

染色体外环状 DNA 的研究进展

李乐（学号：2017202040065）

武汉大学生命科学学院，遗传学系，武汉 430072

摘要：不同于循环组的概念，属于基因组学中的环状组已经成为新的研究目标，它深刻的体现了基因组的动态特征。针对这种不寻常的 DNA 的研究，暗示着它在健康和疾病中的关键角色。虽然 eccDNAs 的生产，分布和活动仍未得到充分研究，但线性基因组特定区域的 eccDNA 形成对这些区域的调控和编码能力产生了深远的影响。推测 eccDNA 可能通过携带额外的癌症相关基因拷贝而使肿瘤得到遗传上的促进，且广范围和高通量基础上的研究结果阐释了：不同细胞类型中 eccDNA 携带的遗传信息是不同的，这种特异性的实现有助于区分细胞类型，甚至可以作为癌症血液检查的基础。本篇综述了近年来关于 eccDNA 的部分研究进展，着重于相关新型研究技术的应用。

关键词：染色体外环状 DNA；环状组；EC 检测；异质性

Progress on extrachromosomal circular DNA

Le Li

Department of genetics, College of life sciences, Wuhan University, Wuhan 430072

Abstract: Different from the concept of circulome, the circulome belonging to genomics has become a new research target, which profoundly reflects the dynamic characteristics of the genome. Research on this unusual DNA suggests its key role in health and disease. While the production, distribution, and activities of eccDNAs remain understudied, eccDNA formation from specific regions of the linear genome has profound consequences on the regulatory and coding capabilities for these regions. It is speculated that they might give tumors a genetic boost by carrying extra copies of cancer-related genes and the results of a wide-ranging and high-throughput study illustrate that genetic information carried by eccDNA is different in different cell types, Specificity helps distinguish between cell types and can even serve as a basis for cancer blood tests. This review summarizes some recent advances in eccDNA, focusing on the application of new research techniques.

Keywords: extrachromosomal circular DNA; circulome; EC detect; heterogeneity

近几十年来，生物学家已经知道人类细胞核中含有神秘的 DNA 环，散布在线性染色体周围。现在，染色体外环状 DNA 环越来越趋向于健康和疾病的关键角色。环状组 (Circulome) 是一个在冷泉港基因组生物学会议上介绍的术语^[1]，可能会成为遗传学的一个新领域。

不同于环状细菌染色体或环状 RNA —— 另一种新近认可的细胞行为^[2]，这些 DNA 环首先在植物细胞核中被发现^[3]。然后其他科学家在脑癌细胞中发现了类似的独立 DNA 环，推测他们可能通过携带额外的癌症相关基因拷贝而使肿瘤得到遗传上的促进。

斯坦福大学的生物物理学家马萨·舒拉 (Massa Shoura) 报告说，她调整了一项生物物理学技术，以更好地调查含有染色体外环状 DNA (eccDNA) 的人类细胞，并且在不同类型的细胞中发现各种独立的 DNA 环的功能和信息。Shoura 的新调查显示，这些环状 DNA 也可能促进许多正常细胞的基因表达。对于这项调查，她与安德鲁·福利 (Andrew Fire) 转向了一种叫做氯化铯离心的有着 50 年历史的技术^[4]，曾经常被用来按大小和形状分离 DNA。通过在试管中富集细胞的所有 DNA，然后添加一种染色剂，使 eccDNA 变得非常紧凑，达拉斯得克萨斯大学的合作者 Stephen Levene 使得这些环状 DNA 密集得足以沉入底部管，他们可以被分离出来 (如图 1 所示^[4])。研究人员发现，这些环状 DNA 的大小和基因内容差别很大，最大的是 1.6 万个碱基。Shoura 认为这个环状的 DNA 库在不同的细胞中是有区别的，可能提供了一种方便的方法来区分细胞类型。初步的工作表明，每种细胞类型的环状 DNA 的信息也可能有助于它的特异化。例如，心肌细胞具有针对特定形式的肌肉蛋白质 titin 的大量基因的 eccDNA。

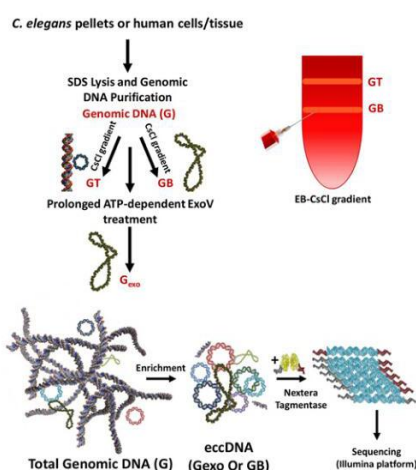


图 1 eccDNA 提取流程^[4]

Fig.1 Workflow for eccDNA extraction^[4]

从感兴趣的生物体或组织中分离基因组 DNA。将组织匀浆并用十二烷基硫酸钠 (SDS) 和蛋白酶 K 处理。为了富集环状 DNA，用外切核酸酶 V (exoV) 处理总基因组 DNA (G) 以产生 G(exo) 或结合在铯氯化物 (CsCl) 梯度将 G 分离成 GT 和 GB。GT 是梯度的上限带，包括线性 DNA 和带切口的环状 DNA。GB，底部带，由共价闭环 DNA 组成。用任一方法 (或两者) 富集环形 DNA 后，通过用 Nextera tagment 酶减毒处理将 eccDNA (染色体外环状 DNA) 最小化剪切并测序。

其他的科研人员的也做了不同的 eccDNA 提取工作，原理大致一致，收集细胞并用 1×冷 PBS 洗涤。将细胞沉淀重新悬浮于缓冲液 1 (50mM Tris pH 7.5, 10mM EDTA, 50μg/ml RNA 酶 A) 中，并在冰上在缓冲液 2 (1.2% SDS) 中温育 5 分钟。通过加入缓冲液 3 (3M CsCl, 1M 醋酸钾, 0.67M 乙酸) 使 DNA 酸化，并在冰上温育 15 分钟。样品在 4°C 以 14,000g 离心 15 分钟。将上清液加到 Qiagen 柱中并短暂离心。洗涤柱 (60% 乙醇, 10mM Tris pH 7.5, 50μMEDTA, 80mM 醋酸钾) 并在水中洗脱^[6]。提纯效果根据实验需求稍有区别。

其他最近的工作表明，通过携带特定基因的多个拷贝，染色体外 DNA 环可以影响细胞的功能甚至促进癌症的生长。最近的有论文甚至提出，通过释放这种环路，细胞可以影响其他遥远的细胞。圣地亚哥加州大学路德维希癌症研究所 (UCSD) 的癌症生物学家保罗·米歇尔 (Paul Mischel) 预测说，这种环状 DNA “将变得极其重要”。

2017 年，Mischel 证实了这些怀疑。他与其同事发现在所有人类癌症的一半中存在非常大的 DNA 环——高达 500 万个碱基对，但在正常细胞中很少见到。Mischel 说：“某些肿瘤的水平可能会高得多。”癌细胞环带有许多促进肿瘤生长的癌基因拷贝，他和他的同事在 3 月 2 日的“自然”杂志上报道说，可能会产生更多的促癌蛋白，而不是染色体结合的拷贝^[5]。

当细胞分裂时，这样的 DNA 环也会复制，但是不像染色体 DNA，它们可能不会在子细胞之间被均匀地分配。它们可以堆积在一个细胞中，极大地增加了癌基因的拷贝数。Mischel 说，如果额外的癌基因给细胞带来巨大的生长促进，这种细胞类型可以接管肿瘤细胞群。DNA 环甚至可以将癌基因转移回细胞的线性 DNA 上，他的研究小组在含有环状 DNA 的细胞中发现了染色体正常位置以外的癌基因。Mischel 说：“它提供了不同的癌症发展方式。”

人类细胞有二十三对染色体。然而在癌症中，基因可以在染色体或环状染色体外 DNA (eccDNA) 中扩增，尽管不了解 eccDNA 的频率和功能重要性。Mischel 团队对 17 种不同的癌症类型进行了全基因组测序，结构建模和细胞遗传学分析，包括分析 2572 个分裂细胞中期染色体的结构和功能，并开发了一个名为 ECdetect 的软件包，进行无偏集成的 eccDNA 检测和分析。数据显示在近一半人类癌症中发现了 eccDNA，其频率因肿瘤类型而异，但在

正常细胞中几乎未见。驱动癌基因在 eccDNA 中最常见，从而增加转录水平。数学模型预测，eccDNA 扩增将比染色体扩增更有效地增加基因拷贝数和肿瘤内异质性。通过定量分析癌症样本来验证这些预测。这里提出的结果表明，eccDNA 有助于癌症加速进化。

癌基因通常通过基因扩增（即拷贝数增加）而被激活，这可导致其过度表达并驱动肿瘤进展。在肿瘤细胞中，扩增的基因组区域（所谓的“扩增子”）可以在染色体内发生，或者扩增产生环状染色体外 DNA（eccDNA）。Mischel 团队的 Turner 等人开发的一个新的综合分析流程，为人类癌症中的生物分子生物学提供见解。DNA 测序可以鉴定肿瘤基因组中的扩增子，但是它不能在空间上解析它们在染色体景观中的位置。为了确保 eccDNA 的无偏检测，ECdetect 应运而生，这是一种用于细胞遗传学分析的半自动图像分析软件包，并将其与全基因组测序结合。ECdetect 量化来自用荧光 DNA 结合染料 DAPI（4', 6-二脒基-2-苯基吡啶）染色的中期细胞的 eccDNA。该软件用于量化来自多种癌症类型的 2,572 个细胞中的 eccDNA，包括 72 个原发性癌细胞样品，10 个永生化肿瘤细胞系和 8 个非癌性对照细胞系（如图 2）。值得注意的是，在正常细胞中很少见到 eccDNA，但在几乎一半的人类癌症中，在永生化细胞和原始样品中都可以检测到，不同的频率取决于肿瘤类型。

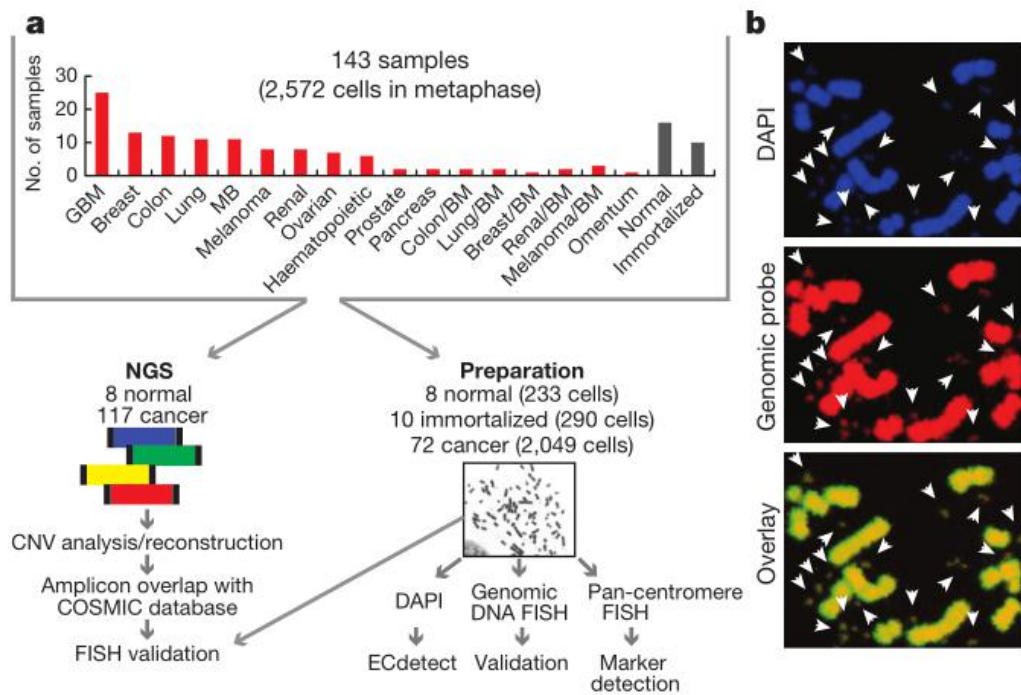


图 2 整合下一代 DNA 测序和 eccDNA 的细胞遗传学分析^[5]

Fig.2 Integrated next-generation DNA sequencing and cytogenetic analysis of eccDNA. ^[5]

a, 实验流程示意图。BM, 颅内转移瘤; GBM, 胶质母细胞瘤; MB, 髓母细胞瘤。

b, 用 DAPI 和基因组 DNA FISH 探针 (eccDNA, 箭头) 染色的中期的代表性细胞。

另外, 在被分析的大多数肿瘤培养物中, 不同细胞之间的 eccDNA 拷贝数有所不同, 表明肿瘤内细胞的异质性。接下来, 科学家对 117 个肿瘤样本进行了全基因组测序, 并将得到的读数与癌症基因组图谱中的序列进行比较, 以验证局部放大。通过荧光原位杂交 (FISH) 观察肿瘤细胞中选定的扩增癌基因, 并使用 ECdetect 进行分析。有趣的是, 所有测试的基因仅位于 eccDNA 中, 或位于 eccDNA 和染色体均匀染色区域 (其指示基因扩增)。此外, 癌基因 MYC 和 EGFRvIII (EGFR 变体 III) 的定量 PCR 分析显示它们在肿瘤细胞中高度表达自 eccDNA。

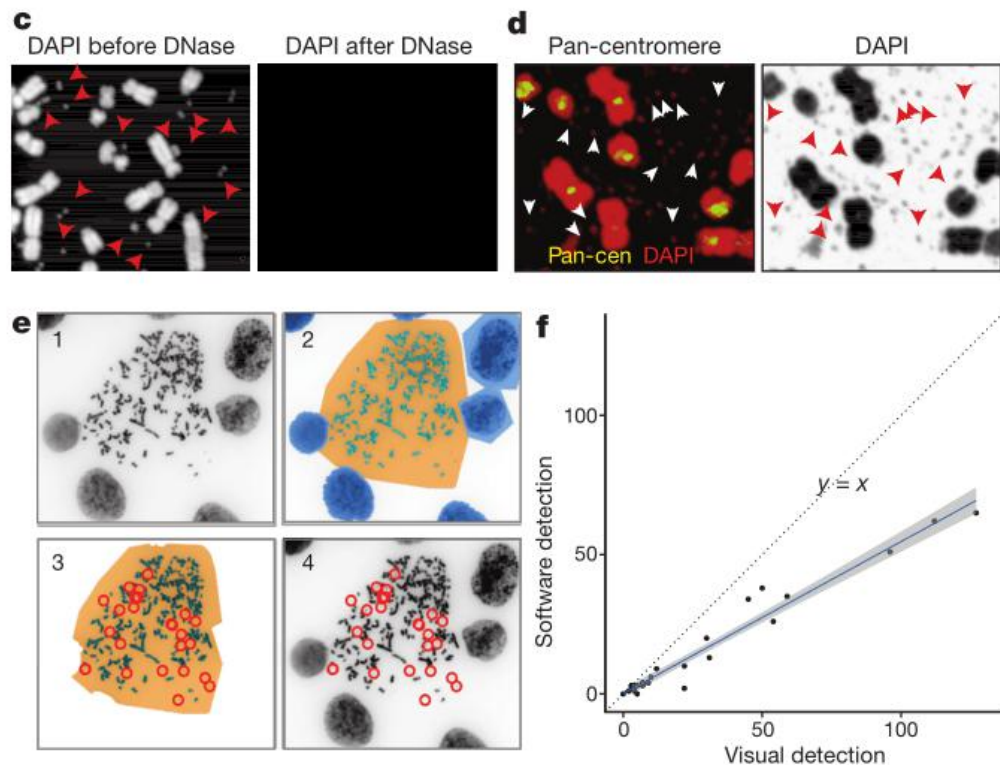


图 3 整合下一代 DNA 测序和 eccDNA 的细胞遗传学分析^[5]

Fig.3 Integrated next-generation DNA sequencing and cytogenetic analysis of eccDNA. ^[5]

c, DNase 处理消除染色体和 eccDNA 的 DAPI 染色 (箭头)。

d, 泛着丝粒 FISH 显示 eccDNA 中的着丝粒不存在 (箭头)。

e, ECdetect 的示意图。

(1) DAPI 染色中期作为输入,

(2) 通过分割对 eccDNA 搜索区域进行半自动化识别,

(3) 保守过滤，去除非 eccDNA 成分和

(4) eccDNA 检测和可视化。f, Pearson 相关性

软件检测和手动调用 eccDNA ($r = 0.98$, $P < 2.2 \times 10^{-16}$)。

总之，这些数据表明癌症中常见的致癌驱动扩增位于 eccDNA 上，并从 eccDNA 表达。重要的是，数学建模及其预测的实验验证揭示，eccDNA 上的癌基因增加拷贝数和肿瘤异质性比染色体扩增所产生的更多。这些发现说明，eccDNA 在推动癌症进化加速方面起着关键作用。

法明顿杰克逊基因组医学实验室的癌症生物学家 Roel Verhaak 发现了类似的证据表明 eccDNA 有助于癌症的发展。他的研究小组最近评估了 13 例胶质母细胞瘤患者的肿瘤基因活性，发现带有癌症促进基因 MET 的 DNA 环增强了其在这些癌细胞中的活性。UCSD 的基因组科学家凯利·弗雷泽 (Kelly Frazer) 指出：“染色体外环状 DNA 是基因组中可塑性的一种方式,看起来这可能是在正常发展和其他类型的过程中发生的。”

最近 Dutta 发现 DNA 环可以帮助细胞沟通，甚至长距离传播。当人类肿瘤细胞移植到小鼠身上时，人类 DNA 环很快出现在啮齿动物的循环系统中，他和同事在 5 月 26 日的“分子癌症研究”期刊上报道：脱落 DNA 可以将基因片段转运到其他细胞，尽管这还没有显示出来。Dutta 说这也可能成为癌症血液检查的基础^[6]。他进一步提出从 DNA 环转录的 RNA 可以调节基因活性和蛋白质生产。

就目前而言，这些环状 DNA 的潜在作用正在让生物学家们头脑发热。这基本上开启了一个新的领域，一个关于 DNA 以及基因组动态的新思路。

参考文献 (References) :

- [1] Pennisi E. Circular DNA throws biologists for a loop[J]. *Science*, 2017, 356(6342):996-996.
- [2] Servick K. Circular RNAs hint at new realm of genetics.[J]. *Science*, 2017, 355(6332):1363.
- [3] Lanciano S, Carpentier M C, Llauro C, et al. Sequencing the extrachromosomal circular mobilome reveals retrotransposon activity in plants:[J]. *Plos Genetics*, 2017, 13(2):e1006630.
- [4] Shoura M J, Gabdank I, Hansen L, et al. Intricate and Cell Type-Specific Populations of Endogenous Circular DNA (eccDNA) in *Caenorhabditis elegans* and *Homo sapiens*:[J]. *G3 (Bethesda, Md.)*, 2017, 7(10):3295-3303.
- [5] Kristen M. Turner, Viraj Deshpande, Doruk Beyter, et al. Extrachromosomal oncogene amplification drives tumor evolution and genetic heterogeneity[J]. *Nature*, 2017, 543(7643):122.
- [6] Kumar P, Dillon L, Shibata Y, et al. Normal and Cancerous Tissues Release extrachromosomal circular DNA (eccDNA) into the Circulation.[J]. *Molecular Cancer Research*, 2017, 15(9).