

University of Groningen

## Circular RNAs in the pathogenesis of cancer

Zhao, Xing

DOI:  
[10.33612/diss.689854111](https://doi.org/10.33612/diss.689854111)

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*  
Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*  
2023

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Zhao, X. (2023). *Circular RNAs in the pathogenesis of cancer: are the interactions with miRNAs relevant?* [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.  
<https://doi.org/10.33612/diss.689854111>

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*



# Appendices

Dutch summary

Acknowledgments

About the author

List of publications

## Samenvatting

Circulaire RNA's (circRNA's) behoren tot de familie van niet-coderende RNA's. Ze worden gekenmerkt door hun circulaire vorm die wordt verkregen door back-splicing van lineaire RNA transcripten. De covalent gesloten circels hebben geen vrije 5'- en 3'-uiteinden en zijn daarom resistent tegen afbraak door RNases. CircRNA's spelen een cruciale rol in bijna alle fysiologische processen, en er is steeds meer bewijs dat veranderde expressie een rol speelt bij de ontwikkeling van kanker, waaronder B-cel lymfoom en borstkanker. De huidige kennis omtrent de betrokkenheid van circRNA's en de moleculaire mechanismen die hier aan ten grondslag liggen is echter beperkt. In deze studie hebben we het circRNA landschap en de functie van geselecteerde kandidaten in B-cel lymfoom en borstkanker onderzocht.

In Hoofdstuk 2 geven we een overzicht van de huidige kennis over circRNA's, de biogenese, en het belang van RNA-bindende eiwitten (RBP's). Daarnaast beschrijven we de moleculaire mechanismen en functies van circRNA's die betrokken zijn bij de pathogenese van kanker. Er zijn vier circRNA subtypen, namelijk exon circRNA's (ecircRNA's), intron RNA's (ciRNA's), exon-intron circRNA's (ElciRNA's) en tRNA-intron circRNA's (triciRNA's). CircRNA's kunnen via verschillende mechanismen worden gevormd, zoals lariat-gestuurde circularisatie, back-splicing of circularisatie door tRNA-splicingsenzymen. De flankerende regio's van circRNA's bevatten vaak repetitieve sequenties die circulaire RNA-vorming kunnen faciliteren. RBP's die binden aan de circRNA-flankerende sequenties spelen hierbij een cruciale rol. Sommige RBP's stimuleren de vorming van circRNA transcripten (bijvoorbeeld QKI), terwijl andere de vorming van circRNA's remmen (bijvoorbeeld ADAR1). CiRNA's en ElciRNA's zijn voornamelijk gelokaliseerd in de kern, terwijl ecircRNA's zich voornamelijk in het cytoplasma bevinden. CircRNA's spelen een cruciale rol bij de pathogenese van kanker door te dienen als moleculaire sponzen voor microRNA's en eiwitten, te fungeren als bindingspartners voor DNA, RNA en eiwitten, en door regulatie van alternatieve splicing. Een kleine subset van de circRNA's codeert voor eiwitten, waarbij de sequentie rondom de BSJ onderdeel is van het coderende gebied. De beperkte kennis van de biogenese samen met de grote functionele diversiteit maken circRNA's tot een interessant onderzoeksgebied. Het vergroten van onze kennis over deze circRNA's zal bijdragen aan een beter begrip van hun rol bij de pathologie van kanker.

In Hoofdstuk 3 hebben we het circRNA-landschap gekarakteriseerd in Hodgkin lymfoom (HL), Burkitt lymfoom (BL) en diffuus grootcellig B-cel lymfoom (DLBCL) cellijnen. Kiemcentrum (GC) B-cellen werden hierbij gebruikt als normale controles. In totaal hebben we >100.000 circRNAs geïdentificeerd waarvoor ten minste twee back-

splice junction (BSJ) reads zijn gevonden. Op basis van predictie programma's bleek dat de meerderheid van de circRNA's die werden ondersteund door meer dan 5 BSJ reads (n=13.952) exon-circRNA's waren bestaande uit 1 tot 5 exonen. Voor de meeste genen vonden we één circRNA, daarnaast waren er echter ook genen waarvoor we meerdere BSJ's hebben geïdentificeerd. Nanopore long-read sequencing voor 30 BSJ's resulteerde in 177 verschillende circRNA's, waaronder 60 nieuwe circRNA's. Voor 20 circRNA's hadden we voldoende reads om de exon-samenstelling betrouwbaar te kunnen bepalen. Voor vijf daarvan vonden we BSJ-coördinaten die niet overeenkwamen met de coördinaten zoals gedefinieerd op basis van de RNA-sequentie analyse. De samenstelling van 14 circRNA's kwam overeen met de circBase-annotatie, terwijl voor één circRNA de exon-samenstelling afweek van de circBase-annotatie. Analyse van differentiële expressie (DE) leverde een totaal van 3.239 DE circRNA's, waarvan 1.940 met een verhoogde en 1.322 met een verlaagde expressie tov normale GC B-cellen. De circulaire vorm van acht geselecteerde DE circRNA kandidaten werd gevalideerd op RNase R behandelde RNA monsters. Daarnaast werd het DE-patroon van deze acht circRNA's geverifieerd in een uitgebreid cellijncohort. Analyse van de expressie van lineaire RNA's voor alle genen waar een circRNA voor is gevonden resulteerde in differentiële expressie van 5.521 lineaire transcripten. Expressie van ongeveer 70% van de lineaire RNA's bleef ongewijzigd in B-cel lymfoom ten opzicht van GC B cellen, wat wijst op een onafhankelijke regulatie van de expressie van de circulaire en de lineaire transcripten. Voor de overige 30% met een DE-patroon voor zowel het circRNA als het lineaire RNA, zagen we een sterke positieve correlatie. Dit kan wijzen op een mogelijk gedeeld regulerend mechanisme. Samenvattend hebben we het circRNA landschap in B-cel lymfomen in kaart gebracht. De uitgebreide karakterisering, samen met de bevestigde DE-patronen van geselecteerde circRNA's, kan worden gebruikt als uitgangspunt voor toekomstig onderzoek om de functionele rollen en regulerende mechanismen van circRNA's op te helderen.

In Hoofdstuk 4 hebben we een circRNA afkomstig van het PVT1 locus onderzocht. Dit circRNA kwam significant differentieel tot expressie in BL en HL ten opzichte van GC B cellen op basis van de circRNA sequencing data (gegenereerd in Hoofdstuk 3). CircPVT1 is uitgebreid bestudeerd in verschillende maligniteiten, maar er is nog weinig bekend over de rol van dit circRNA in B-cel lymfoom. Van het PVT1 locus worden naast een circRNA verschillende lineaire transcripten gevormd vanaf verschillende transcriptie start sites, waarmee het een complex locus is. We onderzochten het expressiepatroon van circPVT1 en lineair PVT1 (lncPVT1) in een verscheidenheid aan B-cellymfoomcellijnen en normale B-celsubsets. lncPVT1 transcript niveaus waren verlaagd, terwijl circPVT1 transcript niveaus verhoogd waren in B-cel lymfomen. Beide

transcripten vertoonden een matige correlatie met MYC, die alleen significant was voor de lineaire transcripten. Deze correlatie was voornamelijk aanwezig in MYC-translocatie-negatieve cellijnen. In KM-H2 en SUPHD1 werd een homozygote deletie van het 5'-PVT1-gebied gevonden, inclusief het gebied dat codeert voor circPVT1. Het verlagen van lncPVT1 transcript niveaus verminderde de celgroei in alle BL cellijnen en de DLBCL cellijn SUDHL5. Het remmen van circPVT1- resulteerde in een groeidaling in alle BL cellijnen en de HL cellijn L1236. Overexpressie van circPVT1 leidde tot een lichte toename van de groei in cellijnen zonder of met lage endogene circPVT1 transcript niveaus. lncPVT1 transcripten werden consistent in de kern gevonden, terwijl circPVT1 transcripten voornamelijk in het cytoplasma werden gedetecteerd. Dit suggereert verschillende werkingsmechanismen voor deze 2 RNA's. Ondanks de voornamelijk cytoplasmatische lokalisatie toonde AGO2-RIP analyse geen verrijking van circPVT1 transcripten in de AGO2-IP fractie. Overeenkomstig met de nucleaire lokalisatie waren lncPVT1 transcripten ook niet verrijkt in de AGO2-IP fractie. Gezamenlijk wijst dit erop dat circPVT1 en lncPVT1 hoogstwaarschijnlijk geen interactie aangaan met miRNA's in B-cellymfoom. CircPVT1 pull-down experimenten om andere bindingspartners en functionele mechanismen van PVT1 transcripten in B-cellymfoom te ontrafelen worden op dit moment uitgevoerd. Al met al heeft onze studie aangetoond dat lineaire en circulaire PVT1 transcripten tegengestelde differentiële expressiepatronen vertonen en dat hun rol bij het stimuleren van de celgroei van lymfoomcellen onafhankelijk is van hun vermogen om miRNA's te binden. Deze bevindingen ondersteunen de noodzaak van verdere studies om de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan hun functies in het B-cellymfoom volledig te begrijpen.

Een tweede circRNA geïdentificeerd als relevant voor BL is circZDHC11. Dit circRNA en zijn lineaire tegenhanger hebben 18 miR-150 bindingsplaatsen, wat een miR-150 sponsfunctie suggereert. Het ZDHC11-gen maakt deel uit van een oncogene netwerk waarbij MYC, miR-150 en miR-150 target MYB betrokken zijn. De lineaire en vooral de circulaire ZDHC11 waren sterk verrijkt in de AGO2-IP fractie bij overexpressie van miR-150 en zouden daarmee effectief miR-150 kunnen wegvangen en zo kunnen zorgen voor hoge MYB-niveaus. In Hoofdstuk 5 hebben we onderzocht wat de relevantie is van circZDHC11 en de regio waar miR-150 bind voor het reguleren van de groei van BL-cellen. CircZDHC11 en miR-150 transcripten waren voornamelijk gelokaliseerd in het cytosol, terwijl lineair ZDHC11 voornamelijk in de kern was gelokaliseerd. Overexpressie van miR-150 had geen invloed op de subcellulaire lokalisatie van individuele ZDHC11-transcripten. Remming van circZDHC11, met behulp van shRNA's die specifiek gericht zijn tegen de BSJ, remde de groei van BL zonder de expressie van andere leden van het oncogene MYB-, MYC-, miR-150- en

ZDHHC11 netwerk te beïnvloeden. Opmerkelijk genoeg had overexpressie van circZDHHC11 geen invloed op de groei van BL-cellen en kon circZDHHC11 overexpressie het sterke groei-remmende effect van overexpressie van miR-150 niet ongedaan maken. Om effectieve binding van miR-150 aan de ectopisch tot expressie gebrachte circZDHHC11 te bevestigen, voerden we AGO2-IP uit en dit liet zien dat miR-150 wel degelijk bindt aan het tot overexpressie gebrachte circZDHHC11. Ondanks deze effectieve interactie, die past bij een miR-150 spons functie, was er geen effect meetbaar op de levels van het miR-150 target gen MYB. Het verwijderen van de regio waar miR-150 bind in het endogene ZDHHC11-locus met behulp van CRISPR/Cas9-technologie had geen invloed op de vorming van circZDHHC11. Remming van circZDHHC11 zonder de regio waar miR-150 bind verlaagde ook de BL celgroei, vergelijkbaar met het effect van remming van het normale circZDHHC11 transcript. Concluderend toonde onze studie aan dat circZDHHC11 proliferatie van BL ondersteunt en dat dit effect onafhankelijk is van het vermogen om miR-150 te binden. Verdere studies zijn opgestart en gericht op de identificatie van andere moleculen die kunnen binden aan circZDHHC11. Identificatie van deze moleculen is vereist om meer inzicht te krijgen in de mechanismen waarmee circZDHHC11 de groei van BL ondersteunt.

In hoofdstuk 6 hebben we de rol van circ-NOL10 bij borstkanker bestudeerd. Onze eerder gerapporteerde circRNA expressie studie toonde aan dat expressie van circ-NOL10 sterk verlaagd was in triple-negatieve borstkanker (TNBC). In het huidige onderzoek hebben we aangetoond dat de expressie van circ-NOL10 verlaagd was in borstkanker weefsels en cellijnen in vergelijking met controles. Met behulp van Receiver Operating Characteristic (ROC)-curves voor circ-NOL10 werden AUC-waarden verkregen van respectievelijk 0,92, 0,93, 0,76 en 0,92 voor TNBC-, LA-, LB- en Her-2 borstkanker subtypes. Deze bevindingen tonen aan dat circ-NOL10 mogelijk diagnostische waarde heeft voor borstkanker. De verminderde expressie van circ-NOL10 was significant gecorreleerd met een gevorderd klinisch stadium, metastases in de lymfeklieren, kortere ziektevrije tijd en algehele overlevingstijd bij patiënten met TNBC. Verhoogde circ-NOL10-expressie in borstkanker cellijnen verminderde celproliferatie, invasie en migratie terwijl vroege maar niet late apoptose werd bevorderd. Terwijl, verlagen van circ-NOL10 expressie door behandeling met siRNA resulteerde in een tegenovergestelde cellulaire respons. Bovendien remde overexpressie van circ-NOL10 tumorgroei in vivo. Circ-NOL10 was gelokaliseerd in zowel het cytoplasma als de kern van borstkankercellen. We toonden aan dat circ-NOL10 een interactie aan kan gaan met miR-149-5p, miR-330-3p en miR-452-5. Binding van deze miRNAs aan circ-NOL10 voorkwam dat deze miRNA's de PDCD4 levels konden

verlagen. Circ-NOL10 reguleert dus indirect de expressie van PDCD4. Bovendien hebben we de binding van twee RBP's (MTDH en CASC3) aan circ-NOL10 aangetoond door RNA-immunoprecipitatie (IP) en luciferase-reporterassays. Deze binding resulteerde in verlaagde circ-NOL10 niveaus. De verminderde expressie van circ-NOL10 in TNBC resulteerde in effectievere remming van PDCD4 door drie miRNA's (miR-149-5p, miR-330-3p en miR-452-5p). Concluderend ontdekten we een nieuwe regulator van PDCD4 in TNBC. Dit wordt bereikt doordat de niveaus van circ-NOL10 worden verlaagd door binding aan MTDH en CASC3, wat resulteert in het vrijkomen van drie miRNA's die vervolgens PDCD4 kunnen reguleren. Verlaging van de DCD4 niveau's draagt bij aan de progressie van borstkanker. Deze studie geeft aan dat circRNA's hun regulerende effecten kunnen uitoefenen door het wegvangen van meerdere miRNA's, waardoor andere genen niet gereguleerd kunnen worden door deze miRNAs. Dit werkingsmechanisme is vrij uniek, aangezien de meeste miRNA bindende circRNA's slechts één specifiek miRNA binden.

## Acknowledgment

Our past shapes who we are today, and your input shapes the thesis that is being presented. No number of words can truly explain how grateful I am to the people who have come into my life; your unwavering support and assistance have motivated me to finish my PhD path.

I greatly thank my supervisors, **Prof. Anke van den Berg** and **Dr. Joost Kluiver**, for your great assistance in my research work and life in Groningen. Dear **Anke**, I appreciate you giving me the chance to begin my PhD adventure following our first discussion during ISCOMS in 2018. I admire your passion for research; it appears that you can always maintain an active mind and keep asking questions. You are smart, and I still remember your suggestion of a single enzyme digesting the circZDHHHC11 plasmid for sequencing to avoid the second structure. You are so kind to ask us whether we enjoy the party and dinner every time. The most impressive thing is that you share your past presentation experience to relieve my anxiety and care about how I feel after the presentation at the ncRNA conference in Rhodes in 2022. Additionally, you are so trustworthy that I can rely on you for assistance with any issues. Hope you can enjoy life in your new big house! Dear **Joost**, thank you for your support and understanding as always! You have been so patient to answer my question and explain the projects. You are really kind to cheer me on when I'm feeling down about the project's progress. You have such creative thoughts to offer or put forth some interesting ideas with us. You are so warm to stand by my side and defend me in my personal meeting (why not always?). It's fun to wager with you on how the experiment will turn out. Can we replace the chocolate in the next wager with anything else? It's hilarious that I always have the feeling that our communication is not on the same channel but somehow, we reach an agreement at last. I will miss our wonderful discussion time!

Dear **Prof. Jianzhen Xu**, thank you for leading me to the research of the non-coding RNA field. Thank you for your encouragement and support for my research career. I appreciate your support to attend conferences (including the ISCOMS 2018) and workshops during my master's. Thank you for trusting me to let me try the experiment I propose. Thank you for being my supervisor in China. I respect you always have creative research ideas and a passion for work. Thank you for treating me Lanzhou Noodles when you saw I didn't have lunch. I am so lucky that I met you and have you to be my supervisor at the first of my research career!

I would also like to thank the members of my thesis committee, **Prof. Cornelis F. Calkhoven**, **Prof. Marco Harmsen**, and **Prof. Kirsten Grønbaek**, for your valuable



comments, suggestions, and feedback on my research, which helped me to improve the quality of my research.

My deepest appreciation is next to give our group members. Dear **Dr. Lydia Visser**, thank you for introducing me to **Anke's** research group and helping during ISCOMS 2018. Even in the journal club, I can feel your warmth, kindness, and deep care. It's so yummy the cakes you made, even though I am not a big fan of sweets. Dear **Dr. Lotteke Swier**, thank you for your kindness and patience when I ask you questions. Hope you like your work now and enjoy your family time with two lovely babies! Dear **Debora De Jong**, thank you for your help in the lab, and hope you can be happy always! Dear **Jasper Koerts**, it's so nice to work with you and thank you for your kind help always and contribution to my projects! Dear **Annika Seitz**, thank you for getting my points easily and sharing detailed experiments tips, and kind help in the lab. Dear **Bea Rutgers**, thank you for your help with western blot and AGO-IP experiments. Dear **Monique Lodewijk**, thank you for your help with cloning! Dear **Tineke van der Sluis**, thank you for your help with the AGO2-IP experiments. Dear **Emke Bakker**, thank you for your help with my circRNA profiling project! Thanks a lot also to **Mirjam, Wierd, Lorian, Nienke**, and the other colleagues from the pathology lab, for your help and support of my work in the lab.

My sincere thanks to **Prof. Jo Vandesompele, Prof. Pieter-Jan Volders, Marieke Vromman, Dr. Marcin Piotr Sajek, Jasper Verwilt, Dr. Philippe Decruyenaere, Dr. Tomasz Wozniak, Jasper Anckaert, Prof. Maciej Giefing, and Dr. Agnieszka Dzikiewicz-Krawczyk**, for your assistance in circRNA profiling project. It's nice to have a regular circRNA brainstorm with you. Your contributions have been instrumental in achieving the objectives of this project.

Thanks to **Prof. Chunqi Li (李春奇)** and **Assoc. Prof. Guiling Li (李桂玲)**. Thank you for enlightening my research path. Your guidance has been instrumental in my academic journey!

I would like to express my gratitude to my paranymphs **Roza Cengiz** and **Weiting Li**. Dear **Roza**, it's so happy to make a lot of fun with you after the workday. Thank you for your encouragement when I was not confident. Hope you can have a happy life with **Bas** and start your business soon! Dear **Weiting**, it's nice to have you together to start the work and life in Groningen together. We have a lot of overlapped travel experiences. Hope you can complete your dream of being a rich lady! Dear **Yujia**, thank you for always sharing your tasty and loving food with me. It's nice to have a person share feelings for work and life. Looking forward to your good news no matter work or life! Dear **Zainab**, you are a wise man in life! I admire your attitude to face the

difficulties. I enjoy our talking and thanks for sharing the wisdom of life. Looking forwards to getting your pictures of six children one day! Dear **Yujie**, you always know a lot of information I don't know. I think you have the talent to be a nice chef! You should not lie flat! Dear **Shiyun**, good luck with your circRNA journey and please do not be so picky about food (you will miss a lot). Dear **Momo**, you are disciplined, and I am pretty sure that you can manage your PhD. Dear **Nohora**, thank you for every talk in the Wednesday meeting! Dear **Yajie, Rodrigo, Nick, and Johanna**, good luck with your PhD journey, and thank you for all the talks and happy time we spent together! And **Leonie, Annelien, Leo, and Ali**, thank you for all the conversations with you! Also, thanks a bundle to graduated colleagues, **Yichen, Pei, Geok Wee, Peijia, Mathilde, Myra, Fubiao, Wangzhao, Johanna, and Miguel**, thank you for your kindness and help, and hope you have a nice future in your life and career!

I am indebted to my colleagues from Shantou. Dear **Yujie Cai (蔡玉洁)**, it's nice to collaborate with you. Hope you are well with your family and career. Looking forward to our next collaboration together! Dear **Qiuyang Chen (陈秋杨)**, thank you for your help and contributions to my TRA2A projects! Dear **Danze Chen (陈丹泽)**, thank you for your collaboration during my master's! Dear **Leiming Jiang (姜雷明), Qianqian Zhao (赵前前), Mengting Shao (邵梦婷), and Mingrong Bei (贝明容)**, thank you for the time being with you, and best wishes to you all.

I am also grateful to my Chinese friends. Dear **Yue (尧月), Mian (包冕), Yuzhu&Liang (戚玉竹&杜亮), Xueling&Yu (卢雪玲&章宇), Zhen(林蓁), Yusheng (林宇晟), Senquan&Yuqin (冯森泉&梁玉琴), Zhen (何臻), Qihua (王琦画), Fan (张凡), Zhao (关钊), Zhiheng&Yifeng (程志恒&代逸凤), Ziqing (尹子卿), Siqi&Liang (郑斯琪&楼亮), Yiyang (李易阳), Chunliu (王春柳), Yan (李言), Baoqiang (马宝强), Ting (王婷), Xue (张雪), Yang (罗阳), Si (陈思), Min&Bohuan (王敏&林柏桓), Yi (吴怡), Zhiwen (王志文), Xiaofang (李晓芳), Xiyang (张希莹), Yong (甘勇), Jie (马杰), Xiurong (柯秀容)**. I'm delighted to meet you in Groningen! I'm grateful for your assistance and support outside of work. The wonderful moments we shared together will undoubtedly bring me joy and happiness in the years to come. Hope you all have a nice future and looking forward to seeing you again! Also, thanks to my friends outside of Groningen, your kindness and care support me to complete this thesis and I am deeply grateful for all that you have done for me.

Dear **Xiaodong Feng**, I feel so fortunate to have come across you towards the end of my doctorate journey. Thank you for the happiness and love you bring me. Thank you

for your patience and tolerance. I eagerly look forward to the adventures and milestones that lie ahead, knowing that we will face them together.

My heartfelt gratitude to my family. 亲爱的家人们，感谢你们一如既往的付出和支持，我才能够毫无顾虑的完成我的学业！亲爱的爸爸，女儿别无所求，只希望您能够健康快乐！亲爱的姐姐，感谢你们自始至终的支持，我才能心无旁骛地继续我的求学之路，希望你们能够想你所想，愿你所愿，爱你所爱！另外感谢我的亲戚朋友们，感谢你们多年来的支持和帮助，希望你们身体健康，万事如意！

Finally, sincere apologies to the people I have forgotten to mention here. I would like to express my appreciation for your support, encouragement, and guidance that influenced my life and shaped my academic journey.

## About the author

Xing Zhao was born on April 23, 1992, in Sanmenxia, China. She enrolled in the College of Life Sciences at Henan Agricultural University after finishing high school in 2011. She chose biological sciences as her major after hearing the adage "The 21st century is the age of biology." She completed her internship for graduation with the guidance of Prof. Chunqi Li and Assoc. Prof. Guiling Li and received her bachelor's degree in 2015. Later that year, she began her master's studies at Shantou University Medical College, where she participated in several projects involving non-coding RNAs and RNA-binding proteins under the supervision of Prof. Jianzhen Xu. In 2018, she successfully defended her master's thesis, "TRA2A Binds with LncRNA MALAT1 to Promote Esophageal Cancer Progression by Regulating EZH2/ $\beta$ -catenin Pathway" and was awarded the master's degree. In June of the same year, she attended the ISCOMS conference with the assistance of Prof. Jianzhen Xu, where she found a PhD position in the group of Prof. Anke van den Berg. Later, she prepared a proposal under the direction of Prof. Anke van den Berg, which was supported by The Abel Tasman Talent Program (ATTP) of the Graduate School of Medical Sciences at the University of Groningen. In November 2018, she began the first year of her PhD program at Shantou University Medical College, focusing on the study of circular RNA in breast cancer pathogenesis under the supervision of Prof. Jianzhen Xu. In December 2019, she joined the Department of Pathology and Medical Biology at the University Medical Center Groningen, where she started her PhD project on circular RNAs in B-cell lymphoma pathogenesis under the supervision of Prof. Anke van den Berg and Dr. Joost Kluiver. The current thesis book is the outcome of these.

## List of publications

1. Rassek, K., K. Izykowska, M. Żurawek, M. Pieniawska, K. Nowicka, **X. Zhao** and G. K. Przybylski (2023). "TMEM244 Is a Long Non-Coding RNA Necessary for CTCL Cell Growth." *Int J Mol Sci* 24(4).
2. Shao, M., S. Hao, L. Jiang, Y. Cai, **X. Zhao**, Q. Chen, X. Gao and J. Xu (2022). "CRIT: Identifying RNA-binding protein regulator in circRNA life cycle via non-negative matrix factorization." *Mol Ther Nucleic Acids* 30: 398-406.
3. **Zhao, X.**, Q. Chen, Y. Cai, D. Chen, M. Bei, H. Dong and J. Xu (2021). "TRA2A Binds With LncRNA MALAT1 To Promote Esophageal Cancer Progression By Regulating EZH2/ $\beta$ -catenin Pathway." *J Cancer* 12(16): 4883-4890.
4. Cai, Y., **X. Zhao**, D. Chen, F. Zhang, Q. Chen, C. C. Shao, Y. X. Ouyang, J. Feng, L. Cui, M. Chen and J. Xu (2021). "circ-NOL10 regulated by MTDH/CASC3 inhibits breast cancer progression and metastasis via multiple miRNAs and PDCD4." *Mol Ther Nucleic Acids* 26: 773-786.
5. **Zhao, X.**, Y. Cai and J. Xu (2019). "Circular RNAs: Biogenesis, Mechanism, and Function in Human Cancers." *Int J Mol Sci* 20(16).
6. Xu, J. Z., C. C. Shao, X. J. Wang, **X. Zhao**, J. Q. Chen, Y. X. Ouyang, J. Feng, F. Zhang, W. H. Huang, Q. Ying, C. F. Chen, X. L. Wei, H. Y. Dong, G. J. Zhang and M. Chen (2019). "circTADA2As suppress breast cancer progression and metastasis via targeting miR-203a-3p/SOCS3 axis." *Cell Death Dis* 10(3): 175.
7. Cheng, Y. W., Y. M. Chen, Q. Q. Zhao, **X. Zhao**, Y. R. Wu, D. Z. Chen, L. D. Liao, Y. Chen, Q. Yang, L. Y. Xu, E. M. Li and J. Z. Xu (2019). "Long Read Single-Molecule Real-Time Sequencing Elucidates Transcriptome-Wide Heterogeneity and Complexity in Esophageal Squamous Cells." *Front Genet* 10: 915.
8. **Zhao, X.**, D. Chen, Y. Cai, F. Zhang and J. Xu (2018). "RBPvsMIR: A Computational Pipeline to Identify Competing miRNAs and RNA-Binding Protein Pairs Regulating the Shared Transcripts." *Genes (Basel)* 9(9).
9. Zhang, F., **X. Zhao**, H. Dong and J. Xu (2018). "circRNA expression analysis in lung adenocarcinoma: comparison of paired fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded specimens." *Biochem Biophys Res Commun* 500(3): 738-743.
10. Kaina, B., A. Izzotti, J. Xu, M. Christmann, A. Pulliero, **X. Zhao**, M. Dobreanu and W. W. Au (2018). "Inherent and toxicant-provoked reduction in DNA repair capacity: A key mechanism for personalized risk assessment, cancer prevention and intervention, and response to therapy." *Int J Hyg Environ Health* 221(7): 993-1006.
11. Wu, B. L., D. Wang, W. J. Bai, F. Zhang, **X. Zhao**, Y. Yi, T. Zhang, W. J. Shen, E. M. Li, L. Y. Xu and J. Z. Xu (2016). "An integrative framework to identify cell death-related microRNAs in esophageal squamous cell carcinoma." *Oncotarget* 7(35): 56758-56766.
12. Shen, W. J., F. Zhang, **X. Zhao** and J. Xu (2016). "LncRNAs and Esophageal Squamous Cell Carcinoma - Implications for Pathogenesis and Drug Development." *J Cancer* 7(10): 1258-1264.

