

DISS. ETH No 24086

**Analysis of cytoplasmic extrachromosomal
telomeric DNA in mammalian cells**

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by
NHUNG THI HONG LE
MSc. Gachon University of Medicine and Science,
South Korea

Born on Sep. 2, 1986
citizen of Vietnam

accepted on the recommendation of
Ruth Kroschewski
Yves Barral
Claus Azzalin
Annette Oxenius

2017

Summary

Chromosomal DNA and DNA in organelles like mitochondria and chloroplasts are the well-known parts of the genome of a eukaryotic cell and generally partition symmetrically in divisions. However, since the early 1960s, it is known that additional DNA entities exist in eukaryotic cells, so-called extrachromosomal DNA (ecDNA). EcDNA can be classified into two classes, i.e. exogenous and endogenous ecDNAs. Exogenous ecDNA (e.g. viral DNA, transfected plasmid DNA) needs to enter into a cell, whereas endogenous ecDNA arises from the chromosomal DNA of a cell. Endogenous ecDNA can be grouped into four types: 1) chromosomal fragments, often a result of mitotic breaks of chromosomes; 2) double minutes, circular DNA molecules containing genes such as oncogenes and drug resistance genes; 3) microDNA, small circular DNA elements (a few hundred base pairs long) containing unique sequences and 4) ecDNA with tandem repetitive sequences such as satellite DNA, ribosomal DNA, and telomeric DNA (tDNA). Endogenous ecDNA occurs ubiquitously in every tested eukaryotic organism from budding yeast to human. However, not much is known about its fate and cellular localization in mammalian cells. Recently, our group dissected how transfected plasmid DNA, which is circular DNA of bacterial origin, is handled by mammalian cells. We showed that it accumulates in the cytoplasm predominantly in one focus surrounded by a special double membrane. Remarkably, up to now at every tested time point after lipofection of plasmid DNA into cells, that DNA was always enclosed by a membrane reminiscent of the nuclear envelope. Further, such DNA cluster maintained, in contrast to chromosomes, membrane association during mitosis and partitioned asymmetrically during mitosis. Therefore, it is interesting to study if endogenous ecDNA also accumulates in the cytoplasm and if it is enclosed by membrane like exogenous plasmid DNA.

Using fluorescence *in situ* hybridization we found that tDNA also exists in the cytoplasm of two different human cancer cell lines, one with and one without telomerase (HeLa, U2OS respectively). The cytoplasmic tDNA occurred in both cell lines in two patterns: 1) one or multiple telomeric FISH signals within a bigger Hoechst-positive structure, similar to a so called "micronucleus" (micronucleus like structure), containing chromosomal fragments (termed mnls-tDNA), 2) any cytoplasmic telomeric FISH signal that does not belong to the first pattern (termed cyto-tDNA). As U2OS cells with cyto-tDNA are about 10 times more frequent in the population (40%) than cells with mnls-tDNA (4%), the quantitative analysis

refers only to cyto-tDNA.

Remarkably this analysis reveals clear similarities to the handling of plasmid DNA, suggesting that both DNA types are handled by a shared machinery. Firstly, about half of the analyzed cyto-tDNA foci co-localized with membrane proteins, which were also reported to be associated with plasmid foci and thus also present at the nuclear envelope. Secondly, a small fraction of the cyto-tDNA colocalized with plasmid DNA in the apparently same cytoplasmic membrane compartment. Both points indicate the presence of a cellular machinery that membrane encloses cytoplasmic DNA irrespective of its origin. Thirdly, like lipofected plasmid DNA, cyto-tDNA was predominantly present in one focus in cells, suggesting that tDNA can be clustered in the cytoplasm. Fourthly, not considering the nuclear pool of tDNA, cyto-tDNA distributed, like plasmid DNA, asymmetrically in U2OS telophase-cells. How cyto-tDNA comes to be present in the cytoplasm and the reason for its presence there is unknown. But, assuming the absence of further “generation” of cyto-tDNA, the finding of the biased partitioning of cyto-tDNA implicates that U2OS cells restrict over time cyto-tDNA to a subpopulation of cells.

To probe for the function of the membrane enclosure, we challenged the function of LEM (LAP2, Emerin, MAN1)-domain proteins. This is a group of transmembrane proteins predominantly present in the inner nuclear membrane and associated with both the cytoplasmic plasmid DNA and cyto-tDNA. For this, we attempted to compete with the function of LEM-domain proteins by overexpression of a soluble LEM-domain. For plasmid DNA, we found that overexpression of that LEM-domain resulted over time in more foci in single cells and that at every assessed time point an increased proportion of small plasmid foci in comparison to the fraction of big foci and in comparison to the measures in the control condition was present. Thus, we propose that the function of LEM-domain proteins around cytoplasmic plasmid DNA is to support the formation and maintenance of big DNA foci. Suggestive of a similar function for LEM-domain proteins around cyto-tDNAs, we found that the number of cyto-tDNA was higher in the perturbation condition. Thus, LEM-domain proteins seem to be relevant for the maintained separation of endogenous and exogenous ecDNA from the nucleus and its chromosomes.

However there were also striking differences compared to the handling of plasmid DNA, suggesting the presence of cellular machinery that differentiates between endogenous and

exogenous DNA: Firstly, the U2OS population falls into different sub-groups of cells as the presence of Lap2 β an inner nuclear membrane LEM-domain protein, at cyto-tDNA foci reports. In about one third of the cell population Lap2 β was absent from all of the cyto-tDNA foci in a cell, even that of very big foci. In about one third of the cell population, it was present on all cyto-tDNA foci of a cell, even at those of very small sizes. And in one third of the population a mixed situation was present. The frequency of these three patterns suggests that asymmetric divisions occur in the U2OS population. Secondly, at about half of all cyto-tDNA foci a plasmid-like membrane was not detectable, which even might suggest the complete absence of membrane around such cyto-tDNA.

Taken together, this study indicates that there is on the one hand a cellular machinery that membrane encloses possibly any type of cytosolic DNA with a nuclear envelope-like membrane and on the other hand a machinery that distinguishes between endogenous and exogenous DNA in the cytoplasm. Further work will be needed to decipher the link between these two machineries, to identify the mechanism of membrane enclosure of cytoplasmic DNA especially in the light of the formation of a nuclear envelope, and to identify the mechanism and its components for the differentiation between endogenous and exogenous ecDNA.

Zusammenfassung

Chromosomale DNA und DNA in Organellen wie Mitochondrien und Chloroplasten sind gut bekannte Teile des Genomes einer eukaryontischen Zelle und werden im generellen symmetrisch während einer Zellteilung verteilt. Seit den frühen 1960 Jahren ist jedoch bekannt, dass in eukaryontischen Zellen zusätzliche DNA Einheiten existieren, sogenannte extrachromosomale DNA (ecDNA). Es werden zwei Arten von ecDNA unterschieden, nämlich exogene und endogene ecDNA. Exogene DNA (z.B. virale DNA, transfizierte plasmid DNA) muss in eine Zelle eindringen, wogegen endogene DNA aus der chromosomalen DNA einer Zelle entsteht. Endogene DNA wiederum kann in vier Typen unterteilt werden: 1) chromosomale Fragmente, die oft das Resultat von Chromosomenbrüchen sind; 2) Double Minutes, zirkuläre DNA-Moleküle, die z. B. Onkogene und Arzneimittelresistenzgene beinhalten; 3) microDNA, kleine zirkuläre DNA-Elemente (einige hundert Basenpaare lang), die aus einzigartigen Sequenzen bestehen und 4) ecDNA mit tandem repetitiven Sequenzen wie Satelliten DNA, ribosomale DNA und telomerische DNA (tDNA). Endogene ecDNA ist ubiquitär in jedem getesteten eukaryotischen Organismus, von der Bäckerhefe bis zum Menschen, gefunden worden. Es ist jedoch nicht viel über deren Verbleib und zelluläre Lokalisierung in Säugetierzellen bekannt. Vor kurzem arbeitete unsere Gruppe heraus, wie transfizierte Plasmid-DNA, welche zirkuläre DNA bakteriellen Ursprungs ist, von Säugetierzellen behandelt wird. Wir zeigten, dass sie im Zytoplasma in überwiegend einem Fokus, der von einer besonderen Doppelmembran umgeben ist, akkumuliert. Es ist bemerkenswert, dass bis jetzt diese DNA zu jedem analysierten Zeitpunkt nach Lipofektion in eine Zelle immer mit einer Membran umgeben war. Solche DNA-Cluster waren im Gegensatz zu Chromosomen auch während der Mitose Membran-assoziiert und verteilten sich asymmetrisch während der Mitose. Daher ist es interessant zu untersuchen, ob endogene ecDNA auch im Zytoplasma akkumuliert und ob sie auch von Membran umgeben ist wie exogene Plasmid-DNA.

Wir fanden mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH), dass tDNA auch im Zytoplasma von zwei unterschiedlichen Krebszelllinien existiert, eine mit und eine ohne Telomerase (HeLa, U2OS, respektive). Die zytoplasmatische tDNA kam in beiden Zelllinien in zwei Mustern vor: 1) ein oder mehrere telomerische FISH-Signale innerhalb einer grösseren Hoechst-positiven Struktur, mit Ähnlichkeit zu einem sogenannten „Mikronukleus“ (micronucleus like structure), der chromosomale Fragmente enthält (mnl-tDNA genannt), 2)

jedliches zytoplasmatische telomerische FISH-Signal, das nicht zum ersten Muster gehört (cyto-tDNA genannt). Da U2OS Zellen mit cyto-tDNA ungefähr 10 mal häufiger in der Population (40%) waren als Zellen mit mnl-tDNA (4%), wurde die quantitative Analyse nur für cyto-tDNA durchgeführt.

Bemerkenswerterweise offenbart diese Analyse klare Aehnlichkeiten zu der Handhabung von Plasmid-DNA, was daraufhin deuten könnte, dass die beiden DNA-Arten von einer gemeinsamen Maschinerie gehandhabt werden. Erstens, ungefähr die Hälfte der analysierten cyto-tDNA Fokusse kolokalisierte mit Membranproteinen, die auch, wie publiziert ist, mit Plasmid-DNA assoziierten, und die daher auch an der Kernmembran vorkommen. Zweitens, ein kleiner Teil der cyto-tDNA kolokalisierte mit Plasmid-DNA in scheinbar dem gleichen zytoplasmatischen Membran-Kompartiment. Beide Punkte deuten darauf hin, dass es eine zelluläre Maschinerie gibt, die zytoplasmatische DNA unabhängig von ihrem Ursprung mit Membran umgibt. Drittens, cyto-tDNA war, wie lipofizierte Plasmid-DNA, überwiegend in einem einzigen Fokus in Zellen, was suggeriert, dass tDNA im Zytoplasma geclustert wird. Viertens, wenn man den nuklearen Teil der tDNA beiseite lässt, verteilte sich cyto-tDNA in Telophase U2OS-Zellen asymmetrisch. Wie cyto-tDNA in das Zytoplasma kommt und der Grund für ihre dortige Anwesenheit ist unbekannt. Aber, wenn man eine weitere Bildung von cyto-tDNA ausschliesst, impliziert das Resultat der unausgewogenen Verteilung der cyto-tDNA, dass über die Zeit cyto-tDNA auf eine Subpopulation der Zellen beschränkt wird.

Um die Funktion der Membranhülle heraus zu finden, testeten wir die Funktion der LEM(LAP2, Emerin, MAN1)-Domänen-Proteine. Dies ist eine Gruppe von Transmembranproteinen, die überwiegend in der inneren Kernmembran vorkommt und mit sowohl mit der zytoplasmatischen Plasmid-DNA als auch mit der cyto-tDNA assoziiert war. Dafür versuchten wir durch Ueberexpression einer löslichen LEM-Domäne mit der Funktion der LEM-Domänen-Proteine zu kompetitieren. Für Plasmid-DNA fanden wir, dass die Ueberexpression der LEM-Domäne mit der Zeit in mehr Fokussen resultierte und dass an jedem analysierten Zeitpunkt mehr kleine Fokusse im Vergleich zu den grossen Fokussen und im Vergleich zu den Resultaten in der Störsituation vorhanden waren. Wir schlagen daher vor, dass die Bildung und Aufrechterhaltung von grossen Plasmid-Fokussen die Funktion der LEM-Domänen-Proteine, die die zytoplasmatische Plasmid-DNA umgeben, ist. Eine ähnliche Funktion wird für LEM-Domänen-Proteine, die mit der cyto-tDNA assoziiert sind, suggeriert, da in der Störsituation mehr cyto-tDNA Fokusse gefunden worden waren. Daher

scheinen LEM-Domänen-Proteine eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Trennung von endogener und exogener ecDNA von dem Kern und seinen Chromosomen zu spielen.

Es gab jedoch auch gravierende Unterschiede zu der Handhabung von Plasmid-DNA, was auf die Anwesenheit einer zellulären Maschinerie hindeutet, die zwischen endogener und exogener DNA differenziert: Erstens, die U2OS-Population fällt in Untergruppen, wie von der Anwesenheit von Lap2 β LEM-Domänen-Protein der inneren Kernmembran, an cyto-tDNA Fokussen reflektiert wird. In ungefähr einem Drittel der Zellpopulation war es an keiner cyto-tDNA einer einzelnen Zelle, es war sogar nicht an sehr grossen Fokussen. In ungefähr einem Drittel der Zellpopulation war es an jeder cyto-tDNA einer Zelle, sogar an sehr kleinen Fokussen. Und in einem Drittel der Zellpopulation lag eine gemischte Situation vor. Die Häufigkeit dieser drei Muster suggeriert, dass asymmetrische Zellteilungen in der U2OS-Population vorkommen. Zweitens, in ungefähr der Hälfte der cyto-tDNA war eine Plasmid-ähnliche Membran nicht detektierbar, was sogar suggerieren könnte, dass gar keine Membran diese cyto-tDNA umgibt.

Zusammengenommen, diese Studie deutet an, dass es einerseits eine zelluläre Maschinerie gibt, die möglicherweise jede DNA-Art mit einer Membran umschliesst, die ähnlich ist wie die Kernmembran, und dass es andererseits eine Maschinerie gibt, die zwischen endogener und exogener DNA im Zytoplasma differenziert. Weitere Arbeit wird nötig sein, um die Verbindung dieser beiden Maschinerien zu entziffern, um den Mechanismus der Membranhüllung von zytoplasmatischer DNA, besonders im Licht der Bildung der Kernmembran, zu identifizieren, und um den Mechanismus und seine Komponenten zu identifizieren, der die Unterscheidung von endogener und exogener ecDNA etabliert.