

Analyse der zirkulierenden circRNA-Expression im Blut von Patienten mit einem Prostatakarzinom

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med. dent.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Lara Alexia Samirae

aus Bergisch Gladbach

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Ellinger
2. Gutachter: Prof. Dr. Verena Tischler

Tag der Mündlichen Prüfung: 18.08.2025

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie

Für all meine Lieben

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	6
1.	Deutsche Zusammenfassung	7
1.1	Einleitung	7
1.2	Material und Methoden	10
1.3	Ergebnisse	16
1.4	Diskussion	21
1.5	Zusammenfassung	24
1.6	Abbildungsverzeichnis	25
1.7	Tabellenverzeichnis	26
1.8	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	27
2.	Veröffentlichungen	30
3.	Erklärung zum Eigenanteil	31
4.	Danksagung	32
5.	Publikationen (PDF-Version)	33

Abkürzungsverzeichnis

BPH	benigne Prostatahyperplasie
cDNA	komplementäre DNS
circRNA	zirkuläre RNA
cM-Status	klinische Fernmetastasen
DRU	digital-rektale Untersuchung
gDNA	genomische DNS
miRNA	micro RNA
mRNA	messenger RNA
NTC	no template control / Negativkontrolle
RNase R	Ribonuclease R
RT	Reverse Transkriptase
PCA	Prostatakarzinom
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pre-mRNA	prä-messenger RNA
PSA	prostataspezifisches Antigen
qPCR	quantitative Real-Time PCR

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Zu den häufigsten Tumorerkrankungen des Mannes gehört das Prostatakarzinom (PCA), das laut amerikanischen Statistiken die zweithöchste Mortalitätsrate aufweist (Siegel et al., 2022). Aufgrund dieser Häufigkeit ist eine Früherkennung sinnvoll. Zur Früherkennung werden die digital-rektale Untersuchung (DRU) und die Bestimmung des prostataspezifischen Antigens (PSA) im Serum eingesetzt. Frühere Biomarker wie die Bestimmung des prostataspezifischen Antigens oder die digital-rektale Untersuchung weisen eine unzureichende Spezifität und Sensitivität auf. Ihre Werte können durch benigne Prostatahyperplasie, Prostatitis oder pharmakologische Einflüsse verfälscht werden. Zudem liefern sie nur begrenzte prognostische Informationen zur Tumoraggressivität und sind somit für eine sichere klinische Entscheidungsfindung oft ungeeignet. Die diagnostische Genauigkeit dieser Früherkennungsmaßnahmen ist daraus resultierend gering, weshalb eine hohe Anzahl an Prostatabiopsien zur Abklärung eines Tumorverdachts notwendig ist. Es besteht folglich Bedarf an der Etablierung von präzisen Biomarkern, um die Menge an unnötigen Prostatabiopsien zu verringern. Mit einem solchen Biomarker lässt sich die Diagnostik der Behandlung verbessern und die Sterblichkeit am Prostatakarzinom reduzieren (Lokeshwar et al., 2021). Ein vielversprechender Ansatz in diesem Kontext ist die Untersuchung zirkulärer RNAs (circRNAs) als potenzielle Biomarker für das Prostatakarzinom. Die Eignung von circRNAs als Biomarker bewerten wir anhand der folgenden Kriterien: Tumor- und Gewebespezifität, strukturelle Stabilität durch die zirkuläre Konformation, zuverlässige Nachweisbarkeit mittels quantitativer Real-Time PCR, Korrelation mit klinischen Parametern wie Gleason Score oder Tumorstadium sowie Reproduzierbarkeit in unabhängigen Patientenkohorten.

Zirkuläre RNAs (circRNAs) gehören zu den nichtkodierenden RNAs, die in den 1970er Jahren entdeckt wurden (Li et al., 2022). Zu dieser Zeit wurde angenommen, dass circRNAs ein irrelevantes Splicing-Produkt sind (Li et al., 2022). Heutzutage hat ein besseres Verständnis in der Molekularpathologie zu der Erkenntnis geführt, dass bestimmte circRNA-Expressionsmuster mit dem Auftreten verschiedener Krankheiten und Malignomen assoziiert sind und als Biomarker fungieren können (Liu et al., 2020).

CircRNAs lassen sich in Gewebe und Körperflüssigkeiten wie Plasma, Serum, Urin, Speichel (Liu et al., 2020; Ojha et al., 2018), aber auch in Exosomen oder Mitochondrien nachweisen (Wan et al., 2020).

Charakteristisch für circRNAs ist ihre zirkuläre Struktur, die über die 3'-Splicing-Donorseite mit der 5'-Akzeptorseite kovalent verbunden ist. CircRNAs haben im Gegensatz zu linearen RNAs weder einen 3'-Poly(A)-Schwanz noch eine 5'-Kappe, weshalb circRNAs eine erhöhte Stabilität und Resistenz gegenüber einem Endonuklease-Abbau besitzen (Ojha et al., 2018). Durch Exonskipping oder Backsplicing von mRNA (pre-mRNA) werden circRNAs synthetisiert (Liu et al., 2020). Klassifiziert werden circRNAs anhand ihrer genomischen Splice-Stelle, wobei die meisten circRNAs aus Exons kodierter Gene entstehen (Zhou et al., 2020).

Weitere circRNA-Klassifizierungen umfassen nichtkodierte Gene (Introns) sowie Kombinationen aus kodierten und nichtkodierten Genen: tRNA intronic-RNA, intronic-RNA oder exonic-intronic circRNA (Wan et al., 2020). CircRNAs können durch Interaktion mit miRNA (MicroRNA) sogenannte ‚miRNA-Schwämme‘ bilden oder sich durch inhibitorische oder promotorische Eigenschaften auf die Genexpression auswirken (Li et al., 2022; Lokeshwar et al., 2021; Wan et al., 2020). CircRNAs können die Proteinexpression durch die Regulation der Genexpression beeinflussen, dies geschieht bei der Translation oder auf der Ebene der Posttranslation (Liu et al., 2020). Obgleich heutzutage mehr über die Funktion der circRNA bekannt ist, sind die Kenntnisse über die circRNA-Expression im PCA begrenzt.

Um potentielle circRNA-Biomarker zu etablieren, wurden aus bereits veröffentlichten Studien zum PCA fünf circRNAs mit erhöhter Expression im PCA zur Untersuchung ausgewählt: circSMARCA5 (Dong et al., 2021; Kong et al., 2017; Liu et al., 2021; Zhang et al., 2021), circFOXO3 (Kong et al., 2020; Liu et al., 2021; Shen et al., 2020; Zhang et al., 2021), circHIPK3 (Cai et al., 2019; Chen D et al., 2019; Liu et al., 2021; Wen et al., 2020; Zhang et al., 2021), circZMIZ1 (Jiang et al., 2020; Liu et al., 2021; Zhang et al., 2021) und circSLC19A1 (Liu et al., 2021; Xia Q et al., 2018; Zhang et al., 2021; Zheng et al., 2020). Die zugrunde liegenden Gene decken zentrale Zellmechanismen ab: SMARCA5 wirkt als ATP-abhängige Chromatin-Remodelling-ATPase und erleichtert die Transkription (Dong et al., 2021; Kong et al., 2017), während FOXO3 als

Tumorsuppressor Zellzyklus-Arrest, DNA-Reparatur und Apoptose steuert (Kong et al., 2020; Shen et al., 2020). HIPK3 kodiert eine nukleäre Serin/Threonin-Kinase, die Homeobox-Transkriptionsfaktoren moduliert (Wen et al., 2020; Zhang et al., 2021), und ZMIZ1 fungiert als PIAS-ähnlicher Co-Aktivator, der insbesondere die Androgenrezeptor-abhängige Genexpression verstärkt (Jiang et al., 2020; Zhang et al., 2021). Schließlich bildet SLC19A1 den Reduced Folate Carrier 1, der Folat aktiv in die Zelle transportiert, die Nukleotidsynthese reguliert und damit das Zellwachstum beeinflusst (Xia Q et al., 2018; Zheng et al., 2020). Diese fünf circRNAs werden in dieser Studie untersucht, um das Wissen über circRNAs als Biomarker beim PCA zu erweitern. Limitationen der vorhergegangenen Studien waren kleine Fallzahlen sowie Vergleiche diagnostisch nicht relevanter Kohorten, zum Beispiel PCA-Patienten gegenüber gesunden Patienten (Kong et al., 2020; Shen et al., 2020).

1.2 Material und Methoden

1.2.1 Patientenproben

Das Patientenkollektiv umfasste 96 Patienten, bei denen zwischen Februar 2019 und Mai 2021 eine Prostatabiopsie in der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie des Universitätsklinikums Bonn durchgeführt wurde. Die Indikation zur Durchführung einer Prostatabiopsie wurde aufgrund einer Erhöhung des Serum-PSA > 4 ng/ml oder in Kombination mit einer auffälligen Tastuntersuchung (DRU) der Prostata gestellt. Bei den Patienten wurden Serumproben vor Durchführung der Biopsie prospektiv gesammelt. Die Blutentnahme erfolgte mit einer Serum-S-Monovette mit Gerinnungsaktivator (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland). Die Serumproben wurden nach 2 Stunden zentrifugiert und bei -80°C in der Biobank des Zentrums für integrierte Onkologie am Universitätsklinikum Bonn eingelagert. Die Durchführung der Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Bonn mit dem Votum 347/19 genehmigt.

1.2.2 RNA-Aufreinigung

Um lineare RNA aus dem Serum zu entfernen, wurde eine Behandlung mit RNase R (Lucigen, Teddington, Großbritannien) entsprechend der Herstellerinformationen durchgeführt. In jede 400- μL -Serumprobe wurde 0,05 U RNase R mit RNA-Inhibitor (4,0 μL ; N8080119) hinzugefügt. Die RNase-R-Behandlung wurde bei 37°C für die nächsten 30 Minuten vollzogen.

Die RNA-Isolation erfolgte nach Zugabe von 0,05 fmol/ μL cel-miR-39-Taq (Qiagen, Hilden, Deutschland) zur Probe. Dieses sogenannte ‚spike-in‘ von nicht menschlicher RNA erlaubt eine Bestimmung der RNA-Isolationseffizienz im Rahmen der PCR. Für die RNA-Isolation wurde das mirVana PARIS Isolationskit (Ambion, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

Schließlich wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt, um die gesamte RNA aufzureinigen. Zur Messung der RNA-Konzentration, wurde das NanoDrop 2000 Spektralphotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) verwendet. Anschließend wurden die Proben bei -80°C eingelagert.

1.2.3 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden das Prime Script Reagent Kit von (Takara, Saint-Germain-en Laye, Frankreich) genutzt. Als Positivkontrolle wurde das RNA-Isolat von LNCaP-Zellen verwendet. Bei den LNCaP-Zellen handelt es sich um androgenempfindliche, humane Prostata-Adenokarzinomzellen, die 1977 aus der einer supraklavikulären Lymphknotenmetastase eines 50-jährigen kaukasischen Manns kultiviert wurden. LNCaP-Zellen haben erhöhte Level von den in dieser Studie untersuchten circRNAs. Es wurde 500 ng RNase-R-behandelte RNA in 7 µL RNase-freiem Wasser verdünnt. Hinzugefügt wurden der Reaktionspuffer, RT-Enzym und der Random Hexamer Primer (Prime Script Reagent Kit von (Takara, Saint-Germain-en Laye, Frankreich).

Das Gesamtvolumen von 7 µL wurde bei 37 °C für 15 Minuten inkubiert und anschließend bei 85 °C für 5 Sekunden im Biometra TRIO Powered PCR Thermocycler (Analytik Jena, Jena, Deutschland) erhitzt. Für die Präamplifikation wurde das TB Green™ Premix Ex Taq II (Tli RNase H Plus, Takara) Kit verwendet. Als Reaktionsvolumen wurden 4,2 µL cDNA und ein Primer-Pool von 0,8 µL benutzt. Alle Reverse sowie Forward Primer waren im Primer Pool mit einer Konzentration von 0,5 µM enthalten. Mit dem Thermocycler wurde die Präamplifikation bei 95 °C für 30 Sekunden, mit 12 Zyklen Denaturierung bei 95 °C für 5 Sekunden und Annealing/Elongation bei 60 °C für 30 Sekunden durchgeführt. Abschließend wurden die präamplifizierten cDNA-Proben 1:10 mit einem Dilutionspuffer (EASY Dilution for real-time PCR, Takara) verdünnt und bei – 20 °C gelagert.

1.2.4 Quantitative Real-Time PCR

Für die quantitative Real-Time PCR wurde das Quantstudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystem by ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) verwendet. Durchgeführt wurde die Real-Time PCR mit 5 µL Takara TB Green Premix Ex Taq II (Takara, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) mit 1 µL RNA und 10 µM Reverse sowie Forward Primer. Die Serumproben wurden in einer Dreifachbestimmung auf 384-Well-PCR Platten angelegt, hinzugefügt wurden die folgenden Negativkontrollen: no template control (NTC), gDNA-Kontrolle, No-Reverse-Transcription-Kontrolle. Die Positivkontrolle bildete LNCaP.

Die quantitative c beinhaltet eine Enzymaktivierung für 30 Sekunden bei 95 °C, 45 Zyklen Denaturierung für 5 Sekunden mit abschließenden Annealing/Elongation für 30 Sekunden bei 60 °C. Bei den circRNAs circHIPK3, circFOXO3, circZMIZ1, circSLC19A1 erfolgte ein Vorheizen bei 78 °C, bei circSMARCA5 war dies nicht notwendig. Als Qualitätskontrolle wurden die Schmelzkurven analysiert. In der Schmelzkurvenanalyse haben wir die Primerkandidaten anhand von PCR-Zyklen in Bezug auf ihre Schmelztemperatur bewertet. Jede Schmelzkurve hat einen sigmoidalen Verlauf, wobei jede DNA (circRNA-Kandidat) einen spezifischen Schmelzpunkt bzw. eine spezifische Temperatur nach einer bestimmten Zykluslänge aufweist. Die Schmelzkurve sollte in der PCR-Dreifachbestimmung für die jeweiligen Kandidaten am gleichen Schmelzpunkt beginnen und aufsteigen, um ein deutliches PCR-Signal zu gewährleisten. Für die Berechnung der relativen Expressionslevel der jeweiligen circRNA wurde die QuantStudio 3D Analyse Suite Cloud Software verwendet. Dabei wurden die Proben mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Formel in Relation zum internen Referenzgen N4BP2L2 gesetzt.

Der in dieser Arbeit verwendete Primer für circSMARCA5 wurde aus der Studie von Kong et al. (2017) übernommen, in der mit genau diesem Primer eine erhöhte Konzentration von circSMARCA5 nachgewiesen wurde. Unser internes Referenzgen circN4BP2L2 stammte aus der Arbeit von Zhong et al. (2019). Die weiteren Primer wurden mit der Software CircInteractome (Dudekula et al., 2016) und circPrimer 2.0 (Zhong und Feng, 2022) als speziell divergente Primer entworfen. Zur Herstellung spezifischer divergenter Primer für circFOXO3, circHIPK3, circZMIZ1 und circSLC19A1 wurden mithilfe von CircInteractome und circPrimer 2.0 Primerkandidaten generiert, die das Backsplice-Junction-Motiv jeweils mit ≥ 5 bp Überhang auf beiden Exonseiten überspannen, sodass lineare Transkripte nicht amplifiziert werden. Anschließend prüften wir alle Kandidaten mit NCBI Primer-BLAST gegen das humane Genom; Primer mit unspezifischen Bindestellen oder ausgeprägter Dimerbildung wurden ausgeschlossen. Die Primer sind in Tabelle 1 aufgelistet, ein Beispiel für einen zirkulären Primer ist unter Abbildung 1 zu finden.

Tab. 1: Primersequenzen

circRNA-Primer	Primersequenz
circHIPK3-Forward	5'-ATA-GAC-TTT-GGG-TCG-GCC-AG-3'
circHIPK3-Reverse	5'-CAA-CTG-CTT-GGC-TCT-ACT-TTG-A-3'
circFOXO3-Forward	5'-AGT-GGG-CAA-AGC-AGA-ACT-CC-3'
circFOXO3-Reverse	5'-GTT-CCC-TCA-TTC-TGG-ACC-CG-3'
circZMIZ1-Forward	5'-AGC-AGG-ATG-GAG-CTG-GAG-TGA-3'
circZMIZ1-Reverse	5'-GCC-GTG-AGT-CCT-CAG-TGA-TCT-G-3'
circSLC19A1-Forward	5'-TTA-AGT-GAG-GTC-ACG-AAC-GAG-3'
circSLC19A1-Reverse	5'-GTA-GTC-GGT-GAG-CAG-GAA-CA-3'
circSMARCA5-Forward	5'-CTCCAAGATGGGCGAAAG-3'
circSMARCA5-Reverse	5'-TGTGTTGCTCCATGTCTAAT CA- 3'
circN4BP2L2-Forward	5'-CAA-AGA-CCT-CCT-CCT-CCA-CA-3'
circN4BP2L2-Reverse	5'-TCA-GTG-CTG-AAC-ACA-ATG-CC-3

CircRNA Kandidaten mit jeweiligem Forward und Reverse Primer.

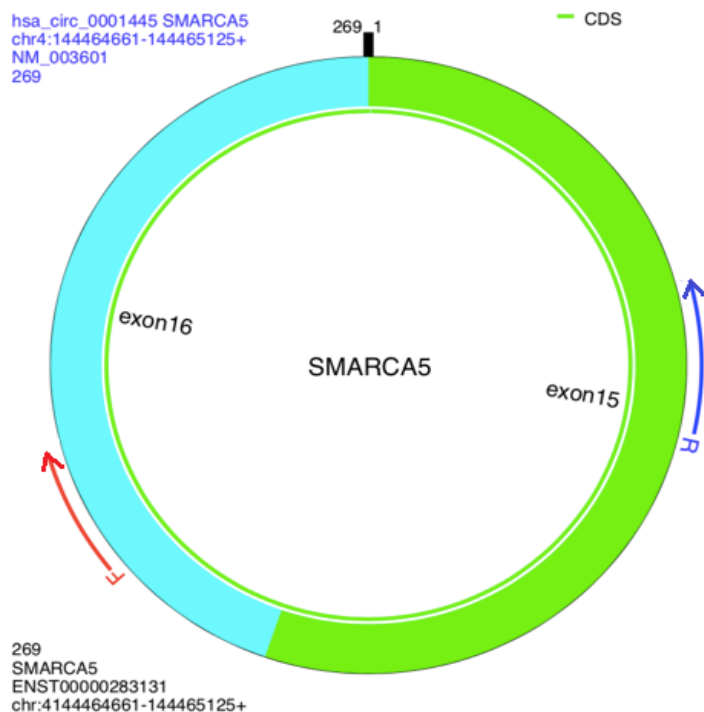


Abb. 1: Darstellung des circSMARCA5-Primer-Designs von Kong et al. (2017); Erstellung der Grafik mit CircPrimer Software 2.0. Die zirkuläre Struktur von circSMARCA5 wird als kreisförmige Darstellung mit einer Gesamtlänge von 269 Nukleotiden gezeigt. Das grüne Segment

markiert den Anteil von Exon 15, während das türkisfarbene Segment Exon 16 darstellt. Die schwarze Markierung 269_1 kennzeichnet die Backsplice-Junction. Ein blauer Forward-Primer und ein roter Reverse-Primer flankieren diese Junction divergierend, um eine spezifische Amplifikation der circRNA zu ermöglichen

Die Effizienz der Primer wurde anhand der PCR bestimmt. Es zeigten sich folgende PCR-Effizienzen: circZMIZ1 98,5 %, circFOXO3 113,3 %, circHIPK3 96,4 %, circSMARCA5 107,9 %, circN4BP2L2 103,8 % und circSLC19A1 113,5 %. Die Effizienz jedes Primer-paars ist ein zentraler Qualitätsparameter für RT-qPCR-Experimente, weil das $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Verfahren voraussetzt, dass sich das Amplifikat in jedem Zyklus nahezu verdoppelt. Abweichungen hiervon führen zu einer systematischen Unter- bzw. Überschätzung der tatsächlichen Transkriptmenge. Um die Effizienz zu bestimmen, wurden für jede circRNA sowie das Referenzgen fünffache, zehnfache Reihen-verdünnungen der LNCaP-cDNA in Triplicaten amplifiziert und die Ct-Werte gegen den Log10 der Eingabemenge aufgetragen. Ein Effizienzintervall von 90–110 % gilt als optimal; Werte von 110–115 % sind bei SYBR/TB-Green-Chemie akzeptabel. Alle in dieser Studie verwendeten Primer lagen in diesem Bereich (96,4–113,5 %), womit die Voraussetzung für eine verlässliche $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Analyse erfüllt ist. Die leicht erhöhte Effizienz von circFOXO3 (113,3 %) und circSLC19A1 (113,5 %) wurde durch eine Verlängerung der Annealing-Zeit getestet, führte jedoch zu keiner weiteren Verbesserung, sodass die Originalbedingungen beibehalten wurden.

Dazu wurde der M-Faktor von cel-miR-39 und circN4BP2L2 errechnet. Der M-Faktor stellt die Qualität des Referenzgens in Bezug zu den circRNAs dar. Sowohl cel-MiR-39 als auch circN4BP2L2 hatten einen M-Faktor von 1,367. Der M-Faktor beschreibt die Expressionsstabilität der Referenzgene relativ zu allen Zielgenen; je niedriger der Wert, desto stabiler das Gen. Für zellfreie Nukleinsäuren wird ein Grenzwert von $M < 1,5$ als ausreichend betrachtet. Unsere Analyse ergab für cel-miR-39 und circN4BP2L2 einen M-Faktor von 1,367. Da circN4BP2L2 im Gegensatz zu cel-miR-39 die gleiche zirkuläre Struktur aufweist wie die Ziel-circRNAs und somit die gleichen Isolations- und Amplifikationsbedingungen durchläuft, wurde es als alleiniges internes Referenzgen gewählt.

1.2.5 Statistik und Datenanalyse

Für die Auswertung der Statistik wurde SPSS IBM Statistics 25.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL, USA) verwendet. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant festgelegt. Für die Berechnung von klinischen Parametern, circRNA Expressionen sowie Korrelationen wurden der Kolmogorow-Smirnov-Test und der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Danach wurden die Ergebnisse analysiert.

1.3 Ergebnisse

1.3.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv setzt sich aus insgesamt 95 Patienten zusammen, davon 68 Patienten mit Prostatakarzinom (PCA) und 27 mit einem benignen histologischen Befund (benigne Prostatahyperplasie, chronische/floride Prostatitis). Die Patientenproben mit benignem histologischem Befund fungieren als Kontrollgruppe (CTRL). Die Serumproben von 96 Patienten wurden untersucht, eine Probe wurde aufgrund von geringer RNA-Isolierung/Extraktion ausgeschlossen. Die detaillierten Informationen zu den klinisch-pathologischen Parametern sind in Tabelle 2 beschrieben.

Tab. 2: Kohorteninformationen

Parameter	Kontrollgruppe (n = 27)	PCA (n = 68)
Alter		
Durchschnitt	65,5	68,5
Min.-Maximum	50-72	39-85
Mittelwert	66	70
DRU		
Auffällig	7 (26 %)	33 (48,5 %)
PSA		
Durchschnitt	10,3 ng/ml	61,7 ng/ml
Minimum	1,6 ng/ml	1,18 ng/ml
Maximum	40 ng/ml	1893 ng/ml
Mittelwert	7,7 ng/ml	8,9 ng/ml
D'Amico Klassifikation		
niedriges Risiko		6 (8,9 %)
intermediäres Risiko		23 (33,9 %)
hohes Risiko		37 (54,4 %)
ISUP-Gruppe		
1		6 (8,8 %)
2		22 (32,4 %)
3		9 (13,2 %)
4		9 (13,2 %)
5		22 (32,4 %)
Fernmetastasen		
cM1		16 (23,5 %)

Die Kontrollgruppe (CTRL) setzte sich aus 27 Männern mit benignem histologischem Befund zusammen. 68 Männer mit Prostatakarzinom bildeten die PCA-Untersuchungsgruppe. Alter, PSA und DRU sind für beide Gruppen vergleichbar. Die Abbildung wurde modifiziert nach dem englischen Original.

1.3.2 RNA-Extraktion

Von den 95 Patientenproben wurde die durchschnittliche RNA-Extraktionsrate berechnet, diese lag bei 6,1 % (0,2 – 22,7 %). Für die quantitative Real-Time PCR nahmen wir circN4BP2L2 als Referenzgen, da dieses nicht von der RNA-Extraktionsrate beeinflusst wird. Gleichzeitig ermöglichte die Verwendung von circN4BP2L2 eine besser kontrollierbare Probeneffizienz, da circN4BP2L2 sowie die anderen untersuchten circRNAs eine zirkuläre Struktur besitzen. Die Level verschiedener circRNAs im Serum korrelierten zum Teil miteinander, was in Tabelle 3 veranschaulicht wird.

Tab. 3: Korrelationen zwischen den circRNA-Leveln

	circHIPK3	circFOXO3	circZMIZ1	circSLC19A1	circSMARCA5
circHIPK3	/	P = 0,444	P = 0,231	P = 0,001	P < 0,001
circFOXO3	P = 0,444	/	P = 0,054	P < 0,001	P = 0,137
circZMIZ1	P = 0,231	P = 0,054	/	P < 0,001	P = 0,464
circSLC19A1	P = 0,001	P < 0,001	P < 0,001	/	P < 0,001
circSMARCA5	P < 0,001	P = 0,137	P = 0,464	P < 0,001	/

Ein p-Wert von < 0,05 gilt als statistisch signifikant.

1.3.3 Diagnostische Bedeutung von circRNAs

Die Expression der untersuchten circRNAs circSMARCA5 (p = 0,954), circHIPK3 (p = 0,720), circZMIZ1 (p = 0,166), circFOXO3 (p = 0,263) und circSLC19A1 (p = 0,735) zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proben mit PCA und der Kontrollgruppe (CTRL), was in Abbildung 2 veranschaulicht wird.

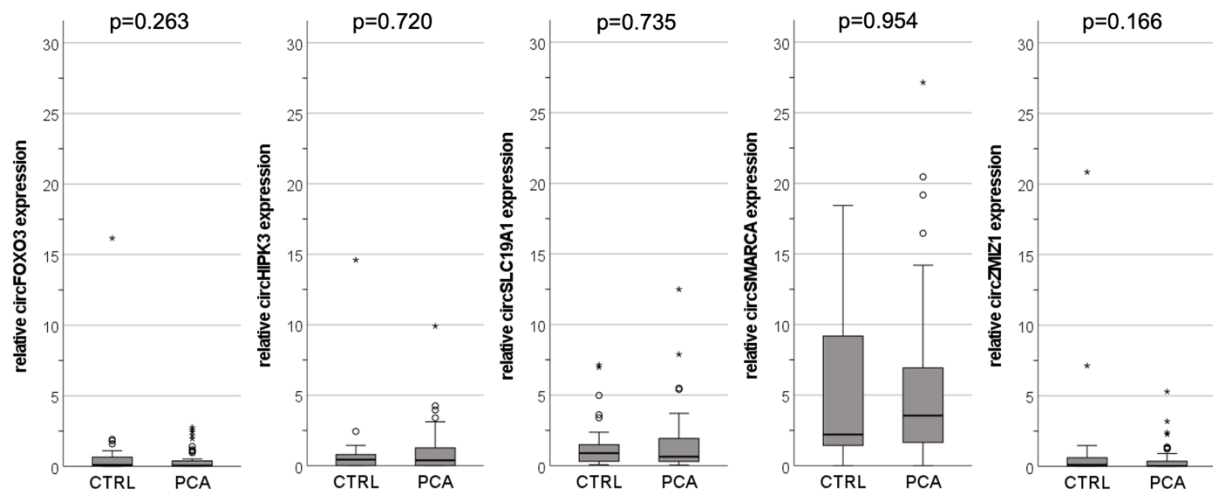


Abb. 2: CircRNA-Level im Serum von Patienten mit Prostatakarzinom (PCA) versus nichtmaligner Prostatahistologie (CTRL) in der Prostatabiopsie. Die fünf nebeneinanderliegenden Box-Whisker-Plots zeigen die relativen Expressionswerte von circFOXO3, circHIPK3, circSLC19A1, circSMARCA5 und circZMIZ1. Die Box repräsentiert den Interquartilsabstand, der Strich darin den Median und einzelne Punkte oder Sterne kennzeichnen Ausreißer. Alle p-Werte ($> 0,05$) zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, sodass diese circRNAs in dieser Kohorte allein keine ausreichende diagnostische Trennschärfe zwischen malignen und benignen Prostatabefunden bieten.

1.3.4 Prognostische Bedeutung von circRNAs

Es konnten verschiedene Korrelationen von klinischen Parametern der Patienten mit einem Prostatakarzinom und den circRNAs beobachtet werden. Die Expression von circSLC19A1 ($p = 0,035$) und circZMIZ1 ($p = 0,045$) korrelierte mit dem PSA-Level im Serum (s. Abbildung 3). CircZMIZ1 zeigte bei Patienten mit einem metastasierten PCA ein erhöhtes Expressionslevel ($p = 0,010$). Es fanden sich keine Korrelationen von circRNA Leveln und klinischen Parametern wie Prostatavolumen, DRU, D'Amico-Risikoklassifizierung oder ISUP-Klassifikation ($p > 0,05$; s. Tabelle 4).

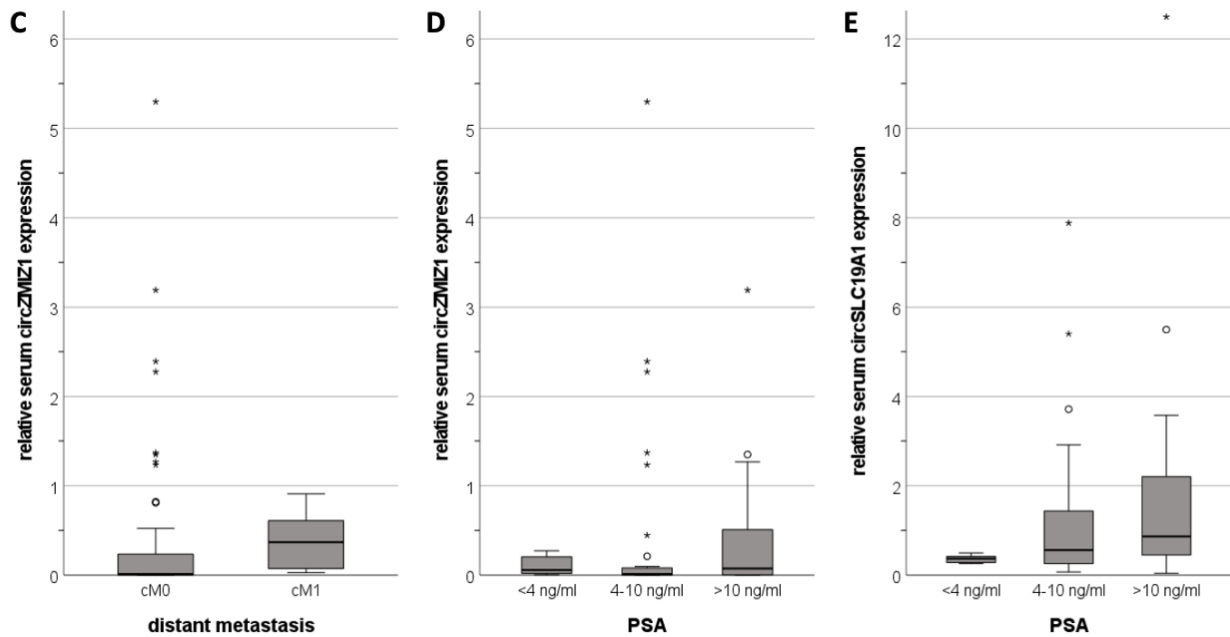


Abb. 3: Korrelation von circZMIZ1 und circSLC19A1 mit PSA bzw. Metastasen. Das Vorhandensein von Fernmetastasen bei Diagnosestellung ist mit einer erhöhten Konzentration von circZMIZ1 im Serum korreliert. Zudem zeigte sich eine Korrelation von circZMIZ1 und circSLC19A1 mit dem Serum PSA bei Patienten mit einem Prostatakarzinomnachweis. In der Metastasengruppe (cM1) liegt das circZMIZ1-Level im Median mehr als doppelt so hoch wie bei cM0-Patienten, was die Assoziation zur Tumorausbreitung unterstreicht. Mit steigenden PSA-Kategorien nehmen sowohl circZMIZ1 als auch circSLC19A1 Werte deutlich zu und spiegeln damit die wachsende Tumorlast wider. Insgesamt legt die Abbildung nahe, dass circZMIZ1 als Metastasierungsindikator und beide circRNAs als ergänzende Marker zur PSA-basierten Tumorlastabschätzung genutzt werden können. Es handelt sich hierbei um die Originalabbildung aus der englischen Veröffentlichung.

Tab. 4: Korrelationen zwischen circRNA und klinischen Parametern

	circHIPK3	circFOXO3	circZMIZ1	circSLC19A1	circSMARCA5
DRU	P = 0,136	P = 0,828	P = 0,065	P = 0,245	P = 0,730
ISUP Grad	P = 0,894	P = 0,848	P = 0,601	P = 0,962	P = 0,249
D'Amico Klassifikation	P = 0,673	P = 0,750	P = 0,459	P = 0,848	P = 0,715
cM-Status	P = 0,909	P = 0,428	P = 0,010	P = 0,153	P = 0,090
PSA (ng/ml)	P = 0,718	P = 0,768	P = 0,045	P = 0,035	P = 0,356
Prostata-volumen	P = 0,605	P = 0,975	P = 0,463	P = 0,793	P = 0,980

Für jede circRNA wurde der Serumspiegel mit den klinischen Parametern mittels Rangkorrelation in Beziehung gesetzt; die Tabelle zeigt den jeweiligen klinischen Parameter und den zugehörigen p-Wert, wobei $p < 0,05$ als statistisch signifikant gilt. Signifikante Ergebnisse sind fett hervorgehoben. In dieser Auswertung fanden sich drei Signifikanzbefunde: circZMIZ1 korrelierte positiv mit dem Ausgangs-PSA ($p = 0,045$) und war bei Patienten mit Fernmetastasen erhöht ($p = 0,010$), während circSLC19A1 ebenfalls eine positive Korrelation zum PSA aufwies ($p = 0,035$).

1.4 Diskussion

Für die PCA-Diagnose ist nach wie vor eine Prostatabiopsie nötig, diese wird bei einer Indikation wie einem erhöhten PSA-Wert oder nach auffälliger Tastuntersuchung durchgeführt.

Die Biopsie stellt im Kontrast zu diesen unspezifischen Indikationen eine invasive Methode dar, um die Diagnose eines PCA festzustellen. Infolgedessen wäre eine nichtinvasive, diagnostische Methode ein wünschenswertes Prozedere, um die Anzahl unnötiger Biopsien zu verringern. Für die Feststellung eines PCA ist also ein Biomarker wünschenswert, der spezifisch genug ist und gleichzeitig mit seiner Nichtinvasivität dem Patienten vermeidbare Umstände erspart sowie der Klinik medizinisch einfach durchführbare Möglichkeiten der Diagnose stellt.

CircRNAs haben im Vergleich zu anderen RNAs eine längere Halbwertszeit und reichern sich in diversen Körperflüssigkeiten an, was sie zu einem potenziellen ‚Liquid-Biopsy‘-Biomarker macht (Liu et al., 2020; Ojha et al., 2018; Vo et al., 2019).

Zudem sind circRNAs resistent gegenüber einem Abbau durch RNasen, und erwiesen sich als tumor- und gewebespezifisch (Chen S et al., 2019; Ojha et al., 2018; Xia S et al., 2018). Basierend auf diesen Eigenschaften war das Ziel dieser Studie, das Potenzial der circRNAs als nichtinvasive diagnostische und prognostische Biomarker zu evaluieren.

In früheren Studien wurde die erhöhte Expression von circFOXO3 (Zhang et al., 2021), circHIPK3, circSLC19A1 (Ge et al., 2020; Zheng et al., 2020), circSMARCA5 (Dong et al., 2021; Kong et al., 2017) und circZMIZ1 (Jiang et al., 2020) untersucht und eine erhöhte Konzentration von circRNAs in PCA-Gewebe festgestellt. Nur in wenigen vorhergegangenen Arbeiten wird ein direkter Vergleich von Plasma oder Serum zu Gewebe gezogen. CircZMIZ1 wird in der Studie von Jiang et al. (2020) im Plasma sowie in Zelllinien untersucht, während Kong et al. (2020) circFOXO3 im Serum und Gewebe analysieren. Im Gegensatz dazu konnten wir keine erhöhte circRNA-Konzentration beziehungsweise keinen Unterschied im Blut von Patienten mit und ohne PCA feststellen.

Im Vergleich zu früheren Studien wird jedoch Folgendes deutlich, was den Unterschied der Messungen erklären kann: Einige Kohorten bestanden aus frisch entnommenem PCA-Gewebe und wurden mit dem patientengleichen, gesunden Prostata-Nebengewebe

als Kontrollgruppe verglichen (Cai et al., 2019; Chen D et al., 2019; Dong et al., 2021; Ge et al., 2020; Jiang et al., 2020; Kong et al., 2017; Kong et al., 2020; Shen et al., 2020; Xia Q et al., 2018). Dies kann zu einer Überschätzung des diagnostischen Potenzials der circRNAs führen.

Des Weiteren wurden kleinere Patientenkollektive verwendet, 14 Plasmaproben bei Jiang et al. (2020) und 26 Serumproben bei Kong et al. (2020). Kohorten, die Gewebeproben inklusive Zelllinien untersuchten, schwankten von 5 PCA-Gewebeproben (Ge et al., 2020) zu 21–60 PCA-Proben (Kong et al., 2017; Shen et al., 2020) bis einmalig 173 Prostatastanzbiopsie-Proben bei Xia Q et al. (2018). Die überwiegende Anzahl an kleinen Kohorten schmälert die Aussagekraft der vorangegangenen Studien.

Letztlich ist eine erhöhte circRNA-Expression im Gewebe oder in Zelllinien nicht zwangsläufig mit einer erhöhten Konzentration von circRNAs in den Körperflüssigkeiten der PCA-Patienten gleichzusetzen (Cai et al., 2019; Ge et al., 2020; Zheng et al., 2020), da der Anteil der circRNA im Blut im Vergleich auch deutlich geringer ausfallen kann, was die Aussagekraft für eine ‚liquid-biopsy‘ schwächt (Liu et al., 2020; Ojha et al., 2018; Vo et al., 2019).

Ein weiterer Punkt, der bei der Analyse potenzieller Biomarker zu berücksichtigen ist, betrifft den Zusammenhang mit bestimmten klinischen Parametern (s. Tabelle 4). CircSLC19A1 wurde in der Arbeit von Xia Q et al. (2018) untersucht, unter anderem mit dem Ergebnis, dass circSLC19A1 mit dem Alter der Patienten ($p < 0,010$), dem Gleason Score ($p < 0,010$) sowie dem PSA-Wert ($p = 0,026$) korrelierte. CircSLC19A1 korrelierte auch in unseren Ergebnissen mit dem PSA-Wert ($p = 0,035$). Weitere klinische Korrelationen fanden wir nicht. Dieser Unterschied kann darauf zurückzuführen sein, dass in der Arbeit von Xia Q et al. (2018) ausschließlich mit Gewebeproben gearbeitet wurde. In der Studie von Jiang et al. (2020) wurde die Expression von circZMIZ1 im Plasma untersucht, die Ergebnisse zeigten eine erhöhte Expression von circZMIZ1 im Plasma von PCA-Patienten. Diese Aussage wird auch von unserem Ergebnis gestützt, circZMIZ1 korrelierte mit dem iPSA ($p = 0,045$).

Zudem korrelierte circZMIZ1 mit dem Vorhandensein von Metastasen (cM-Status) zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ($p = 0,010$), was eine Einschätzung des Staging/Grading des Tumors zulässt. Zusammenfassend haben sich circZMIZ1 und circSLC19A1 als vielversprechende Biomarker herauskristallisiert (s. Tabelle 4).

Weiterhin könnte die Verwendung unterschiedlicher Referenzgene zu divergierenden Ergebnissen führen. In den anderen Studien wurde weitestgehend mit linearen Referenzgenen GAPDH (Cai et al., 2019), U6 snRNA (Shen et al., 2020) und Beta-Actin (Kong et al., 2017) oder mit Epithelzelllinien der Prostata HPEpic (Xia Q et al., 2018) gearbeitet. Wie bereits dargelegt, kann das Potenzial der circRNAs als Biomarker überschätzt werden, wenn sie mit gesunden Kontrollgruppen, bzw. Epithelzelllinien als Referenzgen verglichen werden (Shen et al., 2020). In der Arbeit von Zhong et al. (2019) wird gezeigt, dass circHIKP3 und circN4BP2L2 im Vergleich zu linearen Kontrollgenen wie GAPDH oder Beta-Actin stabilere interne Referenzgene sind.

Da circHIKP3 öfters in verschiedenen Karzinomen stark exprimiert erscheint, wie unter anderem auch im PCA, ist die Verwendung als Referenzgen an dieser Stelle nicht zielführend. In unseren Ergebnissen mit Errechnung des M-Faktors von GAPDH und circN4BP2L2 konnten wir keinen signifikanten Unterschied feststellen. Da jedoch circN4BP2L2 weder die RNA-Extraktion noch die RNA-Isolierung durchläuft und ausschließlich ab der Präamplifikation beigefügt wird, können anfängliche technische Fehler im Protokoll vermieden werden. Somit kann ein stabileres internes Referenzgen gewährleistet werden. CircRNAs erweisen sich zudem als stabilere Referenzgene aufgrund ihrer Halbwertszeit, die höher ist als die einer linearen RNA (Zhong et al., 2019). Da die Real-Time PCR maßgeblich von der Stabilität des internen Referenzgens abhängt (Zhong et al., 2019), sollten die Faktoren, die dieses beeinflussen könnten, möglichst geringgehalten werden.

1.5 Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom ist eine der häufigsten malignen Erkrankungen des Mannes; die etablierten Früherkennungsverfahren – Serum-PSA und digital-rektale Untersuchung – sind jedoch nur mäßig spezifisch und sensibel. Um eine nichtinvasive Ergänzung oder Alternative zu entwickeln, wurden fünf zirkuläre RNAs (circSMARCA5, circFOXO3, circHIPK3, circZMIZ1, circSLC19A1) als potenzielle Biomarker untersucht. Hierfür entnahmen wir vor der Prostatabiopsie Serumproben von 96 konsekutiven Patienten (95 auswertbar), entfernten lineare Transkripte enzymatisch mit RNase R und quantifizierten die circRNAs mittels RT-qPCR. Divergente Primer wurden mit CircInteractome, circPrimer 2.0 und Primer-BLAST entworfen; ihre Effizienzen lagen zwischen 96 % und 113 %. Das zirkuläre Referenzgen circN4BP2L2 (M-Faktor 1,367) gewährleistete eine stabile Normalisierung der Messungen. Seine Ringstruktur verleiht ihm dieselbe RNase-R-Resistenz und Extraktionseffizienz wie den Ziel-circRNAs. Lineare Housekeeping-Gene würden hier anfälliger für Abbau sein und könnten die Stabilität von circRNAs unterschätzen, weshalb ein zirkuläres Referenzgen die Vergleichbarkeit der Ct-Werte deutlich erhöht.

Keine der fünf circRNAs unterschied sich signifikant zwischen Tumor- und Kontrollseren, sodass sich aus der Analyse keine diagnostische Information ableiten ließ. Dagegen korrelierten circZMIZ1 ($p = 0,045$) und circSLC19A1 ($p = 0,035$) mit steigenden PSA-Werten, und circZMIZ1 war bei Patienten mit Fernmetastasen deutlich erhöht ($p = 0,010$).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die untersuchten circRNAs alleine nicht zur Erstdiagnose eines PCA geeignet sind, unterstreichen aber das prognostische Potenzial von circZMIZ1 als möglicher Metastasen-Indikator sowie von circSLC19A1 als Spiegel der PSA-abhängigen Tumorlast. Abweichungen zu früheren Gewebestudien lassen sich plausibel auf den Einsatz einer größeren, klinisch repräsentativen Serumkohorte zurückführen. Zukünftige Studien sollten das Potenzial von circZMIZ1 als nichtinvasiven Biomarker für Diagnose und Verlaufskontrolle des Prostatakarzinoms weiter evaluieren

1.6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung des circSMARCA5-Primer-Designs von Kong et al. (2017)	13
Abbildung 2: CircRNA-Level im Serum von Patienten mit Prostatakarzinom (PCA) versus nichtmaligner Prostatahistologie (CTRL) in der Prostatabiopsie	18
Abbildung 3: Korrelation von circZMIZ1 und circSLC19A1 mit PSA bzw. Metastasen. Originalabbildung aus der englischen Veröffentlichung	19

1.7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primersequenzen	13
Tabelle 2: Kohorteninformationen	16
Tabelle 3: Korrelationen zwischen den circRNA-Leveln	17
Tabelle 4: Korrelationen zwischen circRNA und klinischen Parametern	20

1.8 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Cai C, Zhi Y, Wang K, Zhang P, Ji Z, Xie C, Sun F. CircHIPK3 overexpression accelerates the proliferation and invasion of prostate cancer cells through regulating miRNA-338-3p. *Onco Targets Ther.* 2019; 12: 3363-3372

Chen D, Lu X, Yang F, Xing N. Circular RNA circHIPK3 promotes cell proliferation and invasion of prostate cancer by sponging miR-193a-3p and regulating MCL1 expression. *Cancer Manag Res.* 2019; 11: 1415-1423

Chen S, Huang V, Xu X, Livingstone J, Soares F, Jeon J, Zeng Y, Hua JT, Petricca J, Guo H, Wang M, Yousif F, Zhang Y, Donmez N, Ahmed M, Volik S, Lapuk A, Chua MLK, Heisler LE, Foucal A, Fox NS, Fraser M, Bhandari V, Shiah YJ, Guan J, Li J, Orain M, Picard V, Hovington H, Bergeron A, Lacombe L, Fradet Y, Tetu B, Liu S, Feng F, Wu X, Shao YW, Komor MA, Sahinalp C, Collins C, Hoogstrate Y, Jong M, Fijneman RJA, Fei T, Jenster G, Van der Kwast T, Bristow RG, Boutros PC, He HH. Widespread and Functional RNA Circularization in Localized Prostate Cancer. *Cell* 2019; 176: 831-843.e22

Dong C, Fan B, Ren Z, Liu B, Wang Y. CircSMARCA5 Facilitates the Progression of Prostate Cancer Through miR-432/PDCD10 Axis. *Cancer Biother Radiopharm* 2021; 36: 70-83

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

Ge S, Sun C, Hu Q, Guo Y, Xia G, Mi Y, Zhu L. Differential expression profiles of circRNAs in human prostate cancer based on chip and bioinformatic analysis. *Int J Clin Exp Pathol.* 2020; 13: 1045-1052

Jiang H, Lv DJ, Song XL, Wang C, Yu YZ, Zhao SC. Upregulated circZMIZ1 promotes the proliferation of prostate cancer cells and is a valuable marker in plasma. *Neoplasma* 2020; 67: 68-77

Kong Z, Wan X, Lu Y, Zhang Y, Huang Y, Xu Y, Liu Y, Zhao P, Xiang X, Li L, Li Y. Circular RNA circFOXO3 promotes prostate cancer progression through sponging miR-29a-3p. *J Cell Mol Med*. 2020; 24: 799-813

Kong Z, Wan X, Zhang Y, Zhang P, Zhang Y, Zhang X, Qi X, Wu H, Huang J, Li Y. Androgen-responsive circular RNA circSMARCA5 is up-regulated and promotes cell proliferation in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017; 493: 1217-1223

Li W, Liu JQ, Chen M, Xu J, Zhu D. Circular RNA in cancer development and immune regulation. *J Cell Mol Med*. 2022; 26: 1785-1798

Liu J, Zhang X, Yan M, Li H. Emerging Role of Circular RNAs in Cancer. *Front Oncol*. 2020; 10: 663

Liu X, Tong Y, Xia D, Peng E, Yang X, Liu H, Ye T, Wang X, He Y, Ye Z, Chen Z, Tang K. Circular RNAs in prostate cancer: Biogenesis, biological functions, and clinical significance. *Mol Ther Nucleic Acids* 2021; 26: 1130-1147

Lokeshwar SD, Klaassen Z, Saad F. Treatment and trials in non-metastatic castration-resistant prostate cancer. *Nat Rev Urol*. 2021; 18: 433-442

Ojha R, Nandani R, Chatterjee N, Prajapati VK. Emerging Role of Circular RNAs as Potential Biomarkers for the Diagnosis of Human Diseases. *Adv Exp Med Biol*. 2018; 1087: 141-157

Shen Z, Zhou L, Zhang C, Xu J. Reduction of circular RNA Foxo3 promotes prostate cancer progression and chemoresistance to docetaxel. *Cancer Lett*. 2020; 468: 88-101

Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin*. 2022; 72: 7-33

Vo JN, Cieslik M, Zhang Y, Shukla S, Xiao L, Zhang Y, Wu YM, Dhanasekaran SM, Engelke CG, Cao X, Robinson DR, Nesvizhskii AI, Chinnaiyan AM. The Landscape of Circular RNA in Cancer. *Cell* 2019; 176: 869-881.e13

Wan B, Liu B, Lv C. Progress of research into circular RNAs in urinary neoplasms. *PeerJ* 2020; 8: e8666

Wen J, Liao J, Liang J, Chen XP, Zhang B, Chu L. Circular RNA HIPK3: A Key Circular RNA in a Variety of Human Cancers. *Front Oncol.* 2020; 10: 773

Xia Q, Ding T, Zhang G, Li Z, Zeng L, Zhu Y, Guo J, Hou J, Zhu T, Zheng J, Wang J. Circular RNA Expression Profiling Identifies Prostate Cancer- Specific circRNAs in Prostate Cancer. *Cell Physiol Biochem.* 2018; 50: 1903-1915

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

Zhang C, Yang Q, Li W, Kang Y, Zhou F, Chang D. Roles of circRNAs in prostate cancer: Expression, mechanism, application and potential. *Int J Biochem Cell Biol.* 2021; 134: 105968

Zheng Y, Li JX, Chen CJ, Lin ZY, Liu JX, Lin FJ. Extracellular vesicle-derived circ_SLC19A1 promotes prostate cancer cell growth and invasion through the miR-497/septin 2 pathway. *Cell Biol Int.* 2020; 44: 1037-1045

Zhong S, Feng J. CircPrimer 2.0: a software for annotating circRNAs and predicting translation potential of circRNAs. *BMC Bioinformatics.* 2022; 23: 215

Zhong S, Zhou S, Yang S, Yu Xinnian, Xu Hanzi, Wang J, Zhang Q, Lv M, Feng J. Identification of internal control genes for circular RNAs. *Biotechnol Lett.* 2019; 41: 1111-1119

Zhou M, Xiao MS, Li Z, Huang C. New progresses of circular RNA biology: from nuclear export to degradation. *RNA Biol.* 2020; 18: 1365-1373

2. Veröffentlichungen

Dieser Publikationsdissertation liegt die folgende, unabhängig begutachtete Veröffentlichung zugrunde:

Samirae L, Krausewitz P, Alajati A, Kristiansen G, Ritter M, Ellinger J. The relevance of circRNAs in serum of patients undergoing prostate biopsy. *Int J Urol*. 2024; 31 (5): 578-580

<https://doi.org/10.1111/iju.15414>

3. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit entstand in der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie des Universitätsklinikums Bonn unter der Betreuung von Prof. Dr. med. Jörg Ellinger. Die Planung und Konzeption der Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Glen Kristiansen (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Bonn), Dr. med. Philipp Krausewitz (Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie, Universitätsklinikum Bonn), Abdullah Alajati, PhD (Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie, Universitätsklinikum Bonn) sowie Prof. Dr. med. Manuel Ritter (Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie, Universitätsklinikum Bonn). Sämtliche Versuche und Laborarbeiten habe ich nach Einarbeitung durch Prof. Dr. med. Jörg Ellinger eigenständig durchgeführt. Das für die Arbeit verwendete Datenmaterial wurde mit Prof. Dr. med. Jörg Ellinger besprochen und interpretiert, die schriftliche Ausarbeitung erfolgte eigenständig. Die statistischen Abbildungen habe ich überwiegend erstellt, in geringem Umfang wurden grafische Darstellungen von Prof. Dr. med. Ellinger beigesteuert.

Bezogen auf die englische Publikation entsprechen die individuellen Beiträge den dort ausgewiesenen Autorenbeiträgen. Mein Eigenanteil umfasste die Untersuchung, die Methodik, die formale Analyse, die Datenkuratierung, die Visualisierung sowie das Verfassen des englischen Originalentwurfs. Dr. med. Philipp Krausewitz war an der Konzeption beteiligt, übernahm Aufgaben der Supervision und unterstützte die redaktionelle Überarbeitung. Abdullah Alajati, PhD, trug zur Methodik bei, stellte Ressourcen zur Verfügung, übernahm Supervisionsaufgaben und wirkte an der Überarbeitung mit. Prof. Dr. med. Glen Kristiansen unterstützte die Arbeit durch Supervision und Ressourcen. Prof. Dr. med. Manuel Ritter war an der Konzeption beteiligt, übernahm die Projektadministration, stellte Ressourcen bereit, war in die Supervision eingebunden und beteiligte sich an der redaktionellen Überarbeitung. Prof. Dr. med. Jörg Ellinger war in Konzeption, Methodik, Projektadministration und Untersuchung eingebunden und wirkte darüber hinaus am Verfassen des englischen Originalentwurfs mit. Hiermit bestätige ich, die Dissertationsschrift eigenständig verfasst und ausschließlich die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

4. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Jörg Ellinger für seine herausragende, inspirierende Betreuung und Frau Doris Schmidt für ihre wertvollen Ratschläge und ihre unerschöpfliche Geduld. Ein herzliches Dankeschön geht auch an meine Familie, meinen Partner und meine Freunde für ihre stetige Unterstützung und ihre unermüdliche Motivation.

5. Publikationen (PDF-Version)

Urological Notes

The relevance of circRNAs in serum of patients undergoing prostate biopsy

Lara Samirae,¹ Philipp Krausewitz,¹  Abdullah Alajati,¹ Glen Kristiansen,² Manuel Ritter¹ and Jörg Ellinger¹ 

Abbreviations & Acronyms

AR-V7 = androgen receptor splice variant 7
circRNAs = circular RNAs
PCA = prostate cancer
pre-mRNA = precursor mRNA

¹Universitätsklinikum Bonn, Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie, Bonn, Germany,

²Universitätsklinikum Bonn, Institut für Pathologie, Bonn, Germany

joerg.ellinger@ukbonn.de

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](#) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

DOI: 10.1111/iju.15414

First discovered in the 1970s, circular RNAs (circRNAs) were considered as unimportant RNA splicing products. circRNAs are described as a stable type of endogenous non-coding RNA, which is synthesized by back-splicing of the precursor mRNA (pre-mRNA). circRNAs consist of a loop structure with covalent bonds of head and tail. Lacking a 3' end, circRNAs are more resistant to digestion by exonucleases compared with linear RNA. circRNAs are associated with various diseases like neurodegenerative, metabolic, and cardiovascular disorders as well as cancer, and it is assumed that circRNAs could be used as biomarkers. The knowledge about circRNAs in prostate cancer (PCA) is limited. Earlier studies investigated the expression of circRNAs in PCA tissue, indicating the upregulation of several circRNAs.^{1–7} in circHIPK3, circFOXO3, circZMIZ1, circSLC19A1, and circSMARCA5 were overexpressed in PCA and could therefore be of potential interest as novel biomarker.

We prospectively enrolled 96 patients scheduled for prostate biopsy between February 2019 and May 2021; see Figure 1 for clinicopathological parameters of the study cohort. All patients underwent prostate biopsy for suspicion of PCA at the Department of Urology at the University Hospital Bonn. All patients provided written informed consent prior to inclusion in the study. The study was approved by the ethics committee of the University of Bonn (vote 347/19). Serum samples were treated with RNaseR to remove linear RNA prior to RNA isolation. Thereafter, serum RNA was reverse transcribed and pre-amplified. Quantitative real-time PCR was used to determine circRNA expression; the use of divergent primers allowed specific amplification of circRNAs. Relative circRNA expression levels in cell-free serum RNA were calculated using circN4BP2L2 as a reference gene. The detailed experimental protocol including a detailed summary of the study cohort is available upon request from the authors.

The recovery of serum RNA was determined using a spike-in of cel-miR-39 at the beginning of the RNA isolation procedure and quantification of cel-miR-39 using qPCR. RNA isolation failed in one patient; thus, the cohort consisted of 68 patients with PCA and 27 patients without malignancy (CTRL); see Figure 1a. The mean percentage of RNA recovery was 6.1% (range: 0.2%–22.7%). The cell-free circulating serum levels of circRNAs (circHIPK3 [$p = 0.720$], circFOXO3 [$p = 0.263$], circZMIZ1 [$p = 0.166$], circSLC19A1 [$p = 0.735$], and circSMARCA5 [$p = 0.954$]) were not significantly different in patients with the diagnosis of PCA or without finding of cancer in the prostate biopsy. The levels of circulating circRNAs were not correlated with the presence of significant prostate cancer. The levels of serum circZMIZ1 were significantly increased ($p = 0.010$) in patients with metastatic PCA ($n = 8$) compared with patients with localized PCA ($n = 60$); see Figure 1c. Furthermore, circZMIZ1 ($p = 0.045$) and circSLC19A1 ($p = 0.035$) expression in the serum of PCA patients were related to PSA levels; see Figure 1d,e. The study cohort was too small to further analyze, whether circRNA levels were useful in patients with PSA levels in the “gray zone.” Knockdown of circZMIZ1 inhibited cell proliferation and induced growth arrest. The expression of circZMIZ1 was dependent on the stimulation of testosterone and increased the expression of the androgen receptor and the androgen receptor splice variant 7 (AR-V7) in vitro.² Thus, circZMIZ1 might serve as a prognostic biomarker and probably a treatment target for the treatment of metastatic PC. In contrast, we did not observe a correlation of serum circRNA expression with DRE, prostate volume, ISUP grade, or D'Amico classification (all $p > 0.05$). Our findings are contrary to former studies showing an increase of circFOXO3,¹ circZMIZ1,² circSLC19A1,^{3–5} and circSMARCA5^{6,7} in blood of patients with PCA. Several important differences may explain this outcome: Earlier studies suffered from smaller sample sizes (i.e., 14–60 patients). Additionally, inadequate reference genes (mRNA) were used, and PCA patients were compared with healthy subjects. This could lead to an overestimation of the diagnostic power of circRNAs. Notably, the increase in circRNAs in tissue or cell lines^{3,5} does not necessarily contribute to a relevant increase of the circRNAs in patients' circulation.

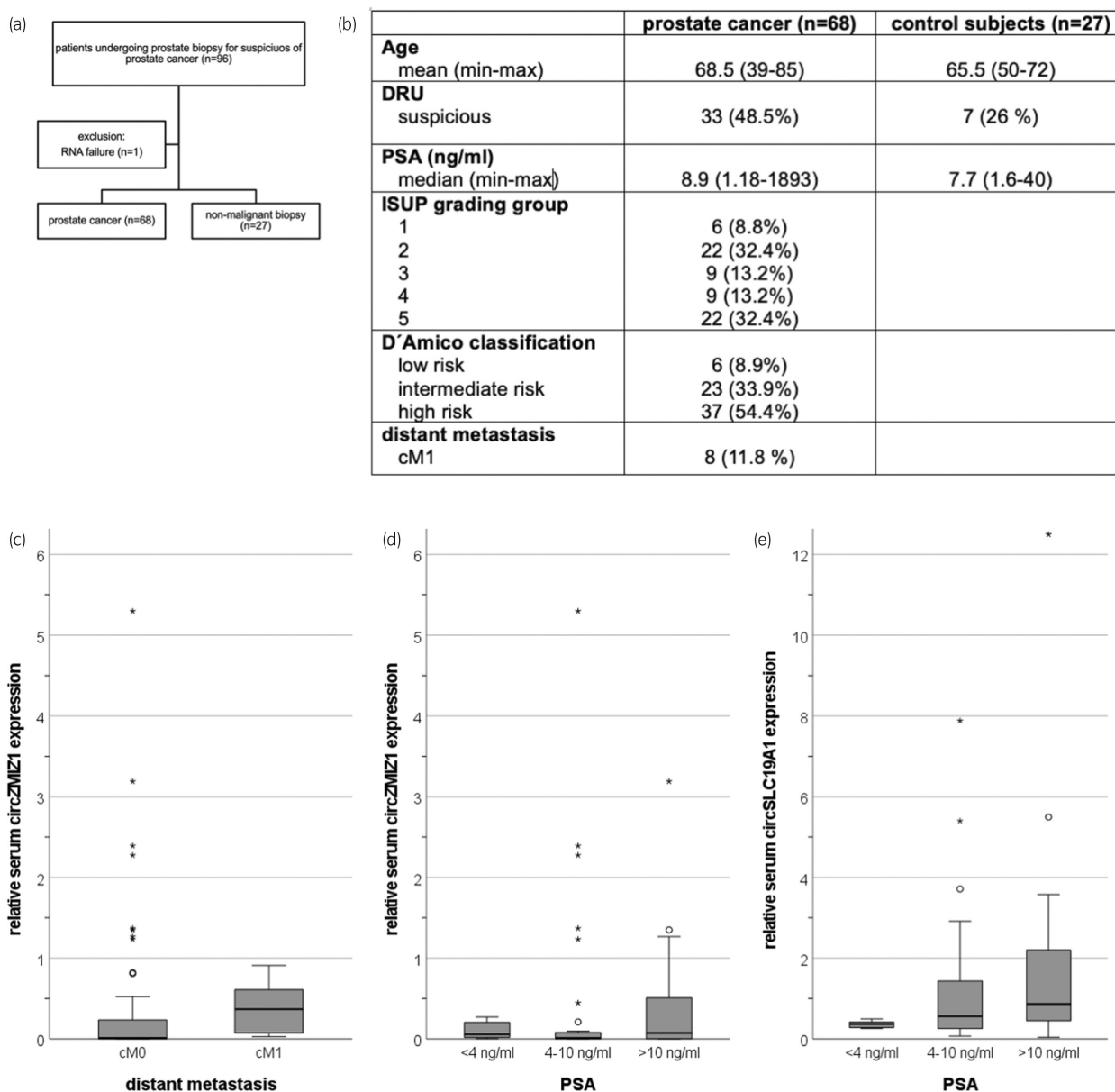


FIGURE 1 Boxplot diagram [a] demonstrates the levels of circZMZ1 in patients with localized ($n = 52$) and metastatic ($n = 16$) prostate cancer; patients with metastatic prostate cancer had significantly higher serum circZMZ1 levels ($p = 0.010$). The circulating levels of circZMZ1 ($p = 0.045$, [b]) and circSLC19A1 ($p = 0.035$, [c]) were correlated with serum PSA. Outliers are symbolized by circles (mild outliers) and asterisks (extreme outliers) in the diagram.

ACKNOWLEDGMENT

The collection of serum samples was performed within the framework of the Biobank of the CIO ABCD. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Lara Samirae: Investigation; Methodology; Formal analysis; Data curation; Visualization; Writing—original draft. **Philipp Krausewitz:** Writing—review & editing; Conceptualization;

Supervision. **Abdullah Alajati:** Writing—review & editing; Methodology; Supervision; Resources. **Glen Kristiansen:** Supervision; Resources. **Manuel Ritter:** Conceptualization; Writing—review & editing; Project administration; Resources; Supervision. **Jörg Ellinger:** Conceptualization; Methodology; Project administration; Writing—original draft; Investigation.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflict of interest.

APPROVAL OF THE RESEARCH PROTOCOL BY AN INSTITUTIONAL REVIEWER BOARD

The protocol for this research project has been approved by the Ethics Committee of the University Bonn and it conforms to the provisions of the Declaration of Helsinki. Ethics approval no.: 347/19.

INFORMED CONSENT

All informed consent was obtained from the subjects.

ANIMAL STUDIES

None.

REGISTRY AND THE REGISTRATION NO. OF THE STUDY

None.

REFERENCES

- 1 Kong Z, Wan X, Lu Y, Zhang Y, Huang Y, Xu Y, et al. Circular RNA circFOXO3 promotes prostate cancer progression through sponging miR-29a-3p. *J Cell Mol Med*. 2020;**24**:799–813.
- 2 Jiang H, Lv DJ, Song XL, Wang C, Yu YZ, Zhao SC. Upregulated circZMIZ1 promotes the proliferation of prostate cancer cells and is a valuable marker in plasma. *Neoplasma*. 2020;**67**:68–77.
- 3 Zheng Y, Li JX, Chen CJ, Lin ZY, Liu JX, Lin FJ. Extracellular vesicle-derived circ_SLC19A1 promotes prostate cancer cell growth and invasion through the miR-497/septin 2 pathway. *Cell Biol Int*. 2020;**44**:1037–45.
- 4 Xia Q, Ding T, Zhang G, Li Z, Zeng L, Zhu Y, et al. Circular RNA expression profiling identifies prostate cancer-specific circRNAs in prostate cancer. *Cell Physiol Biochem*. 2018;**50**:1903–15.
- 5 Ge S, Sun C, Hu Q, Guo Y, Xia G, Mi Y, et al. Differential expression profiles of circRNAs in human prostate cancer based on chip and bioinformatic analysis. *Int J Clin Exp Pathol*. 2020;**13**:1045–52.
- 6 Kong Z, Wan X, Zhang Y, Zhang P, Zhang Y, Zhang X, et al. Androgen-responsive circular RNA circSMARCA5 is up-regulated and promotes cell proliferation in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;**493**:1217–23.
- 7 Dong C, Fan B, Ren Z, Liu B, Wang Y. CircSMARCA5 facilitates the progression of prostate cancer through miR-432/PDCD10 axis. *Cancer Biother Radiopharm*. 2021;**36**:70–83.