



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Functional study of the human genome

Li, Y.

### Citation

Li, Y. (2023, October 2). *Functional study of the human genome*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3657104>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3657104>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

## Nederlandse samenvatting

Het begrijpen van de betekenis van de codes van het menselijk genoom is een van de sleutels om de geheimen van het leven te ontrafelen. Ondanks dat we de sequentie van het menselijk genoom weten, begrijpen we nog lang niet de functies van de meeste delen van het genoom en hun betrokkenheid bij ziekten. De toepassing van de CRISPR-Cas9 techniek bracht een revolutie teweeg in de manier waarop de functie van het genoom werd bestudeerd, niet alleen voor de coderende genen maar ook het niet-coderende gedeelte van het genoom. In dit proefschrift zijn meerdere CRISPR-screeningsystemen ontworpen en gebruikt om het transport van chemotherapeutica en de functies van niet-coderende regulerende elementen in verschillende biologische routes te bestuderen.

Om zich te concentreren op medicijntransport en tegelijkertijd de achtergrond interferentie van een genoom brede screening te verminderen, werden in Hoofdstuk 2 aangepaste CRISPR-knock-out- en CRISPR-activeringsbibliotheken ontworpen en samengesteld om alle potentiële membraan-geassocieerde transporters te beïnvloeden. Door gebruik te maken van de autofluorescerende eigenschappen van doxorubicine, werd FACS-sortering gebruikt om CRISPR-bewerkte cellen te verrijken met hoge of lage geneesmiddelaccumulatie tijdens de screenings, waarbij het fenotype van de geneesmiddelopname direct werd gemeten. Een dergelijke strategie moet verwarrende factoren of screeninghits van andere screeningstudies met vergelijkbare doelstellingen die zijn gebaseerd op celoverleving als indirecte uitlezing voor geneesmiddeltransport, vermijden. We hebben aangetoond dat dergelijke screenings met gefocuste bibliotheken zeer robuust zijn, aangezien dezelfde tophits meestal aanwezig waren in verschillende populaties, wat wijst op een vergelijkbare potentiële medicijntransportfunctie binnen dezelfde screening, wat in zekere zin hun potentiële rol opnieuw bevestigt. Met behulp van deze methode hebben we eerder bekende drugsexporteurs geïdentificeerd, zoals ABCB1 en ABCG2. Daarnaast hebben we een nieuw doxorubicine-importergen SLC2A3 (GLUT3) geïdentificeerd. We realiseerden ons ook dat de CRISPR-activeringsscreening

een aanvulling vormt op het CRISPR-knock-outsysteem, dat in de meeste onderzoeken wordt gebruikt. Voor toekomstige screeningsinspanningen is het beter om de twee screeningsystemen te combineren om een uitgebreide identificatie te krijgen van de mogelijke factoren die betrokken zijn bij gedefinieerde biologische uitlezingen.

In hoofdstuk 3 hebben we een innovatief dual-CRISPR-systeem gebruikt om de functies van niet-coderende regulerende elementen (NCRE's) in hun endogene genomische omgeving te bestuderen. Met behulp van deze methode konden we 4.047 UCE's in het menselijk genoom van UCNEbase, 1.527 in vivo gevalideerde geconserveerde versterkers van VISTA Enhancer Browser en 13.539 potentiële K562-celversterkers, voorspeld door het ENCODE-project, bestuderen door deze NCRE's één voor één te verwijderen. We waren in staat om veel NCRE's te identificeren die van invloed zijn op celfitness en medicijnreacties. Bovendien hebben veel van de NCRE's eigenlijk silencer (transcriptioneel repressieve) activiteit, in tegenstelling tot de meest algemeen bekende enhancer-elementen. Dit is interessant en belangrijk omdat de rol van silencers in genregulatie in het hele genoom niet eerder goed bestudeerd was. Onze gegevens ondersteunen ook het idee dat silencers breed in het menselijk genoom kunnen voorkomen en een belangrijke rol spelen, vergelijkbaar met andere goed bestudeerde NCRE's zoals versterkers en lange afstand regulatoren. We konden aantonen dat veel van deze NCRE's nabijgelegen genen reguleren en daardoor verschillende biologische routes beïnvloeden. Een van de ultra geconserveerde NCRE PAX6\_Tarzan zou de differentiatie van cardiomyocyten in een hESC-model beïnvloeden, wat suggereert dat veel ultraconserved NCRE hun functies in een weefselafhankelijke context kunnen uitoefenen. We bieden de brede onderzoeksgemeenschap een nieuwe tool om de functies van NCRE's in verschillende biologische aspecten te bestuderen, en er wordt verwacht dat er in de toekomst nog veel meer belangrijke NCRE's zullen worden ontdekt, die niet alleen relevant zijn voor de fundamentele biologie, maar ook voor de humane ziekten.