierung von YTHDC1 auf mRNA-Ebene korreliert, ebenso wie bei den anderen untersuchten Genen, mit dem Vorhandensein von Fernmetastasen, was wiederum zu einem höheren AJCC-Staging und einem schlechten Outcome führt.

Eine besondere Betrachtung verlangt die Inkonsistenz der Dysregulation mancher unserer Gene. So sind HNRNPC und YTHDF2 auf mRNA-Ebene herunterreguliert, auf Proteinebene hingegen heraufreguliert. Ein Erklärungsansatz für diese Ergebnisse war, dass es für diese Gene zahlreiche bekannte Splicingvarianten gibt. Somit untersuchten wir die verwendeten Primer und Antikörper daraufhin, wie gut diese die häufigsten Splicingvarianten erkennen und ob darin der Grund für die unterschiedlichen Dysregulationen liegen könnte. Die Primer untersuchten wir mit dem *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST<sup>®</sup>) der *U.S. National Library of Medicine*, die Antikörper analysierten wir mithilfe der *UniProt-Database*. Es zeigte sich, dass die Primer gut designt worden waren und alle wichtigen Splicingvarianten erkannten. Selbiges gilt für die Antikörper: Bei HNRNPC sind vier Isoformen durch alternatives Splicing bekannt, es bildet sich ein Tetramer aus 3 Kopien der Isoform C1 und einer Kopie der Isoform C2. Der verwendete Antikörper erkennt die Isoform C2, weshalb davon ausgegangen werden muss, dass die Tetramere erkannt werden. Bezüglich YTHDF2 sind zwei Isoformen bekannt, die beide vom verwendeten Antikörper erkannt werden. Daraus ergibt sich, dass es keine bekannten, wichtigen Splicingvarianten gibt, die von den verwendeten Primern bzw. Antikörpern nicht erkannt werden, womit das Primer- bzw. Antikörperdesign nicht als Grund für die Inkonsistenz bei der Dysregulation angenommen werden kann. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Stabilität der mRNA aufgrund des Tumormetabolismus posttranskriptionell erhöht wird, also die geringeren vorhandenen Mengen mRNA stärker translatiert werden und somit eine Herunterregulation der mRNA bei Heraufregulation der

Proteine besteht. Dies zu untersuchen übersteigt allerdings die Möglichkeiten dieser Studie.

YTHDC1 ist wie YTHDF1-3 Teil der Familie der YTH521-B-Homologie (YTH)-Domäne. Wie die anderen Proteine dieser Familie ist YTHDC1 ein direkter, zytoplasmatischer m<sup>6</sup>A-Reader. Seine Hauptaufgabe ist das Splicen von mRNA (Dai et al., 2018), die Förderung des Exports m<sup>6</sup>A-markierter RNA aus dem Nukleus und die Promotion von XIST (X inactive specific transcript)-vermitteltem transkriptionellem Silencing des X-Chromosoms (Zhao et al., 2020b). Es vermittelt die Rekrutierung von SRSF3 (serine and arginine-rich splicing factor) an seine mRNA-bindenden Regionen in der Nähe von m<sup>6</sup>A (Xiao et al., 2016) und fördert Exoninklusion (Adhikari et al., 2016). In der Abwesenheit von YTHDC1 oder m<sup>6</sup>A bindet SRSF10 an seine mRNA-Zielregionen und reguliert das Exonskipping (Xiao et al., 2016). Darüber hinaus führt YTHDC1 zu konzentrationsabhängigen alternativen Splicingmustern, der genaue Mechanismus ist bisher jedoch nicht erforscht (Adhikari et al., 2016). Alternatives Splicing von pre-mRNA ist ein häufig bei Krebs beobachtetes Phänomen und bildet somit eine weitere Verbindung zwischen m<sup>6</sup>A und Krebsentstehung (Dai et al., 2018). Es ist nachgewiesen, dass YTHDC1 eine Rolle in der Entstehung von kolorektalen Karzinomen (CRC) (Li et al., 2019a) und Prostatakarzinomen (PCa) (Liu et al., 2020a) spielt. Weiterhin führen niedrige Expressionslevel von YTHDC1 zu einem schlechteren klinischen Outcome bei Patienten mit Endometriumkarzinom (Liu et al., 2020a).

YTHDF1 ist ebenfalls ein direkter, zytoplasmatischer m<sup>6</sup>A-Reader (Dai et al., 2018). Er fördert auf verschiedenen Wegen die Genexpression. So fördert er direkt die Translation von methylierten mRNAs (Wang et al., 2015), indem er mit Translationsfaktoren wie EIF3 und EIF4A3 (eukaryotic initiation factor) interagiert und methylierte Transkripte mit Ribosomen verbindet (Lan et al., 2019). Es ist bekannt, dass YTHDF1 an der Entstehung von Metastasen beim HCC beteiligt ist (Zhao et al., 2020b). Eine große Rolle spielt es auch im CRC, dort kann es sowohl Zellproliferation als auch –invasion verstärken, was über größere Tumordurchmesser und vermehrte Lymphknoten- sowie Fernmetastasen zu einem höheren klinischen Stadium führt (Lan et al., 2019). Ein Knockdown von YTHDF1 hingegen führt zu einer Suppression von Proliferation und Chemoresistenz der CRC-Zellen (Liu et al., 2020a). Ebenso kann die Dysregulation von YTHDF1 die

Zellproliferation, Formation von xenotransplantierten Tumoren und Chemoresistenz gegen Cisplatin bei Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC) bewirken (Zhao et al., 2020b). Auch Auswirkungen auf andere Krebsarten sind bekannt, so sind Effekte bei Blasenkarzinomen, Endometriumkarzinomen und Ovarialkarzinomen bekannt (Zhao et al., 2020b), bei Ovarialkarzinomen gilt es als aussichtsreiches Ziel für eine neuartige Krebstherapie und korreliert mit schlechterem Staging, schlechterer Prognose und kürzerem Überleben (Liu et al., 2020b). Eine Deletion von YTHDF1 verstärkt die therapeutische Effizienz von PD-L1-Checkpoint-Blockern, einer fest etablierten Immuntherapie bei Krebserkrankungen, was es zu einem möglichen Ziel für zukünftige immunologische Krebstherapien macht (Ma et al., 2019).

YTHDF2, ein weiterer direkter, zytoplasmatischer Reader aus der YTH-Domänenfamilie (Dai et al., 2018), ist im Gegensatz zu YTHDF1 ein die Genexpression hauptsächlich hemmendes Protein. Seine Hauptaufgabe ist die Vermittlung von mRNA-Abbau (Wang et al., 2014). So erhöht ein Knockdown von YTHDF2 Menge und Lebensdauer von zellulärer mRNA (Maity und Das, 2016), nach Knockdown wurde ein Anstieg des totalen m<sup>6</sup>A-Gehalts der mRNA um 21% nachgewiesen (Dai et al., 2018). Darüber hinaus gibt es Verbindungen zu zahlreichen Krebsarten: So hat es zahlreiche Effekte auf die Tumorigenese vom HCC, beispielsweise reguliert HIF- $\alpha$ -abhängige Hypoxie die YTHDF2-Expression herunter, was zu einer Promotion von Tumorzellproliferation, Entzündung, vaskulärer Rekonstruktion und Metastasenbildung führt (Zhao et al., 2020b). Weiterhin wird angenommen, dass YTHDF2 eine Rolle im Zellmetabolismus von Bronchialkarzinomen spielt (Zhao et al., 2020b) und mit der Entstehung von AML verbunden ist (Li et al., 2018). Darüber hinaus ist YTHDF2 im Prostatakarzinom häufig hochreguliert und ein Knockdown hemmt durch eine Steigerung des m<sup>6</sup>A-Gehalts Proliferation und Migration von Pankreaskarzinomen (Sun et al., 2019). Auch in der Entstehung von Endometrium- und Mammakarzinomen spielt YTHDF2 eine Rolle (Sun et al., 2019). Beim Pankreaskarzinom nimmt YTHDF2 eine kompliziertere Stellung ein: Es ist auf mRNA- und Proteinebene hochreguliert und begünstigt auf der einen Seite die Proliferation von Krebszellen, indem es den AKT/GSK3beta/cyclin-D1-Signalweg aktiviert, auf der anderen Seite hemmt es die Ausbildung von Metastasen, indem es YAP-mRNA abbaut (Yang et al., 2017) und es kann die Invasion und Migration von

Pankreaskarzinomen hemmen, indem es das EMT (epithelial-mesenchymal transition)-Phänomen reguliert (Lobo et al., 2018; Chen et al., 2017). Aus diesen Gründen könnte YTHDF2 in Zukunft als prädiktiver Biomarker für Patienten mit Pankreaskarzinomen genutzt werden (Sun et al., 2019).

Um die Funktion von  $m^6A$  und die Vorteile posttranskriptioneller mRNA-Modifikationen zu veranschaulichen, lohnt sich ein Blick auf die Wechselwirkungen zwischen mRNAs und YTHDF1 bzw. -2.  $m^6A$  kann durch diese beiden Reader gegensätzliche Effekte auf  $m^6A$ -enthaltende mRNAs ausführen (Bera und Lewis, 2020), nämlich die mRNA-Translation und somit die Genexpression durch YTHDF1 fördern oder durch YTHDF2 den mRNA-Abbau beschleunigen und die Genexpression somit hemmen (Dai et al., 2018). Es zeigt sich, dass YTHDF1 und -2 zu großen Teilen gleiche Ziel-mRNAs haben (Bera und Lewis, 2020), an diese aber zu unterschiedlichen Zeiten derer Lebenszyklen binden. YTHDF1 bindet zu einem früheren Zeitpunkt des Lebenszyklus einer mRNA an sie als YTHDF 2 (Bera und Lewis, 2020), was die Schlussfolgerung zulässt, dass die Reader in einem koordinierten Ablauf ihre Funktionen ausüben, um somit eine feine Kontrolle der Effizienz der mRNA-Translation und somit Genexpression zu erreichen (Maity und Das, 2016). Es kann also die Translation durch YTHDF1 beschleunigt werden, so lange ein bestimmtes Protein benötigt wird und die Stabilität dieser Nachrichten durch YTHDF2 verringert werden, wenn die Translation nicht mehr benötigt wird (Maity und Das, 2016). Dies ist ein Beispiel für die Dynamik des Prozesses der  $m^6A$ -Methylierung und wie diese Mechanismen die Genexpression mit schnellen Antworten auf veränderte Bedingungen und zellulären Stress ausstatten und flexibel kontrollierbare Proteinproduktion ermöglicht (Wang et al., 2014).

YTHDF3 ist ein weiterer direkter, zytoplasmatischer  $m^6A$ -Reader. Er nimmt eine unterstützende Rolle in den Funktionen sowohl von YTHDF1 als auch YTHDF2 ein. Er interagiert entweder mit YTHDF1 und den 40S- und 60S-Untereinheiten der Ribosome (Li et al., 2017; Shi et al., 2017) oder mit YTHDF2, indem es an  $m^6A$ -enthaltende mRNA bindet und ihre Degradierung fördert (Shi et al., 2017). YTHDF3 kann also sowohl die Genexpression verstärken, als auch hemmen, (Dai et al., 2018) und wirkt somit als Feinjustierung für die RNA-Erreichbarkeit von sowohl YTHDF1, als auch -2 (Dai et al., 2018). Studien zeigten, dass YTHDF3 in der Entstehung mehrerer Krebsarten,

beispielweise CRC und Bronchialkarzinomen, involviert ist. Im kolorektalen Karzinom führt ein Knockdown von YTHDF3 zu einer erhöhten Chemosensitivität der Krebszellen (Lobo et al., 2018) und verstärkt den Abbau von GAS5, was wiederum Zellproliferation und Metastasierung beim CRC hemmt (He et al., 2019). Im PCa scheinen erhöhte YTHDF3-Level zu fortgeschrittenen Krankheitsstadien zu führen (He et al., 2019).

HNRNPA2B1 ist, anders als die Reader aus der YTH-Domänenfamilie ein nukleärer, indirekter (s.u.) m<sup>6</sup>A-Reader (Cao et al., 2016). Es bindet somit indirekt an m<sup>6</sup>A-Stellen auf RNA (Wu et al., 2018) und ist ein Regulator in der Prozessierung von miRNA (microRNA) (Cao et al., 2016), indem er die Prozessierung (Cao et al., 2016; Zhao et al., 2020b) und Reifung von primary miRNA (pri-miRNA) fördert (Maity und Das, 2016). Darüber hinaus reguliert er alternatives Splicing von miRNA (Dai et al., 2018). Auch HNRNPA2B1 steht in Verbindung zu verschiedenen Krebsarten. In Pankreaskarzinomen fördert er die Entwicklung des EMT-Phänomens (Dai et al., 2017). In Mammakarzinomen ist seine Expression erhöht, ein Knockdown hemmt die Proliferation der Krebszellen und kann ihre Apoptose fördern (Ma et al., 2019). Zusammen mit METTL3 und -14 konnten Zhao et al. (2020c) HNRNPA2B1 nutzen, um einen Risikoscore für Patienten mit ccRCC zu entwickeln.

HNRNPC ist ein indirekter m<sup>6</sup>A-Reader. Das bedeutet, dass er nicht direkt an die mRNA bindet, sondern die Sekundärstruktur der mRNA so verändert, dass die Bindung an m<sup>6</sup>A-Stellen erleichtert wird (Dai et al., 2018). Seine Hauptaufgaben liegen in der Prozessierung von pre-mRNA und dem Splicen von mRNA (Dai et al., 2018).

Zusammenfassend konnten wir in dieser Studie auf mRNA- und teilweise auf Proteinebene beweisen, dass die sechs untersuchten m<sup>6</sup>A-Reader im ccRCC dysreguliert sind und dass diese Dysregulation zu einer schlechteren Prognose und schlechteren klinisch-pathologischen Parametern wie einem erhöhten Risiko für ein metastasiertes RCC und somit einem höheren AJCC-Staging führen kann. Darüber hinaus fanden wir eine Dysregulation von m<sup>6</sup>A-Readern auch in den anderen RCC-Subtypen pRCC, chRCC, sRCC und in Onkozytomen. Trotz der kleinen Kohorten dieser Subtypen weisen unsere Ergebnisse auf eine Dysregulation nicht nur im klarzelligen, sondern auch in

anderen Typen des Nierenzellkarzinoms hin. Dies passt zu der Vermutung von Zheng et al. (2020), m<sup>6</sup>A auch zur Differenzierung verschiedener RCC-Subtypen nutzen zu können.

All diese Erkenntnisse bilden einen weiteren Ausblick darauf, welch großes Potenzial die weitere Erforschung von m<sup>6</sup>A und seinen regulierenden Proteinen für die Therapie, Diagnostik und Prognostik von Krebserkrankungen im Allgemeinen und für das RCC im Speziellen birgt. Die Dysregulation könnte in Zukunft als prognostisches Werkzeug genutzt werden und die schlechtere Prognose, die sich aus ihr ergibt könnte zur Entwicklung weiterer prognostischer Tests und individualisierter Risikoscores für ccRCC genutzt werden, wie es Zheng et al. (2020) und Wang et al. (2020) bereits getan haben.

Abschließend hat m<sup>6</sup>A, beziehungsweise haben seine regulierenden Proteine, großes Potenzial, in der Zukunft als therapeutische Ziele in der Krebstherapie eingesetzt werden zu können. Es wurden bereits Hemmstoffe für die m<sup>6</sup>A-Eraser FTO und ALKBH5 gefunden, welche das Wachstum von Krebszellen hemmen konnten (Zhao et al., 2020b). Zhao et al. (2020b) vermuten sogar, dass die m<sup>6</sup>A-Reader als direkte, ausführende Komponenten in der Regulation der Genexpression durch m<sup>6</sup>A eine besonders wichtige Rolle in der Entstehung von Krebserkrankungen spielen und somit auch besonders vielversprechende und potente Ziele für zukünftige Krebstherapien darstellen, wenn Medikamente, die ihre Regulierung beeinflussen, gefunden werden können. Um all diese Versprechen einzulösen, müssen noch weitere Studien zu m<sup>6</sup>A und ihren regulierenden Proteinen, besonders den Readern, durchgeführt werden.

## 1.5 Zusammenfassung

N<sup>6</sup>-Methyladenosin (m<sup>6</sup>A) ist die häufigste mRNA-Modifikation bei Säugetieren. Sie beeinflusst entscheidend den RNA-Metabolismus und spielt essenzielle Rollen in fast allen biologischen Prozessen wie Genexpression, Entwicklung und Differenzierung von Gewebe, Antworten auf zellulären Stress und zirkadianem Rhythmus. Es spielt eine entscheidende Rolle in der Karzinogenese und könnte in Zukunft - beziehungsweise kann teilweise bereits jetzt - als prognostisches und diagnostisches Werkzeug und als therapeutisches Ziel für moderne Krebstherapien genutzt werden.

Die m<sup>6</sup>A-Modifikation wird durch 3 Gruppen von Proteinen dynamisch und reversibel reguliert. Methyltransferasen, auch Writer genannt, fügen die Methylgruppe an das Adenosin an, welche von Demethylasen, sogenannten Erasern, wieder entfernt werden kann. m<sup>6</sup>A-Reader, m<sup>6</sup>A-spezifische RNA-bindende Proteine binden präferiert an die m<sup>6</sup>A-Stellen an der mRNA und führen so zu biologischen Funktionen wie Translation, Splicing oder Abbau von mRNA, übersetzen also den m<sup>6</sup>A-Code in zelluläre Prozesse und sind somit die ausführenden Bestandteile des m<sup>6</sup>A-Mechanismus.

In dieser Studie untersuchten wir die Expressionen der 6 Reader HNRNPA2B1, HNRNPC, YTHDC1 und YTHDF1-3 im klarzelligen Nierenzellkarzinom und anderen RCC-Subtypen auf mRNA- und Proteinebene. Wir konnten zeigen, dass auf mRNA-Ebene alle sechs Reader signifikant herunterreguliert und auf Proteinebene fünf der sechs Reader dysreguliert sind. Die niedrigeren Levels mancher der Reader korrelierten mit höheren Krankheitsstadien und einem verkürzten Gesamt-, progressionsfreiem und krebsspezifischem Überleben. Insbesondere YTHDC1 ist auf mRNA- und Proteinebene dysreguliert und führt zu einem ungünstigeren Stadium und einem kürzeren Überleben.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass, wie bereits in anderen Studien beobachtet, die m<sup>6</sup>A-Reader im ccRCC dysreguliert sind und großes Potenzial bergen, als Tumormarker, individuelles Prognosewerkzeug und als therapeutisches Ziel für zukünftige Krebstherapien genutzt werden zu können. Weitere Studien sind nötig, um dieses Potenzial weiter zu erforschen und vollständig ausnutzen zu können.

## 1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Adhikari S, Xiao W, Zhao Y-L, Yang Y-G. m(6)A. RNA Biol. 2016. 13: 756–759

Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, McQuaid S, Gray RT, Murray LJ, Coleman HG, James JA, Salto-Tellez M, Hamilton PW. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. Sci. Rep. 2017. 7: 16878



Bera A, Lewis SM. Regulation of Epithelial-to-Mesenchymal Transition by Alternative Translation Initiation Mechanisms and Its Implications for Cancer Metastasis. *Int. J. Mol. Sci.* 2020. 21

Cao G, Li H-B, Yin Z, Flavell RA. Recent advances in dynamic m6A RNA modification. *Open Biol.* 2016. 6: 160003

Chen J, Sun Y, Xu X, Wang D, He J, Zhou H, Lu Y, Zeng J, Du F, Gong A, Xu M. YTH domain family 2 orchestrates epithelial-mesenchymal transition/proliferation dichotomy in pancreatic cancer cells. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*. 2017. 16: 2259–2271

Cui Q, Shi H, Ye P, Li L, Qu Q, Sun G, Sun G, Lu Z, Huang Y, Yang C-G, Riggs AD, He C, Shi Y. m6A RNA Methylation Regulates the Self-Renewal and Tumorigenesis of Glioblastoma Stem Cells. *Cell Rep.* 2017. 18: 2622–2634

Dai D, Wang H, Zhu L, Jin H, Wang X. N6-methyladenosine links RNA metabolism to cancer progression. *Cell Death Dis.* 2018. 9: 124

Dai S, Zhang J, Huang S, Lou B, Fang B, Ye T, Huang X, Chen B, Zhou M. HNRNPA2B1 regulates the epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells through the ERK/snail signalling pathway. *Cancer Cell Int.* 2017. 17: 12

Davalos V, Blanco S, Esteller M. SnapShot: Messenger RNA Modifications. *Cell.* 2018. 174: 498-498.e1

Deng M, Blondeau JJ, Schmidt D, Perner S, Müller SC, Ellinger J. Identification of novel differentially expressed lncRNA and mRNA transcripts in clear cell renal cell carcinoma by expression profiling. *Genom. Data.* 2015. 5: 173–175

Deng X, Su R, Feng X, Wei M, Chen J. Role of N6-methyladenosine modification in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2017. 48: 1–7

Ellinger J, Alam J, Rothenburg J, Deng M, Schmidt D, Syring I, Miersch H, Perner S, Müller SC. The long non-coding RNA Inc-ZNF180-2 is a prognostic biomarker in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Am. J. Cancer Res.* 2015. 5: 2799–2807

Ellinger J, Gromes A, Poss M, Brüggemann M, Schmidt D, Ellinger N, Tolkach Y, Dietrich D, Kristiansen G, Müller SC. Systematic expression analysis of the mitochondrial complex III subunits identifies UQCRC1 as biomarker in clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget.* 2016. 7: 86490–86499

Fu Y, Dominissini D, Rechavi G, He C. Gene expression regulation mediated through reversible m<sup>6</sup>A RNA methylation. *Nature reviews. Genetics.* 2014. 15: 293–306

Greef B, Eisen T. Medical treatment of renal cancer: new horizons. *Br. J. Cancer.* 2016. 115: 505–516

He L, Li H, Wu A, Peng Y, Shu G, Yin G. Functions of N6-methyladenosine and its role in cancer. *Mol. Cancer.* 2019. 18: 176

Jaffrey SR, Kharas MG. Emerging links between m6A and misregulated mRNA methylation in cancer. *Genome Med.* 2017. 9: 2

Lan Q, Liu PY, Haase J, Bell JL, Hüttelmaier S, Liu T. The Critical Role of RNA m6A Methylation in Cancer. *Cancer Res.* 2019. 79: 1285–1292

Li A, Chen Y-S, Ping X-L, Yang X, Xiao W, Yang Y, Sun H-Y, Zhu Q, Baidya P, Wang X, Bhattarai DP, Zhao Y-L, Sun B-F, Yang Y-G. Cytoplasmic m6A reader YTHDF3 promotes mRNA translation. *Cell Res.* 2017. 27: 444–447

Li J, Meng S, Xu M, Wang S, He L, Xu X, Wang X, Xie L. Downregulation of N6-methyladenosine binding YTHDF2 protein mediated by miR-493-3p suppresses prostate cancer by elevating N6-methyladenosine levels. *Oncotarget.* 2018. 9: 3752–3764

Li T, Hu P-S, Zuo Z, Lin J-F, Li X, Wu Q-N, Chen Z-H, Zeng Z-L, Wang F, Zheng J, Chen D, Li B, Kang T-B, Xie D, Lin D, Ju H-Q, Xu R-H. METTL3 facilitates tumor progression via an m6A-IGF2BP2-dependent mechanism in colorectal carcinoma. *Mol. Cancer*. 2019a. 18: 112

Li Y, Xiao J, Bai J, Tian Y, Qu Y, Chen X, Wang Q, Li X, Zhang Y, Xu J. Molecular characterization and clinical relevance of m6A regulators across 33 cancer types. *Mol. Cancer*. 2019b. 18: 137

Liang Z, Kidwell RL, Deng H, Xie Q. Epigenetic N6-methyladenosine modification of RNA and DNA regulates cancer. *Cancer Biol. Med.* 2020. 17: 9–19

Liu S, Li Q, Chen K, Zhang Q, Li G, Zhuo L, Zhai B, Sui X, Hu X, Xie T. The emerging molecular mechanism of m6A modulators in tumorigenesis and cancer progression. *Biomed. Pharmacother.* 2020a. 127: 110098

Liu T, Wei Q, Jin J, Luo Q, Liu Y, Yang Y, Cheng C, Li L, Pi J, Si Y, Xiao H, Li L, Rao S, Wang F, Yu J, Yu J, Zou D, Yi P. The m6A reader YTHDF1 promotes ovarian cancer progression via augmenting EIF3C translation. *Nucleic Acids Res.* 2020b. 48: 3816–3831

Lobo J, Barros-Silva D, Henrique R, Jerónimo C. The Emerging Role of Epitranscriptomics in Cancer: Focus on Urological Tumors. *Genes*. 2018. 9

Ma S, Chen C, Ji X, Liu J, Zhou Q, Wang G, Yuan W, Kan Q, Sun Z. The interplay between m6A RNA methylation and noncoding RNA in cancer. *J. Hematol. Oncol.* 2019. 12: 121

Maity A, Das B. N6-methyladenosine modification in mRNA. *FEBS J.* 2016. 283: 1607–1630

Moore MJ. From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *J. Sci. (New York, N.Y.)*. 2005. 309: 1514–1518

Nishizawa Y, Konno M, Asai A, Koseki J, Kawamoto K, Miyoshi N, Takahashi H, Nishida N, Haraguchi N, Sakai D, Kudo T, Hata T, Matsuda C, Mizushima T, Satoh T, Doki Y, Mori M, Ishii H. Oncogene c-Myc promotes epitranscriptome m6A reader YTHDF1 expression in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2018. 9: 7476–7486

Niu Y, Wan A, Lin Z, Lu X, Wan G. N6-Methyladenosine modification: a novel pharmacological target for anti-cancer drug development. *Acta Pharm. Sin. B*. 2018. 8: 833–843

Rini BI, Campbell SC, Escudier B. Renal cell carcinoma. *Lancet*. 2009. 373: 1119–1132

Schrödter S, Braun M, Syring I, Klümper N, Deng M, Schmidt D, Perner S, Müller SC, Ellinger J. Identification of the dopamine transporter SLC6A3 as a biomarker for patients with renal cell carcinoma. *Mol. Cancer*. 2016. 15: 10

Shi H, Wang X, Lu Z, Zhao BS, Ma H, Hsu PJ, Liu C, He C. YTHDF3 facilitates translation and decay of N6-methyladenosine-modified RNA. *Cell Res*. 2017. 27: 315–328

Shih Y-CT, Chien C-R, Xu Y, Pan I-W, Smith GL, Buchholz TA. Economic burden of renal cell carcinoma in the US: Part II--an updated analysis. *Pharmacoeconomics*. 2011. 29: 331–341

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J. Clin*. 2019. 69: 7–34

Stukalin I, Alimohamed N, Heng DYC. Contemporary Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Oncol. Rev*. 2016. 10: 295

Sun T, Wu R, Ming L. The role of m6A RNA methylation in cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomed. Pharmacother*. 2019. 112: 108613

Taketo K, Konno M, Asai A, Koseki J, Toratani M, Satoh T, Doki Y, Mori M, Ishii H, Ogawa K. The epitranscriptome m6A writer METTL3 promotes chemo- and radioresistance in pancreatic cancer cells. *Int. J. Oncol.* 2018. 52: 621–629

Wang J, Zhang C, He W, Gou X. Effect of m6A RNA Methylation Regulators on Malignant Progression and Prognosis in Renal Clear Cell Carcinoma. *Front. Oncol.* 2020. 10: 3

Wang X, Lu Z, Gomez A, Hon GC, Yue Y, Han D, Fu Y, Parisien M, Dai Q, Jia G, Ren B, Pan T, He C. N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature.* 2014. 505: 117–120

Wang X, Zhao BS, Roundtree IA, Lu Z, Han D, Ma H, Weng X, Chen K, Shi H, He C. N(6)-methyladenosine Modulates Messenger RNA Translation Efficiency. *Cell.* 2015. 161: 1388–1399

Wu B, Su S, Patil DP, Liu H, Gan J, Jaffrey SR, Ma J. Molecular basis for the specific and multivalent recognitions of RNA substrates by human hnRNP A2/B1. *Nat. Comm.* 2018. 9: 420

Xiao W, Adhikari S, Dahal U, Chen Y-S, Hao Y-J, Sun B-F, Sun H-Y, Li A, Ping X-L, Lai W-Y, Wang X, Ma H-L, Huang C-M, Yang Y, Huang N, Jiang G-B, Wang H-L, Zhou Q, Wang X-J, Zhao Y-L, Yang Y-G. Nuclear m(6)A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing. *Mol. Cell.* 2016. 61: 507–519

Yang Z, Li J, Feng G, Gao S, Wang Y, Zhang S, Liu Y, Ye L, Li Y, Zhang X. MicroRNA-145 Modulates N6-Methyladenosine Levels by Targeting the 3'-Untranslated mRNA Region of the N6-Methyladenosine Binding YTH Domain Family 2 Protein. *J. Biol. Chem.* 2017. 292: 3614–3623

Zhang C, Samanta D, Lu H, Bullen JW, Zhang H, Chen I, He X, Semenza GL. Hypoxia induces the breast cancer stem cell phenotype by HIF-dependent and ALKBH5-mediated

m<sup>6</sup>A-demethylation of NANOG mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2016. 113: E2047-56

Zhao BS, Roundtree IA, He C. Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017. 18: 31–42

Zhao W, Qi X, Liu L, Ma S, Liu J, Wu J. Epigenetic Regulation of m<sup>6</sup>A Modifications in Human Cancer. *Molecular therapy. J. Nucleic Acids.* 2020a. 19: 405–412

Zhao Y, Shi Y, Shen H, Xie W. m<sup>6</sup>A-binding proteins: the emerging crucial performers in epigenetics. *J. Hematol. Oncol.* 2020b. 13: 35

Zhao Y, Tao Z, Chen X. Identification of a three-m<sup>6</sup>A related gene risk score model as a potential prognostic biomarker in clear cell renal cell carcinoma. *PeerJ.* 2020c. 8: e8827

Zheng Z, Mao S, Guo Y, Zhang W, Liu J, Li C, Yao X. N<sup>6</sup>-methyladenosine RNA methylation regulators participate in malignant progression and have prognostic value in clear cell renal cell carcinoma. *Oncol. Reps.* 2020

Zhou J, Wang J, Hong B, Ma K, Xie H, Li L, Zhang K, Zhou B, Cai L, Gong K. Gene signatures and prognostic values of m<sup>6</sup>A regulators in clear cell renal cell carcinoma - a retrospective study using TCGA database. *Aging.* 2019. 11: 1633–1647



Received: 18 October 2020 | Revised: 23 February 2021 | Accepted: 2 March 2021

DOI: 10.1002/mc.23297

## RESEARCH ARTICLE

Molecular  
Carcinogenesis WILEY

# N<sup>6</sup>-Methyladenosine (m<sup>6</sup>A) readers are dysregulated in renal cell carcinoma

Felix von Hagen<sup>1</sup> | Larissa Gundert<sup>1</sup> | Alexander Strick<sup>1</sup> | Niklas Klümper<sup>1</sup> |  
Doris Schmidt<sup>1</sup> | Glen Kristiansen<sup>2</sup> | Yuri Tolkach<sup>2,3</sup> | Marieta Toma<sup>2</sup> |  
Manuel Ritter<sup>1</sup> | Jörg Ellinger<sup>1</sup> <sup>1</sup>Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie, Universitätsklinikum Bonn, Bonn, Germany<sup>2</sup>Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Bonn, Bonn, Germany<sup>3</sup>Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie, Universitätsklinikum Köln, Cologne, Germany**Correspondence**Jörg Ellinger, Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie, Universitätsklinikum Bonn, Venusberg-Campus 1, 53127 Bonn, Germany.  
Email: joerg.ellinger@ukbonn.de**Abstract**

N<sup>6</sup>-Methyladenosine (m<sup>6</sup>A) is the most common modification of messenger RNA (mRNA) in mammals. It critically influences RNA metabolism and plays an essential role in virtually all types of bioprocesses including gene expression, tissue development, self-renewal and differentiation of stem cells, stress response and circadian clock control. It plays a crucial role in carcinogenesis and could be used as a prognostic and a diagnostic tool and as a target for new anticancer therapies. m<sup>6</sup>A modification is dynamically and reversibly regulated by three types of proteins. Methyltransferases, so-called “writers” add a methyl group to the adenosine, which can be removed by demethylases, also called “erasers.” m<sup>6</sup>A-specific RNA-binding proteins, from here on referred to as “readers,” preferentially bind to the m<sup>6</sup>A site and mediate biological functions, such as translation, splicing or decay of RNA. In this study, we examined the expression of the six m<sup>6</sup>A readers HNRNPA2B1, HNRNPC, YTHDC1 and YTHDF1-3 in clear cell renal carcinoma (ccRCC). We show that on mRNA level the expression of all six m<sup>6</sup>A readers is significantly down-regulated compared to normal renal tissue and on protein level five out of six readers are dysregulated. Lower levels of some m<sup>6</sup>A readers are correlated with advanced stage and grade as well as associated with a shorter overall, progression-free and cancer-specific survival. In summary, we could show that m<sup>6</sup>A readers are dysregulated in ccRCC and might therefore act as a tumor marker, could give further information on the individual prognosis and be a target of innovative cancer therapy.

**KEYWORDS**N<sup>6</sup>-methyladenosine, renal cell carcinoma, YTHDC1, YTHDF1, YTHDF3

**Abbreviations:** 3'-UTRs, 3'-untranslated region; AJCC, American Joint Committee on Cancer; ALKBH5, alkylolation repair homolog-5; BRD4, Bromodomain-containing protein-4; EGFR, epidermal growth factor-receptor; FTO, fat-mass and obesity-associated protein; HNRNPA2B1/-C/-G, heterogeneous nuclear ribonucleoproteins-A2/B1/C/G; IGF2BP1-3, insulin-like growth factor 2 mRNA-binding-protein-1/2/3; KIAA1429 (VIRMA), Vir-like-m<sup>6</sup>A-methyltransferase-associated; METTL3/-4/-14/-16, methyltransferase-like-3/4/14/16; MYC, myelocytomatose-oncogene; RBM15, RNA-binding protein-15; RBMX, RNA binding motif protein X-linked; SOCS2, suppressor of cytokine signaling-2; WTAP, Wilms-tumor-1-associated protein; YTHDC1/-2, YTH-domain-containing protein-1/2; YTHDF1/-2/-3, YTH-domain-containing family protein1/2/3; ZC3H13, zinc-finger-CCCH-type-containing-13.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2021 The Authors. *Molecular Carcinogenesis* Published by Wiley Periodicals LLC

## 1 | INTRODUCTION

Kidney cancer is one of the most abundant cancers in both men and women. In 2019, 73,820 new cases and 14,770 deaths were estimated by the American Cancer Society in the United States of America alone. Worldwide, about 270,000 new cases annually are estimated.<sup>1</sup> Renal cell carcinoma (RCC) is by far the most common kidney cancer<sup>1</sup> and furthermore the most lethal cancer in the genitourinary system.<sup>2</sup> Approximately 80% of RCC are of the clear cell subtype (ccRCC).<sup>1</sup> Partial or radical nephrectomy still is the gold-standard treatment with curative intent for patients with localized RCC. Patients with metastasis however are usually treated with a systemic treatment, which in these cases has a palliative intent.<sup>3,4</sup> A significant therapeutic improvement was the introduction of immunotherapy and targeted drugs, but relative drug resistance and resistance to radiotherapy are still big problems in clinical practice<sup>4-6</sup> and the median survival for patients with metastatic ccRCC still is under 3 years,<sup>7</sup> which makes understanding the pathogenesis of ccRCC and finding new therapeutic targets such an important topic.<sup>5</sup>

The methylation of N<sup>6</sup>-adenosine (m<sup>6</sup>A) is the most common messenger RNA (mRNA) modification in mammals<sup>8</sup> as between 0.1% and 0.4% of total adenosine residues are methylated.<sup>9</sup> It plays a very important role in cancer development and progression<sup>10</sup> as well as in almost all crucial cellular processes<sup>11</sup> and stages of mRNA metabolism.<sup>12</sup> The field of “Epitranscriptomics” (posttranslational RNA-modifications) is known to have diverse important roles in a wide range of biological and pathological processes,<sup>13</sup> especially in cancer, which led to it being one of the hot spots in life science and resulted in a vast number of studies worldwide.<sup>14</sup>

m<sup>6</sup>A was first discovered in the 1970s. The regulatory mechanisms and the functional characteristics, however, remained mostly unknown until recent years.<sup>15</sup> It was shown that the m<sup>6</sup>A modification is a reversible and dynamic process that affects more than 7600 human genes with 12,000 m<sup>6</sup>A sites.<sup>9,15</sup> m<sup>6</sup>A is evolutionary highly conserved,<sup>16</sup> mainly occurs at the RRm<sup>6</sup>ACH-sequences (R = A/G/U; R = A/G and H = A/C/U)<sup>12</sup> and is especially highly concentrated in 3'-untranslated regions, around stop codons and in long internal exons.<sup>9</sup> Furthermore, it appears in precursor mRNAs (pre-RNAs) and long noncoding RNAs (lnc-RNAs).<sup>17</sup>

The m<sup>6</sup>A modification is dynamically regulated by three groups of proteins. The attachment of the methyl group is catalyzed by the m<sup>6</sup>A methyltransferase complex (MTC)—which is composed of METTL3, METTL14 and WTAP—and by other proteins like METTL4 and -16, ZC3H13, KIAA1429, and RBM15, also being called “writers.”<sup>18,19</sup> The removal on the other hand is facilitated by FTO and ALKBH5, two m<sup>6</sup>A demethylases, also called “erasers.”<sup>18</sup> YTHDC1, YTHDC2, YTHDF1-3, eIF3, HNRNPA2B1, HNRNPC, HNRNPG, RBMX, and IGF2BP1-3 are m<sup>6</sup>A-specific binding proteins, from here on referred to as “readers”<sup>20-22</sup> which recognize the methyl group and transform it into biological signals.<sup>9</sup> In this study, we have examined the six readers HNRNPA2B1, HNRNPC, YTHDC1, and YTHDF1-3.

m<sup>6</sup>A has been proven to play a critical role in tumorigenesis of very many different types of cancer like breast cancer,<sup>22</sup> hematologic

malignancies,<sup>9</sup> especially well examined in acute myeloid leukemia (AML),<sup>22</sup> hepatocellular carcinoma (HCC),<sup>22</sup> glioblastoma,<sup>22</sup> pancreatic cancer,<sup>23</sup> colorectal cancer (CRC)<sup>24</sup> and many more, but also to maybe serve as a therapeutic target in several types of cancers like glioblastoma<sup>25</sup> and AML.<sup>17</sup> It was found that m<sup>6</sup>A expression levels significantly correlate with the activity of many cancer hallmark-related pathways<sup>10</sup> like BRD4, MYC, SOCS2, or EGFR<sup>26</sup> by regulating the mRNA expression levels of both oncogenes and tumor suppressor genes,<sup>27</sup> thus promoting or suppressing tumorigenesis.

In 2019, Zhou et al.<sup>9</sup> for the first time showed that alterations of the m<sup>6</sup>A modifiers have an impact on the prognosis of patients with ccRCC. m<sup>6</sup>A levels in ccRCC were downregulated, just as in other tumor entities like breast cancer and glioblastoma. m<sup>6</sup>A-downregulation resulted in a poor prognosis and worse clinical characteristics.<sup>9</sup> Zheng et al.<sup>22</sup> and Wang et al.<sup>5</sup> showed that many of the m<sup>6</sup>A-regulating proteins were dysregulated in ccRCC which indicated that the m<sup>6</sup>A-regulator proteins indeed play important roles in ccRCC carcinogenesis. Furthermore, they could establish a m<sup>6</sup>A-related risk signature serving as a prognostic tool for ccRCC, similar to Zhao et al.,<sup>28</sup> all further promoting the idea of future m<sup>6</sup>A-targeted treatments for ccRCC. Additionally, it was shown that m<sup>6</sup>A-regulator protein expression levels could serve as biomarkers to distinguish between RCC subtypes.<sup>22</sup>

In this study, we examined the six readers HNRNPA2B1, HNRNPC, YTHDC1, and YTHDF1-3. The fates of m<sup>6</sup>A-modified mRNAs transcripts are diversely affected by the different readers.<sup>18</sup>

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Patients

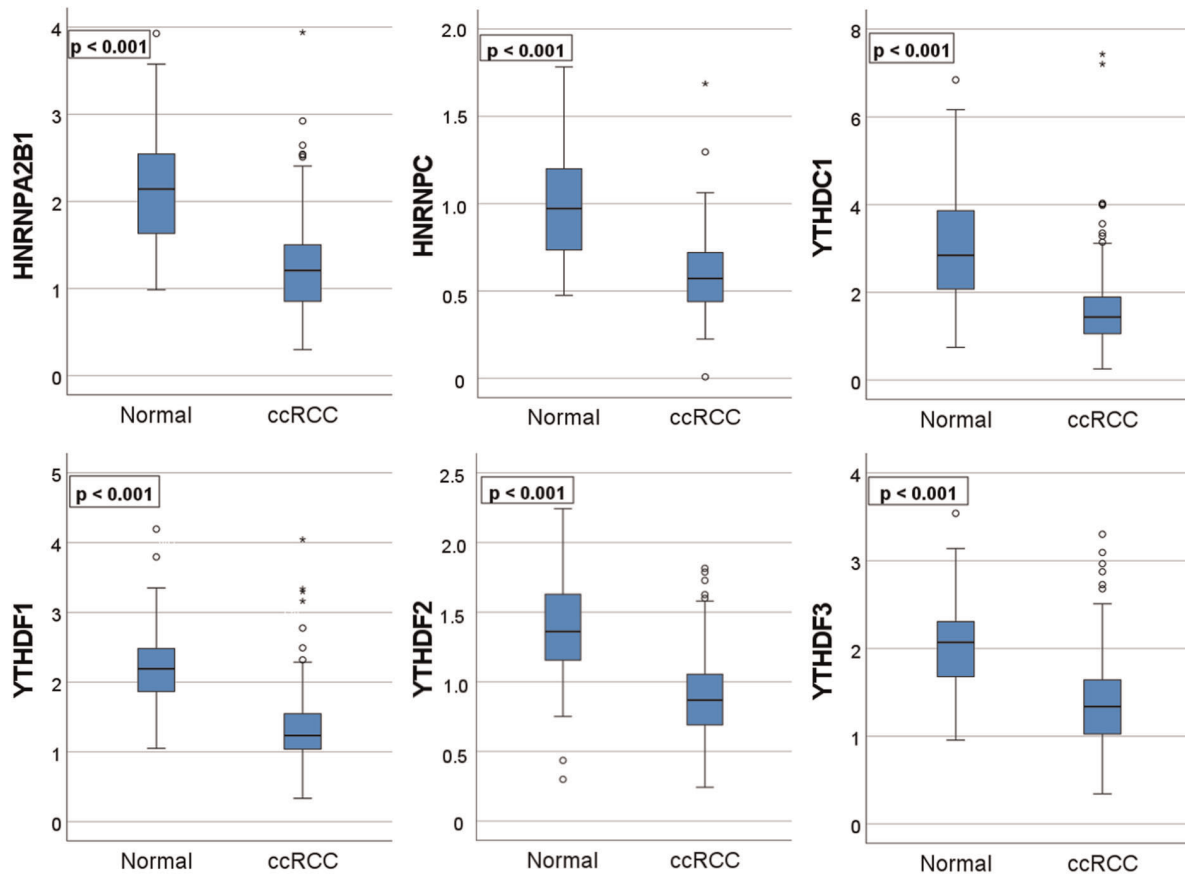
The tissue samples used were collected by the Biobank of the Center for Integrated Oncology Cologne-Bonn. All patients underwent radical or partial nephrectomy at the Department of Urology at the University Hospital Bonn. All patients gave written informed consent for the collection of biomaterials. The study was approved by the Ethics Committee of the University of Bonn (vote: 127/17).

Fresh-frozen tissue of both ccRCC and correspondent normal renal parenchyma were stored at -80°C and utilized for mRNA expression studies. For Immunohistochemistry, archived formalin-fixed and paraffin-embedded tissues were utilized. All used tissues were re-examined by an uro-pathologist and classified following the 2009 WHO classification. Clinicopathological parameters are provided in Table S1.

### 2.2 | Quantitative real-time polymerase chain reaction

RNA isolation was described in detail previously.<sup>29</sup> Briefly, the mir-Vana miRNA Isolation Kit (Ambion) was used to isolate total RNA which was treated with DNase (Ambion). The RNA quantity was





**FIGURE 1** The expression levels of m<sup>6</sup>A readers are significantly downregulated in ccRCC compared to normal tissue. ccRCC, clear cell renal carcinoma; m<sup>6</sup>A, N<sup>6</sup>-Methyladenosine [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

evaluated utilizing a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) and the RNA integrity was measured by evaluating the 28S and 18S ribosomal RNA bands in gel electrophoresis.

The gene expression of HNRNPA2B1, HNRNPC, YTHDC1, and YTHDF1-3 was evaluated through quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR). Complementary DNA (cDNA) was won from 1 µg total RNA utilizing the PrimeScript RT Reagent Kit with genomic DNA Eraser (Takara Bio). PCR experiments were performed using 2.5 ng/µl cDNA template, SYBR Premix Ex Taq II and Rox Plus and 10 pmol/µl forward/reverse primer on a QuantStudio (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific). Relative expression levels were determined using the QuantStudio 3D AnalysisSuite Cloud Software (Applied Biosystems). Gene expression was normalized to beta-actin (ACTB), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and peptidyl-prolyl isomerase A as described earlier.<sup>30</sup> Primer sequences are provided in Table S2.

### 2.3 | Immunohistochemistry

The six readers' expressions were further investigated in ccRCC, papillary RCC (pRCC), chromophobe RCC (chRCC), sarcomatoid RCC (sRCC), Oncocytoma and benign renal tissue utilizing a tissue

microarray (TMA), described previously by Schrödter et al.<sup>31</sup> Formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissues were cut into 5 µm thick sections, placed inside a water bath at 45°C for ideal expansion, applied on slides and dried at 65°C for 60 min. Afterwards, the slides were proceeded using the Benchmark Ultra system (Ventana Medical Systems Inc.), which performed deparaffinization, pretreatment with cell conditioning buffer (CC1 buffer, pH 8), and incubation with the primary antibodies (HNRNPA2B1: 1:100; HNRNPC: 1:100; YTHDC1: 1:350; YTHDF1: 1:100; YTHDF2: 1:100; YTHDF3: 1:1000) at 37°C for 36 min. Signal detection was performed with the HRP Multimer technology of the UltraView DAB IHC Detection Kit (Ventana) and finally, the slides were counterstained using Mayer's hemalaun and bluing reagent (Ventana). The staining intensities were measured quantitatively utilizing QuPath software.<sup>32</sup> Clinicopathological parameters are provided in Table S3.

### 2.4 | Statistical analysis

Statistical analyses (*t* test, Mann-Whitney *U* test, Kruskal-Wallis test, univariate, and multivariate Cox regression analyses, Kaplan-Meier estimates, Spearman's rank-order correlation test) were appropriately executed with the Statistical Package for the

Social Sciences (SPSS), version 26 (SPSS Inc., IBM Corp.). Statistical significance was approved at  $p < .05$ .

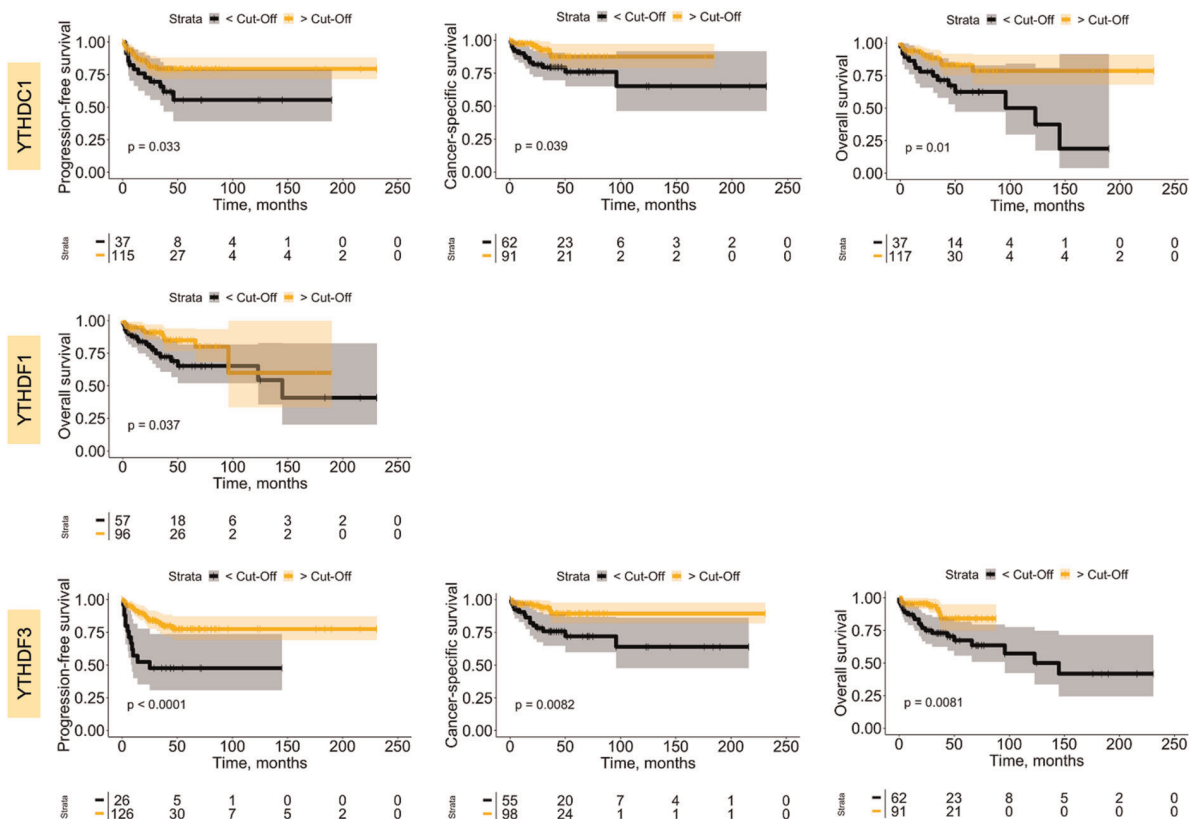
### 3 | RESULTS

#### 3.1 | mRNA expression

Gene expression of the six readers was examined in 166 ccRCC and 102 normal renal tissues. Expression levels of all 6 genes were significantly reduced in ccRCC in comparison to normal tissue ( $p$  all  $< .001$ ) (Figure 1). Spearman's rank-order correlation test also showed a significant correlation between all six readers (Table S4). Furthermore, downregulation of all six readers was correlated with clinical M stage in ccRCC patients ( $p$  all  $< .05$ ) (Figure S1). Also, YTHDC1-downregulation correlated with a worse AJCC-Staging ( $p = .033$ ). Associations with other clinicopathological parameters were not observed ( $p$  all  $> .05$ ) (Table S3). The prognostic potential for all genes was studied via Kaplan–Meier estimates: Regarding YTHDC1 and YTHDF3, a correlation with shorter overall (OS), progression-free (PFS), and cancer-specific survival (CSS) was found (YTHDC1: OS: log-rank  $p = .004$ ; PFS: log-rank  $p = .031$ ; CSS: log-rank  $p = .037$ ) (Figure 2) (YTHDF3: OS: log-rank  $p = .008$ ; PFS: log-rank  $p < .001$ ; CSS: log-rank  $p = .007$ )

(Figure 2). Also, YTHDF1 was correlated with a shorter OS (log-rank  $p = .035$ ) (Figure 2). Univariate Cox regression analyses confirmed our findings from the Kaplan–Meier estimates ( $p$  all  $< .05$ ) and also demonstrated the prognostic value of m<sup>6</sup>A readers in patients with ccRCC. Also, advanced clinicopathological parameters like Grading (G1/2 vs. G3/4), pT-Stage (pT1/2 vs. pT3/4), pN-Stage (pNX/0 vs. pN+), and pM Stage (M0 vs. M1) were found to correlate with survival (OS, PFS, CSS) in univariate Cox regression analysis (except pN-Stage considering PFS). In the multivariate Cox regression analysis, this predictive information was not observed (see Table S6a–c).

For further validation, we also examined the genes via the kidney renal clear cell carcinoma-TCGA dataset. The results partly supported our findings: HNRNPA2B1 ( $p < .01$ ), YTHDF2 ( $p = .01$ ), and YTHDF3 ( $p < .01$ ) are downregulated, just as in our study (Figure S2). The other genes, however, were not significantly dysregulated in the TCGA dataset. Considering survival, the prognostic value was examined with Kaplan–Meier estimates via the GEPIA-website. Most of the studied genes were correlated with a shorter survival: HNRNPC ( $p = .02$ ), YTHDC1 ( $p < .01$ ), YTHDF1 ( $p = .03$ ), YTHDF2 ( $p < .01$ ), and YTHDF3 ( $p < .01$ ) were correlated with a shorter OS and YTHDC1 ( $p < .01$ ), YTHDF1 ( $p < .01$ ), YTHDF2 ( $p = .01$ ), and YTHDF3 ( $p = .03$ ) were correlated with a shorter PFS (see Figure S3).

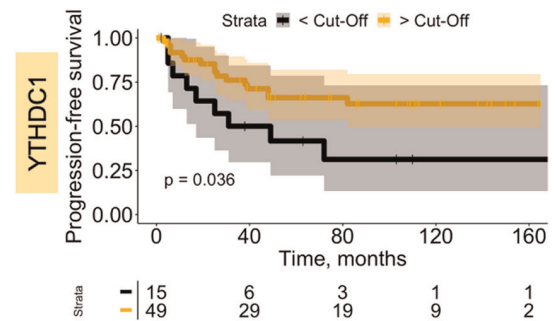


**FIGURE 2** The mRNA expression level of YTHDC1, YTHDF1, and YTHDF3 is predictive for a shortened survival in patients with ccRCC. ccRCC, clear cell renal carcinoma; mRNA, messenger RNA [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

### 3.2 | Protein expression

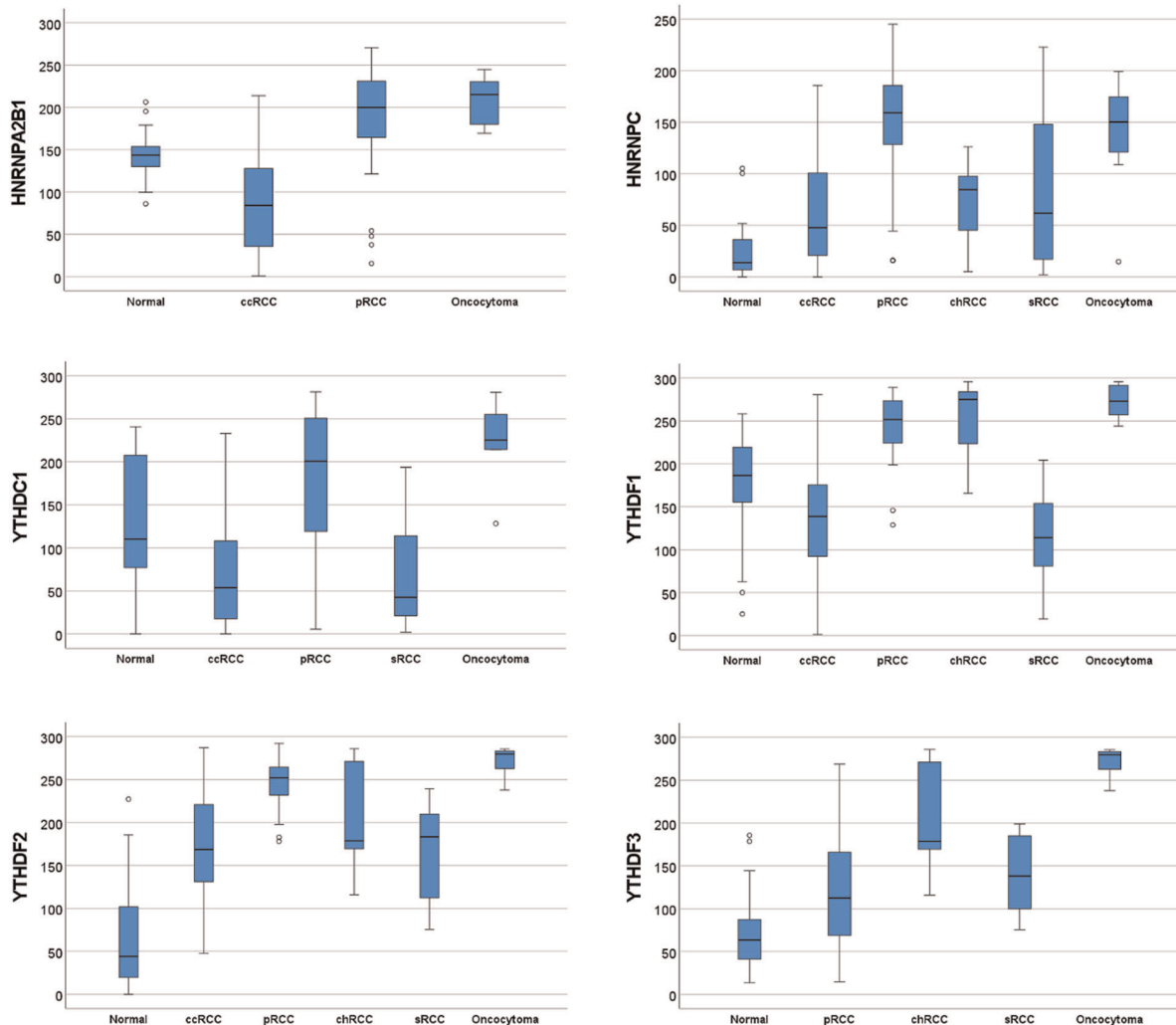
Immunohistochemical staining was executed using a TMA consisting of 154 ccRCC, 35 pRCC, 10 chRCC, 14 sRCC, 10 Oncocytoma, and 30 normal renal tissues. See Table S5 for clinicopathological parameters and Figure S4 for exemplary pictures. Protein expression partly supported our findings on the mRNA level, all genes except YTHDF3 were significantly dysregulated in ccRCC. HNRNPC and YTHDF2, surprisingly, were upregulated and the other genes downregulated in comparison to normal renal tissue (HNRNPA2B1, HNRNPC, YTHDC1, and YTHDF2:  $p < .001$ ; YTHDF1:  $p = .001$ ) (Figure 3).

For YTHDF2-downregulation, we found a correlation with a lower grading ( $p = .001$ ), which may be explained by the diverse roles YTHDF2 plays in several types of cancer.<sup>33</sup> Furthermore, Kaplan–Meier estimates indicated a shorter PFS regarding YTHDC1 (log-rank  $p = .036$ ) (Figure 4). Univariate Cox regression analyses confirmed this finding, furthermore, a correlation between lower



**FIGURE 4** Kaplan–Meier estimates demonstrate a shorter progression-free survival in patients with low YTHDC1 expression [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

YTHDC1 levels and a shorter CSS was found. Again, advanced clinicopathological parameters like Grading (G1/2 vs. G3/4), pT-sStage (pT1/2 vs. pT3/4), pN-Stage (pNX/0 vs. pN+) and pM Stage (pM+ vs. pM1) were found to partly correlate with survival (OS, PFS, CSS) in



**FIGURE 3** The protein expression levels of m<sup>6</sup>A readers are dysregulated in RCC compared to normal renal tissue. m<sup>6</sup>A, N<sup>6</sup>-Methyladenosine; RCC, renal cell carcinoma [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

univariate Cox regression analysis (Grading and pM-Stage correlated with OS, PFS and CSS, pT stage correlated with PFS and CSS,  $p$  all  $<.05$ ). In the multivariate Cox regression analysis, however, this predictive information could not be observed (see Table S6d–f).

Among the other RCC subtypes, most of the genes correlated with a significant dysregulation (Table S7). In pRCC, all proteins were upregulated ( $p$  all  $<.01$ ) (Figure 3). In chRCC, HNRNPC, and YTHDF1-3 were upregulated ( $p$  all  $<.01$ ) (Figure 3). In sRCC, the dysregulation was more complex: HNRNPC, YTHDF2, and YTHDF3 were upregulated, YTHDC1 and YTHDF1 were downregulated compared to normal tissue ( $p$  all  $<.05$ ), for HNRNPA2B1, no significant dysregulation was found (Figure 3). Finally, in Oncocytoma, all genes were upregulated ( $p$  all  $<.01$ ) (Figure 3).

## 4 | DISCUSSION

In the present study, we showed that all six readers are downregulated in ccRCC compared to normal tissue on mRNA level and that five out of six readers are dysregulated on protein level. This goes accordingly to the common dysregulations of m<sup>6</sup>A levels in different types of cancer and especially the findings of Zhou et al.<sup>9</sup> considering ccRCC, who stated that decreased m<sup>6</sup>A levels in ccRCC resulted in worse clinical parameters and thus survival and that m<sup>6</sup>A-downregulation plays a crucial role in progression of ccRCC. This is why the worse prognosis for ccRCC patients we could show for some of the readers is also in conformity with many studies like Zhou et al.<sup>9</sup> Also the TCGA dataset partly confirms our findings and also suggests that m<sup>6</sup>A is downregulated in ccRCC and that this downregulation correlates with a worse prognosis. Because of all these hints at the m<sup>6</sup>A-dysregulation in ccRCC and the worse prognosis, our findings were expected.

Particularly interesting are HNRNPA2B1, YTHDC1, and -F1, since they are downregulated on both mRNA- and protein levels. From these genes, the best results in our study were achieved for YTHDC1. Not only could we show that it is consistently downregulated on both mRNA and protein levels in ccRCC, but also that high levels of YTHDC1 are linked with a better outcome (longer OS, PFS, and CSS), emphasizing the potential YTHDC1 may have as a tool for diagnosis and prognosis. The worse prognosis of YTHDC1-downregulation was expected since it was also described by Zhou et al.<sup>9</sup> YTHDC1-downregulation on mRNA level, just like the downregulation of all other readers on mRNA level is correlated to the existence of distant metastases and therefore a higher AJCC-staging and a worse outcome.

The lack of consistency in the ways of dysregulation on mRNA and protein level for HNRNPC, YTHDF2, and -3 was very curious, especially considering HNRNPC and YTHDF2, since they were downregulated on mRNA level and upregulated on protein level. This might have been the case since these genes are known to have many splice variants. To further determine this, we examined both the primers of all our genes and the antibodies against HNRNPC and YTHDF2 considering which splice variants they detect and if that

may be the cause for the different directions of dysregulation. To examine the primers, we used the Basic Local Alignment Search Tool of the U.S. National Library of Medicine. The HNRNPC- and YTHDF2-antibodies were studied with the use of the UniProt-Database. The primers were found to have been designed well since they all recognize all known important splice variants. The same could be said about the antibodies: For HNRNPC, there are four known isoforms by alternative splicing. The subunit structure is composed of a tetramer containing three copies of isoform C1 and one copy of isoform C2. Since the antibody used detects the C2-isoform, it should detect the tetramers. For YTHDF2, there are two known isoforms, which are both recognized by the used antibody. This means that we haven't found common splice variants that the primers resp. antibodies couldn't detect and thus this is not the explanation for the lack of consistency in the dysregulation in said genes. It could be possible, that because of the tumor metabolism, mRNA stability is posttranscriptionally enhanced leading to the reduced mRNA being translated more and that this results in a reduction of the gene on mRNA, but not on protein level. However, since this wasn't the scope of our study, we cannot examine this hypothesis in greater detail.

YTHDC1, just as the other members of the YT521-B-homology-(YTH)-domain family is a cytoplasmic, direct m<sup>6</sup>A reader. Its main function is mRNA splicing,<sup>34</sup> facilitating nuclear export of m<sup>6</sup>A-marked RNA and promoting transcriptional silencing from X chromosome genes mediated by XIST (X inactive specific transcript).<sup>19</sup> It recruits serine and arginine-rich splicing factor 3 (SRSF3) to its mRNA-binding regions near m<sup>6</sup>A<sup>35</sup> and promotes exon inclusion.<sup>36</sup> SRSF10 on the other hand binds to its target mRNA regions and regulates exon skipping in the absence of YTHDC1 or m<sup>6</sup>A.<sup>35</sup> Furthermore, it has been observed to affect alternative splicing patterns in a concentration-dependent manner, but the mechanism so far is still unclear.<sup>36</sup> Alternative pre-mRNA splicing and thus aberrant alternative splicing variants are often found in cancer, creating another link between m<sup>6</sup>A and cancer<sup>34</sup> and explaining, why YTHDC1 is such an important protein in the context of cancer. Unbalanced alternative splicing, which can occur because of YTHDC1-dysregulation has been implicated in several kinds of cancer and may facilitate tumor cell proliferation and invasion via certain protumorigenic and the reduction of anti-tumorigenic isoforms<sup>37</sup> and it is linked to altering cancer-associated genes like BRCA2 and PGR.<sup>38</sup>

SRSF3, which is recruited by YTHDC1, is a crucial promoting factor in tumorigenesis in several kinds of cancer, like breast cancer, CRC, ovarian cancer, osteosarcoma and glioblastoma. YTHDC1 is also described to interact with m<sup>6</sup>A-writers like METTL3. METTL3-downregulation, for instance, results in lower m<sup>6</sup>A levels of SRSFs, via YTHDC1-dependent nonsense-mediated mRNA decay of SRSF transcripts, reducing expression of SRSF-proteins. This results in bigger changes in alternative splicing isoform-switches, which affect tumor cell growth and progression in glioblastoma.<sup>39</sup>

It is important to note, that in different kinds of cancer, m<sup>6</sup>A-regulating proteins can play diverse roles. In prostate cancer (PCa), it could be proven that YTHDC1 acts as an oncogene<sup>40</sup> and it is commonly upregulated in CRC<sup>41</sup> while it is downregulated in ccRCC

and an upregulation correlates with a better outcome. Furthermore, low YTHDC1 expression levels are directly linked to a poor clinical outcome of patients with endometrial cancer,<sup>40</sup> similar to our findings considering ccRCC. This is not surprising, since different m<sup>6</sup>A-regulating proteins, writers, erasers and readers are each linked to distinct cancer pathway alterations which suggests that different m<sup>6</sup>A-regulators have diverse functional effects in different cancer types.<sup>10</sup> Also, it is well known that certain m<sup>6</sup>A-regulator proteins can have opposite functions in different types of cancer<sup>22</sup> and can either work as a facilitator or a barrier of tumorigenesis<sup>40</sup> because they are context and tissue-specific<sup>9,42</sup> and their downstream targets differ in different cancer types.<sup>43</sup> Also, Liu et al.<sup>37</sup> suggest, that these different dysregulations in different kinds of cancer lie within tumor heterogeneity.

YTHDF1, another member of the YTH-domain family is also a cytoplasmic direct m<sup>6</sup>A reader.<sup>34</sup> It directly promotes the translation of methylated mRNAs.<sup>44</sup> It is known that YTHDF1 plays an important role in the development of and is linked with worse outcome in many kinds of cancer like HCC,<sup>19</sup> CRC,<sup>16</sup> where its knockdown results in suppression of CRC cell proliferation and chemoresistance<sup>40</sup> and non-small cell lung carcinoma,<sup>19</sup> but also bladder cancer,<sup>19</sup> endometrial cancer,<sup>19</sup> and ovarian cancer.<sup>42</sup>

Like the other readers of the YTH domain family, YTHDF2 is a cytoplasmic reader and directly binds to m<sup>6</sup>A-containing RNA.<sup>34</sup> Its main function is to mediate mRNA decay.<sup>45</sup> YTHDF2 depletion increases both the abundance and the half-lives of cellular mRNAs.<sup>46</sup> After YTHDF2 knockdown a 21% increase of the total mRNA's m<sup>6</sup>A ratio was observed.<sup>34</sup> Furthermore, YTHDF2 has been linked to several types of cancer like HCC<sup>19</sup> lung cancer, AML,<sup>47</sup> PCa,<sup>47</sup> endometrial cancer, breast cancer,<sup>19</sup> or pancreatic cancer.<sup>17</sup>

Just as the other cytoplasmic readers of the YTH domain family, YTHDF3 is a direct m<sup>6</sup>A reader. It was observed to interact with both YTHDF1<sup>48,49</sup> and YTHDF2<sup>49</sup> to facilitate either mRNA translation or decay.<sup>34</sup> All in all, it works as a fine-tuning for the RNA accessibility of both YTHDF1 and -2.<sup>17</sup> Studies showed that YTHDF3 is involved in tumorigenesis of several types of cancer including CRC, lung cancer,<sup>19</sup> and PCa.<sup>50</sup>

HNRNPA2B1 is a nuclear RNA-binding protein.<sup>11</sup> It indirectly binds to m<sup>6</sup>A sites on RNAs<sup>51</sup> and was identified as a regulator in microRNA (miRNA) processing<sup>11</sup> by promoting and accelerating primary miRNA (primary miRNA) processing<sup>11,19</sup> and maturation.<sup>46</sup> Additionally, it regulates alternative splicing of miRNA.<sup>34</sup> It was shown that HNRNPA2B1 plays a role in pancreatic cancer<sup>52</sup> and breast cancer.<sup>15</sup> Together with METTL3 and -14, HNRNPA2B1 could be used by Zhao et al.<sup>28</sup> to build a risk score for patients with ccRCC.

HNRNPC is an indirect nuclear m<sup>6</sup>A reader, meaning just as HNRNPA2B1 it alters the mRNA secondary structure so that m<sup>6</sup>A binding is facilitated.<sup>34</sup> HNRNPC is mainly involved in pre-mRNA (precursor-mRNA) processing and mRNA splicing.<sup>34</sup>

Summarizing, we could show that on mRNA level and partly confirmed on protein level, the six readers HNRNPA2B1, HNRNPC, YTHDC1, and YTHDF1-3 are dysregulated in ccRCC and that this dysregulation can result in worse prognosis and worse

clinicopathological parameters like a higher risk of metastatic ccRCC and therefore higher AJCC-Stage. Furthermore, we also found dysregulation of m<sup>6</sup>A in the other studied subtypes of RCC: pRCC, chRCC, and sRCC as well as in Oncocytoma. Despite the small number of tissues, this indicates a dysregulation not only in ccRCC but also other kinds of renal carcinomas and supports the theory that m<sup>6</sup>A could be used to distinguish between different kinds of RCCs.<sup>22</sup>

All these findings are another hint at what great promises the understanding of m<sup>6</sup>A holds for RCC and cancer in general. The dysregulation might in the future be used as a diagnostic tool and the worse prognosis that was partly shown may be able to be used to develop better prognostic tools and individualized risk scores for ccRCC patients like Zheng et al.<sup>22</sup> and Wang et al.<sup>5</sup> did. Also, like Zheng et al. proposed,<sup>22</sup> m<sup>6</sup>A might be used for differentiating different RCC subtypes. Especially YTHDC1 seems to be a very promising m<sup>6</sup>A-regulating protein.

## 5 | CONCLUSION

The readers HNRNPA2B1, HNRNPC, YTHDC1, and YTHDF1-3 are dysregulated in ccRCC and other subtypes of renal cell carcinoma. In ccRCC, they partly correlate with worse clinicopathological parameters and shorter survival of the patients. Further studies are needed to establish the potential use of m<sup>6</sup>A as a biomarker, a diagnostic tool and a target for future targeted anticancer therapy.

## ACKNOWLEDGMENTS

The tissue samples were collected within the framework of the Biobank of the IOC Cologne-Bonn at the University Hospital Bonn. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

## CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there are no conflict of interests.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

Raw data are available on request from the authors.

## ORCID

Jörg Ellinger  <http://orcid.org/0000-0002-7526-0857>

## REFERENCES

1. Stukalin I, Alimohamed N, Heng DY. Contemporary treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Oncol Rev.* 2016;10(1):4081.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(1):7-30.
3. Ellinger J, Gromes A, Poss M, et al. Systematic expression analysis of the mitochondrial complex III subunits identifies UQCRC1 as biomarker in clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7(52):86490-86499.
4. Rini BI, Campbell SC, Escudier B. Renal cell carcinoma. *Lancet.* 2009;373(9669):1119-1132.
5. Wang J, Zhang C, He W, Gou X. Effect of m<sup>6</sup>A RNA methylation regulators on malignant progression and prognosis in renal clear cell carcinoma. *Front Oncol.* 2020;10:3.

6. Y-Ct C-RC, Y X, I-W P, Gl S, Ta B. Economi burden of renal cell carcinoma in the US. *Published online*. 2011.
7. Greef B, Eisen T. Medical treatment of renal cancer: new horizons. *Br J Cancer*. 2016;115(5):505-516.
8. Fu Y, Dominissini D, Rechavi G, He C. Gene expression regulation mediated through reversible m<sup>6</sup>A RNA methylation. *Nat Rev Genet*. 2014;15(5):293-306.
9. Zhou J, Wang J, Hong B, et al. Gene signatures and prognostic values of m<sup>6</sup>A regulators in clear cell renal cell carcinoma—a retrospective study using TCGA database. *Aging*. 2019;11(6):1633-1647.
10. Li Y, Xiao J, Bai J, et al. Molecular characterization and clinical relevance of m<sup>6</sup>A regulators across 33 cancer types. *Mol Cancer*. 2019;18(1):137.
11. Cao G, Li H-B, Yin Z, Flavell RA. Recent advances in dynamic m<sup>6</sup>A RNA modification. *Open Biol*. 2016;6(4):160003.
12. Zhao BS, Roundtree IA, He C. Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017;18(1):31-42.
13. Davalos V, Blanco S, Esteller M. SnapShot: Messenger RNA modifications. *Cell*. 2018;174(2):498-498e1.
14. Niu Y, Wan A, Lin Z, Lu X, Wan GN. 6-Methyladenosine modification: a novel pharmacological target for anti-cancer drug development. *Acta Pharm Sin B*. 2018;8(6):833-843.
15. Ma S, Chen C, Ji X, et al. The interplay between m<sup>6</sup>A RNA methylation and noncoding RNA in cancer. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):121.
16. Lan Q, Liu PY, Haase J, Bell JL, Hüttelmaier S, Liu T. The critical role of RNA m<sup>6</sup>A methylation in cancer. *Cancer Res*. 2019;79(7):1285-1292.
17. Sun T, Wu R, Ming L. The role of m<sup>6</sup>A RNA methylation in cancer. *Biomed Pharmacother*. 2019;112(108613):108613.
18. Deng X, Su R, Feng X, Wei M, Chen J. Role of N<sup>6</sup>-methyladenosine modification in cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2018;48:1-7.
19. Zhao Y, Shi Y, Shen H, Xie W. m<sup>6</sup>A-binding proteins: the emerging crucial performers in epigenetics. *J Hematol Oncol*. 2020;13(1):35.
20. Liu N, Zhou KI, Parisien M, Dai Q, Diatchenko L, Pan TN. 6-methyladenosine alters RNA structure to regulate binding of a low-complexity protein. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(10):6051-6063.
21. Liang Z, Kidwell RL, Deng H, Xie Q. Epigenetic N<sup>6</sup>-methyladenosine modification of RNA and DNA regulates cancer. *Cancer Biol Med*. 2020;17(1):9-19.
22. Zheng Z, Mao S, Guo Y, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine RNA methylation regulators participate in malignant progression and have prognostic value in clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2020;43(5):1591-1605.
23. Taketo K, Konno M, Asai A, et al. The epitranscriptome m<sup>6</sup>A writer METTL3 promotes chemo- and radioresistance in pancreatic cancer cells. *Int J Oncol*. *Published online*. 2017. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4219>
24. Nishizawa Y, Konno M, Asai A, et al. Oncogene c-Myc promotes epitranscriptome m<sup>6</sup>A reader YTHDF1 expression in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2018;9(7):7476-7486.
25. Cui Q, Shi H, Ye P, et al. M<sup>6</sup>A RNA methylation regulates the self-renewal and tumorigenesis of glioblastoma stem cells. *Cell Rep*. 2017;18(11):2622-2634.
26. He L, Li H, Wu A, Peng Y, Shu G, Yin G. Functions of N<sup>6</sup>-methyladenosine and its role in cancer. *Mol Cancer*. 2019;18(1):176.
27. Zhao W, Qi X, Liu L, Ma S, Liu J, Wu J. Epigenetic regulation of m<sup>6</sup>A modifications in human cancer. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2020;19:405-412.
28. Zhao Y, Tao Z, Chen X. Identification of a three-m<sup>6</sup>A related gene risk score model as a potential prognostic biomarker in clear cell renal cell carcinoma. *PeerJ*. 2020;8:e8827.
29. Deng M, Blondeau JJ, Schmidt D, Perner S, Müller SC, Ellinger J. Identification of novel differentially expressed lncRNA and mRNA transcripts in clear cell renal cell carcinoma by expression profiling. *Genom Data*. 2015;5:173-175.
30. Ellinger J, Alam J, Rothenburg J, et al. The long non-coding RNA lnc-ZNF180-2 is a prognostic biomarker in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Am J Cancer Res*. 2015;5(9):2799-2807.
31. Schrödter S, Braun M, Syring I, et al. Identification of the dopamine transporter SLC6A3 as a biomarker for patients with renal cell carcinoma. *Mol Cancer*. 2016;15(1):10.
32. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep*. 2017;7:16878. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5>
33. Yang Z, Li J, Feng G, et al. MicroRNA-145 modulates N<sup>6</sup>-methyladenosine levels by targeting the 3'-untranslated mRNA region of the N<sup>6</sup>-methyladenosine binding YTH domain family 2 protein. *J Biol Chem*. 2017;292(9):3614-3623.
34. Dai D, Wang H, Zhu L, Jin H, Wang X. N<sup>6</sup>-methyladenosine links RNA metabolism to cancer progression. *Cell Death Dis*. 2018;9(2):124.
35. Xiao W, Adhikari S, Dahal U, et al. Nuclear m<sup>6</sup>A reader YTHDC1 regulates mRNA splicing. *Mol Cell*. 2016;61(4):507-519.
36. Adhikari S, Xiao W, Zhao Y-L, Yang Y-G. m<sup>6</sup>A: signaling for mRNA splicing. *RNA Biol*. 2016;13(9):756-759.
37. Liu S, Li G, Li Q, et al. The roles and mechanisms of YTH domain-containing proteins in cancer development and progression. *Am J Cancer Res*. 2020;10(4):1068-1084.
38. Hirschfeld M, Zhang B, Jaeger M, et al. Hypoxia-dependent mRNA expression pattern of splicing factor YT521 and its impact on oncological important target gene expression: impact of hypoxia-dependent YT521 splicing. *Mol Carcinog*. 2014;53(11):883-892.
39. Li F, Yi Y, Miao Y, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine modulates nonsense-mediated mRNA decay in human glioblastoma. *Cancer Res*. 2019;79(22):5785-5798.
40. Liu S, Li Q, Chen K, et al. The emerging molecular mechanism of m<sup>6</sup>A modulators in tumorigenesis and cancer progression. *Biomed Pharmacother*. 2020;127(110098):110098.
41. Liu X, Liu L, Dong Z, et al. Expression patterns and prognostic value of m<sup>6</sup>A-related genes in colorectal cancer. *Am J Transl Res*. 2019;11(7):3972-3991.
42. Liu T, Wei Q, Jin J, et al. The m<sup>6</sup>A reader YTHDF1 promotes ovarian cancer progression via augmenting EIF3C translation. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(7):3816-3831.
43. Liang Y, Zhan G, Chang K-J, et al. The roles of m<sup>6</sup>A RNA modifiers in human cancer. *J Chin Med Assoc*. 2020;83(3):221-226.
44. Wang X, Zhao BS, Roundtree IA, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency. *Cell*. 2015;161(6):1388-1399.
45. Wang X, Lu Z, Gomez A, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*. 2014;505(7481):117-120.
46. Maity A, Das B. N<sup>6</sup>-methyladenosine modification in mRNA: machinery, function and implications for health and diseases. *FEBS J*. 2016;283(9):1607-1630.
47. Li J, Meng S, Xu M, et al. Downregulation of N<sup>6</sup>-methyladenosine binding YTHDF2 protein mediated by miR-493-3p suppresses prostate cancer by elevating N<sup>6</sup>-methyladenosine levels. *Oncotarget*. 2018;9(3):3752-3764.
48. Li A, Chen Y-S, Ping X-L, et al. Cytoplasmic m<sup>6</sup>A reader YTHDF3 promotes mRNA translation. *Cell Res*. 2017;27(3):444-447.
49. Shi H, Wang X, Lu Z, et al. YTHDF3 facilitates translation and decay of N<sup>6</sup>-methyladenosine-modified RNA. *Cell Res*. 2017;27(3):315-328.
50. Lobo J, Barros-Silva D, Henrique R, Jerónimo C. The emerging role of epitranscriptomics in cancer: focus on urological tumors. *Genes (Basel)*. 2018;9(11):552.
51. Wu B, Su S, Patil DP, et al. Molecular basis for the specific and multivalent recognitions of RNA substrates by human hnRNP A2/B1. *Nat Commun*. 2018;9(1):420.

52. Dai S, Zhang J, Huang S, et al. HNRNPA2B1 regulates the epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells through the ERK/snail signalling pathway. *Cancer Cell Int.* 2017;17(1):12.

#### SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

**How to cite this article:** Hagen F, Gundert L, Strick A, et al. N<sup>6</sup>-Methyladenosine (m<sup>6</sup>A) readers are dysregulated in renal cell carcinoma. *Molecular Carcinogenesis.* 2021;60:354-362. <https://doi.org/10.1002/mc.23297>

### 3. Danksagung

Ich danke

meiner Familie, die mich zu jedem Zeitpunkt dieser Dissertation mit Rat, Tat, Geduld und Liebe unterstützt hat und ohne welche ich diese Arbeit niemals hätte schreiben können. Ohne eure Unterstützung schon zu Schulzeiten und über das gesamte Studium, letztendlich in meinem ganzen Leben, wäre es nie zu dieser Arbeit und ich nie zu meiner Approbation gekommen.

meinen Mitstreitern Larissa Gundert und Alexander Strick, die jede einzelne Minute im Labor, am PC und vor den verschiedensten Geräten zu einer absoluten Freude gemacht haben. Ich glaube, dass bei wenigen Doktorarbeiten und in wenigen Laboren so viel gelacht wurde und so eine tolle Atmosphäre geherrscht hat wie bei uns. Unsere auch über dieser Arbeit entstandene, gute Freundschaft ist mindestens so wichtig wie diese Arbeit.

meinem Doktorvater Prof. Dr. Jörg Ellinger, der zu jedem Zeitpunkt, egal zu welcher Tageszeit, egal zu welchem Thema und völlig unabhängig von eigenem Stress gerne mit Rat und Tat zu Seite stand. Eine Betreuung wie diese, bei der man immer guten Gewissens Fragen stellen konnte, eine so nette Betreuung, eine so angenehme und perfekt dosierte Art des Antreibens wünsche ich jedem Doktoranden.

unserer betreuenden Labormitarbeiterin und guten Seele Doris Schmidt, die diese Arbeit überhaupt erst möglich gemacht hat. Ohne dich, Doris, wären wir auch nach Jahren immer noch am Anfang, säßen immer noch an den PCRs und wären bestimmt schon lange verzweifelt. Ohne deine beruhigende, gut strukturierte und liebevolle Hilfe wäre diese Arbeit niemals entstanden.

allen Mitstreitern im Labor und in anderen Bereichen dieser Arbeit, insbesondere Chen-Ming Zhao, der uns bei so vielen Fragen selbstlos unterstützt hat, den Kollegen der Herzchirurgie für die netten Gespräche in den Pausen und die gute Zusammenarbeit und allen Freunden, Bekannten und Verwandten, die mich in dieser Zeit unterstützt und an mich geglaubt haben und an alle, die sich meine Klagen, Sorgen und Probleme bezüglich der Arbeit angehört haben.