Deciphering Chromothripsis and Extrachromosomal DNA (ecDNA) Formation in iAMP21 B-ALL



Cancer Genomics Lab

BACKGROUND

- B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) is a malignancy of immature B-cell precursors. The iAMP21 subtype is characterized by extensive amplification and complex structural rearrangements of chromosome 21.
- Chromothripsis, a catastrophic event involving chromosome fragmentation followed by error-prone reassembly, is frequently associated with breakage–fusion–bridge (BFB) cycles and can contribute to the formation of highly complex rearrangements.
- During chromothripsis, some chromosome fragments can be circularized to form extrachromosomal DNA (ecDNA) rather than being reincorporated into the chromosome (Fig. 1).
- ecDNA can undergo strong copy-number amplification, facilitated by unequal segregation between daughter cells (Fig.2). When ecDNA carries oncogenes, this process can result in high oncogene copy numbers and provide a selective advantage to tumor cells.

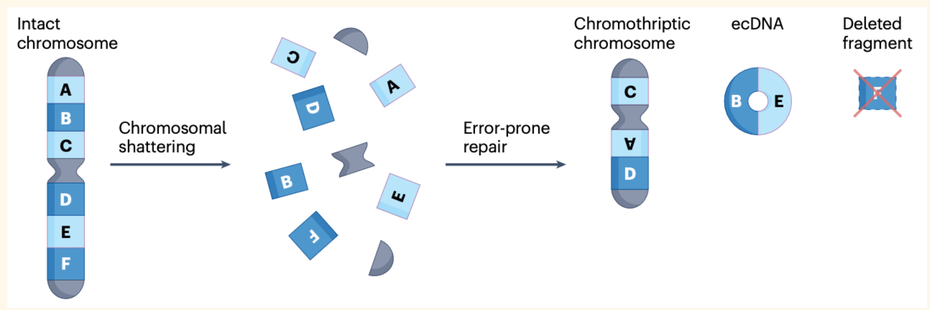


Figure 1. Catastrophic chromosome shattering followed by error-prone repair can generate a highly rearranged chromothriptic chromosome, while some fragments may be lost or circularized to form ecDNA.

- В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (B-ALL) – злокачественное заболевание незрелых предшественников В-клеток. Подтип iAMP21 характеризуется выраженной амплификацией и сложными структурными перестройками хромосомы 21.
- Хромотрипсис – катастрофическое событие, включающее фрагментацию хромосомы с последующей ошибочной сборкой ее фрагментов, – часто ассоциирован с циклами «разрыв-слияние-мост» (BFB) и может приводить к формированию сложных хромосомных перестроек.
- В ходе хромотрипсиса некоторые фрагменты хромосомы могут замыкаться в кольцо с образованием внехромосомной ДНК (ecDNA) вместо их обратного включения в хромосому (рис. 1).
- ecDNA может подвергаться значительной амплификации вследствие неравномерного распределения между дочерними клетками (рис. 2). Если ecDNA содержит онкогены, этот процесс может приводить к значительному увеличению числа их копий и обеспечивать селективное преимущество опухолевым клеткам.

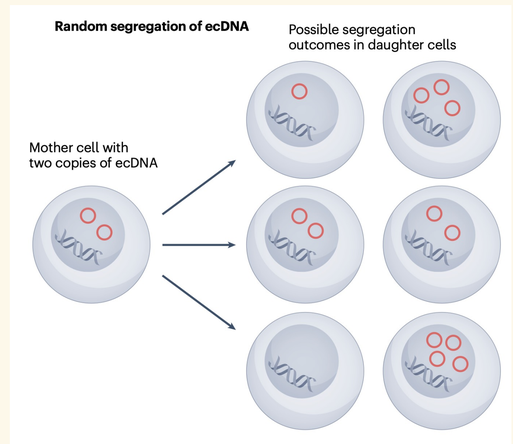


Figure 2. Random and unequal segregation of ecDNA during cell division can lead to rapid increases in ecDNA copy number and amplification of ecDNA-associated oncogenes.

DATA & METHODS

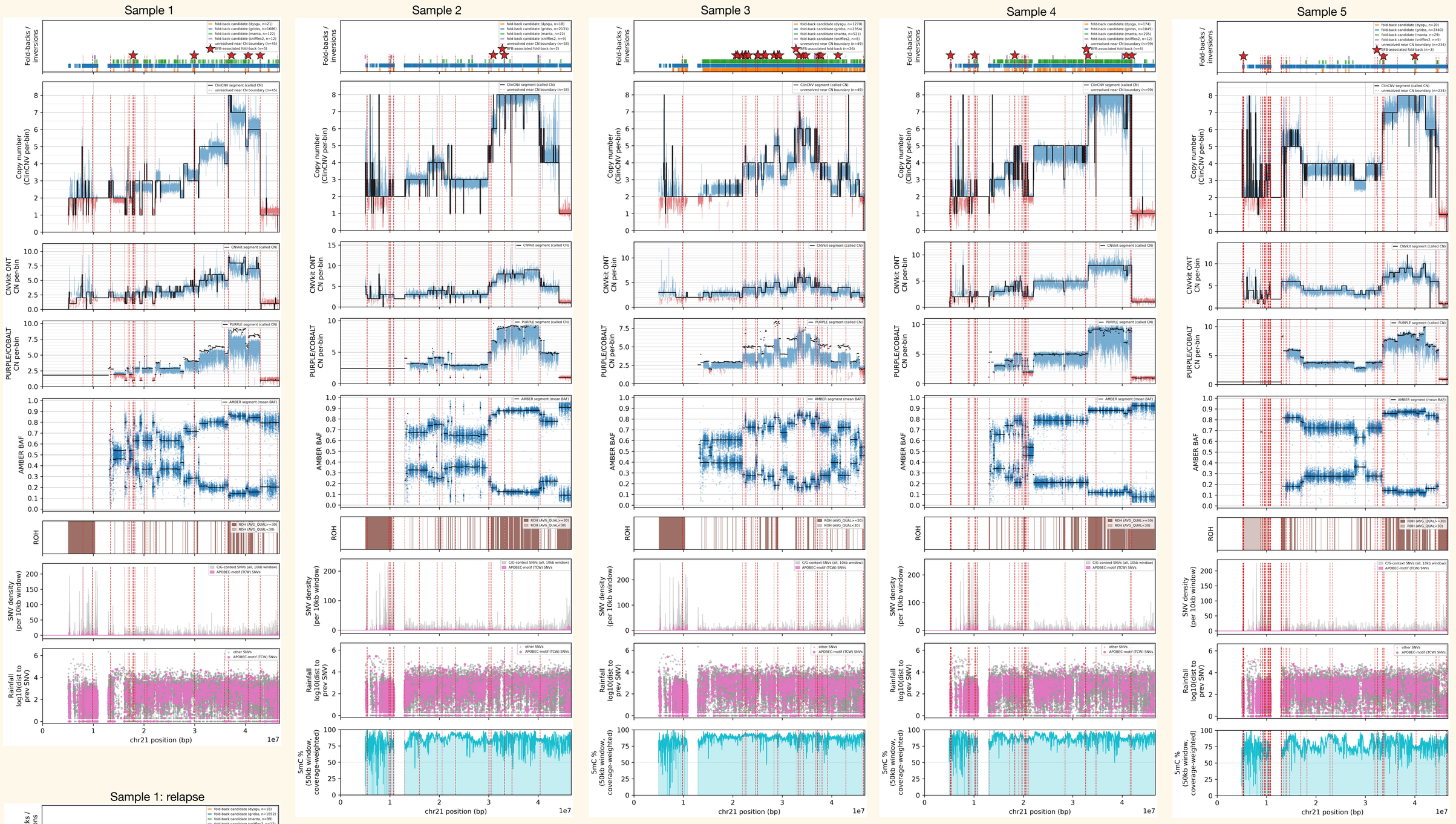
- Whole-genome sequencing data from 12 iAMP21 B-ALL samples, including both short- and long-read sequencing, were analyzed.
- Copy-number profiles, structural variants (SVs), and single-nucleotide variants (SNVs) were characterized, with a primary focus on chromosome 21.
- ecDNA-associated rearrangements and amplification patterns were investigated by integrating copy-number and structural-variant information.
- Multiple computational approaches for ecDNA detection and reconstruction were evaluated, including AmpliconSuite (AmpliconArchitect/AmpliconClassifier), GRIDSS–PURPLE–LINX, and CoRAL.

- Были проанализированы данные полногеномного секвенирования 12 образцов iAMP21 B-ALL, полученные с использованием технологий коротких и длинных ридов.
- Были охарактеризованы профили копийности, структурные варианты (SV) и однонуклеотидные варианты (SNV), с основным фокусом на хромосоме 21.
- ecDNA-ассоциированные перестройки и паттерны амплификации исследовались путем совместного анализа данных о копийности и структурных вариантах.
- Были протестированы различные вычислительные подходы для выявления и реконструкции ecDNA, включая AmpliconSuite (AmpliconArchitect/AmpliconClassifier), GRIDSS–PURPLE–LINX, и CoRAL.

RESULTS

To investigate complex rearrangements of chromosome 21, we analyzed copy-number profiles together with structural variant patterns. Interspersed copy-number states and dense clusters of rearrangements were used to assess the presence of chromothripsis, while focal amplifications and structural variants connecting the boundaries of amplified regions were examined for evidence of putative ecDNA formation.

Для исследования сложных перестроек 21-й хромосомы мы анализировали профили копийности совместно с паттернами структурных вариантов. Чередующиеся участки с различными уровнями копийности и плотные кластеры перестроек использовались для оценки наличия хромотрипсиса, тогда как локальные амплификации и структурные перестройки, соединяющие границы амплифицированных областей, анализировались как возможные признаки формирования ecDNA.

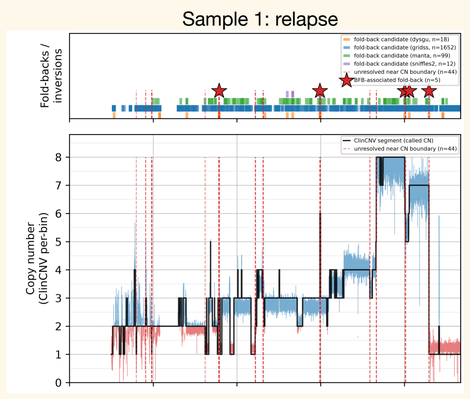


- The copy-number pattern across the main portion of chromosome 21 is consistent with a single BFB cycle.
- Two focal amplifications, together with structural rearrangements linking the boundaries of the amplified regions, suggest the possible formation of two ecDNA molecules.
- Proposed model: 1 BFB cycle, 2 ecDNA molecules.

- Three distinct copy-number levels along chromosome 21, together with interspersed regions representing all three copy-number states, are consistent with three BFB cycles and suggest at least two chromothripsis events.
- Proposed model: 3 BFB cycles, ≥2 chromothripsis events.

- Four distinct copy-number levels along chromosome 21, together with interspersed regions representing all four copy-number states, are consistent with four BFB cycles and two chromothripsis events.
- Proposed model: 4 BFB cycles, 2 chromothripsis events.

- The copy-number pattern across the main portion of chromosome 21 is consistent with a single BFB cycle.
- Two focal amplifications, together with structural rearrangements linking the boundaries of the amplified regions, suggest the possible formation of two ecDNA molecules.
- Proposed model: 1 BFB cycle, 2 ecDNA molecules.



- Several distinct amplification levels are visible, consistent with approximately 2–3 BFB cycles. Amplification of the 27–42 Mb region in the relapse sample suggests possible ecDNA formation.
- Proposed model: 2–3 BFB cycles and possible ecDNA formation at relapse.

CONCLUSIONS

- Integrated analysis of copy-number profiles and structural variants suggests that multiple mechanisms contribute to chromosome 21 evolution in iAMP21, including BFB cycles, chromothripsis, and putative ecDNA formation.
- Analysis of both short-read and long-read sequencing data indicates that BFB cycles may be followed by additional catastrophic rearrangements and focal amplifications, resulting in highly complex chromosome architectures.
- We tested several available bioinformatic tools for detecting and reconstructing BFB, chromothripsis, and ecDNA, but none consistently captured the complex patterns observed in our samples, highlighting the need for new integrative approaches capable of jointly leveraging short- and long-read sequencing data.
- By manually integrating copy-number and structural-variant patterns, we were able to propose plausible evolutionary scenarios for the formation of the complex chromosome 21 architectures observed in individual samples.

- Совместный анализ профилей копийности и структурных перестроек показывает, что в формировании сложной структуры 21-й хромосомы при iAMP21 могут участвовать несколько механизмов, включая BFB-циклы, хромотрипсис и возможное образование ecDNA.
- Анализ данных секвенирования короткими и длинными прочтениями указывает на то, что BFB-циклы могут сопровождаться последующими масштабными структурными перестройками и локальными амплификациями, формируя чрезвычайно сложную архитектуру хромосомы.
- Мы протестировали несколько существующих биоинформатических инструментов для выявления и реконструкции BFB, хромотрипсиса и ecDNA, однако ни один из них не позволил надёжно описать сложные паттерны, наблюдаемые в наших образцах. Это подчёркивает необходимость разработки интегративных методов, способных совместно использовать данные коротких и длинных ридов.
- В то же время комплексный анализ профилей копийности и структурных перестроек позволил нам предложить правдоподобные сценарии последовательности событий, приведших к формированию сложной структуры 21-й хромосомы в отдельных образцах.