

染色体外DNA: 胶质瘤靶向治疗的新靶标

田少辉 刘国鸣 徐灿

071000 保定, 河北大学附属医院神经外科 河北大学临床医学院; 071000 保定, 河北省脑胶质瘤精准诊断与治疗重点实验室

通信作者: 田少辉, Email: tsh218@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2023.10.001

【摘要】 在各类癌症的发生、发展过程中, 癌基因和周围的监管区域可以脱离染色体, 形成染色体外DNA(ecDNA)。因为其为非染色体遗传, ecDNA驱动高癌基因拷贝数和肿瘤内遗传异质性, 赋予肿瘤快速改变其基因组的能力, 加速肿瘤的演化, 并导致治疗抵抗。此外, ecDNA的环形拓扑结构导致染色质的可及性增强, 改变基因调节和癌基因转录, 驱动肿瘤生长和进展。ecDNA从亲本肿瘤细胞到后代细胞的不平等分离迅速增加了肿瘤的异质性, 从而为肿瘤提供了对免疫抑制性微环境和药物治疗的适应性, 并可能提供了肿瘤进化优势。胶质母细胞瘤(GBM)是最常见的恶性度最高的神经系统肿瘤, ecDNA在胶质瘤领域的研究尚处于初始阶段。本文讨论了目前关于ecDNA在GBM发生、发展和治疗耐药中的影响, 突出显示了新的研究并提出针对ecDNA的GBM治疗的未来研究方向, 以期拓宽对GBM疾病的认识, 助力未来从ecDNA的角度开发GBM的新型诊断标志物和治疗靶点。

【关键词】 胶质瘤; 染色体外DNA; 靶向治疗; 肿瘤进展; 耐药性; 综述

基金项目: 河北省医学适用技术跟踪项目(GZ2023075); 河北省2020年临床医学人才培养与基础研究项目(361007)

Extrachromosome DNA: a new target for targeted therapy of gliomas Tian Shaohui, Liu Guoming, Xu Can
Neurosurgery Department, Affiliated Hospital of Hebei University & School of Clinical Medicine, Hebei University, Baoding 071000, China; Hebei Provincial Key Laboratory for Accurate Diagnosis and Treatment of Glioma, Baoding 071000, China
Corresponding author: Tian Shaohui, Email: tsh218@163.com

【Abstract】 During the occurrence and development of various types of cancer, oncogenes and surrounding regulatory regions can detach from chromosomes and form extrachromosomal DNA (ecDNA). Because it is non-chromosomal inheritance, ecDNA drives high copy numbers of oncogenes and genetic heterogeneity within tumors, endowing tumors with the ability to quickly change their genomes, accelerating tumor evolution, and contributing to treatment resistance. In addition, the circular topology of ecDNA enhances chromatin accessibility, alters gene regulation and oncogene transcription, driving tumor growth and progression. The unequal separation of ecDNA from parent tumor cells to offspring cells rapidly increases the heterogeneity of tumors, providing them with adaptability to immunosuppressive microenvironment and drug therapy, and possibly providing an advantage in tumor evolution. Glioblastoma (GBM) is the most common and malignant neurological tumor, and the study of ecDNA in the field of gliomas is still in its initial stages. This article discusses the impact of ecDNA on the occurrence, development, and treatment resistance of GBM, highlights new research and proposes future research directions for GBM treatment targeting ecDNA, broadens understanding of GBM diseases, and helps to develop new diagnostic biomarkers and treatment targets for GBM from the perspective of ecDNA in the future.

【Key words】 Glioma; Extrachromosomal DNA; Targeted therapy; Tumor progression; Drug resistance; Review

Fund programs: Medical Applicable Technology Tracking Project of Hebei Province (GZ2023075); 2020 Clinical Medicine Talent Training and Basic Research Project of Hebei Province (361007)

染色体外DNA(extrachromosomal DNA, ecDNA)是指自我复制、克隆选择和扩增的环状DNA分子,

其又叫线粒体外环状DNA(extra chromosomal circular DNA, eccDNA),大小从几千碱基(kb)到几兆碱基(Mb)

不等^[1]。ecDNA于1962年被发现,1965年由Cox等^[2-3]对其进行了详细描述。目前,ecDNA已在近一半的人类癌症类型中被检测到。在肿瘤细胞系,患者来源的细胞培养物和临床肿瘤样本中的ecDNA携带MYC、MYCN、EGFR、HER2等癌基因^[4]。根据ecDNA的发现历史及目前认知,发现ecDNA为非染色体遗传,其驱动高癌基因拷贝数扩增,并使肿瘤基因组快速进化。此外,环状ecDNA结构从根本上改变了基因调控和转录,ecDNA与染色体相互作用形成的高阶结构有助于肿瘤的发生,且高阶组织会促使肿瘤发生。因此,携带ecDNA癌症患者的生存期明显较短^[5]。编码癌基因的环状ecDNA是癌症基因组的普遍特征,也是癌症进展的强大驱动因素,癌基因通常在肿瘤ecDNA上扩增^[6]。ecDNA已被报道在多种癌症中与肿瘤的进展和患者预后相关,包括胶质瘤、食管癌、卵巢癌、膀胱癌、肺癌、乳腺癌、胃癌和宫颈癌等^[4]。

胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)是发病率最高、预后最差的中枢神经系统肿瘤,即使经过手术联合化疗的标准治疗方案,GBM患者的5年生存率也仅为5.5%,这可能部分归因于GBM的化疗耐药性、异质性和浸润生长模式^[7]。以往的研究证明,GBM存在高度的肿瘤间和肿瘤内异质性,这些异质性是影响患者治疗和预后的重要因素^[8]。在遗传学方面,EGFR激活或扩增在约2/3的GBM中发生改变,其他常见的扩增基因包括PDGFRA、CDK4、MDM2、MET和CDK6,而ecDNA被认为是这些癌基因扩增的主要方式^[4]。本文总结了ecDNA的异常表达如何促进GBM遗传异质性和耐药性的研究现状,并探讨了ecDNA作为胶质瘤新型诊断标志物和治疗靶标的潜力。

一、ecDNA的基本特征和起源

ecDNA是无着丝粒的环状DNA,其来源于线性染色体并独立存在于细胞核中。ecDNA经常成对出现,因此也被称为双峰(双分钟)染色质,但有时也以单元素的形式存在^[9]。2019年,一项结合了DNA测序和高分辨率成像优势的研究为ecDNA的环状结构提供了明确的证据:(1)具有扩增子结构分析的全基因组测序揭示了几个DNA片段的循环配置,这些片段连接在一起,中间有断点。(2)远程光学映射揭示了一个跨越ecDNA所有断点的连续重叠群,进一步支持了ecDNA颗粒的圆形结构态。(3)所有超微结构成像数据,包括扫描和透射电子显微镜以及超分辨率3D结构照明显微镜都显示出了ecDNA的

环状结构^[10]。虽然ecDNA在正常细胞和肿瘤细胞中都有发现,但其可能通过促进端粒的替代延长和基因组的不稳定性在癌症发病机制中发挥作用^[11]。研究表明,肿瘤细胞染色体内的癌基因扩增很少,而ecDNA的扩增在肿瘤中非常普遍,对有丝分裂中期的GBM细胞进行观察发现EGFRv III几乎完全在ecDNA上扩增^[12]。

ecDNA的形成有多种途径,每条途径都涉及某种类型的DNA损伤,通常发生在肿瘤抑制因子丢失的背景下:(1)ecDNA被广泛认为起源于染色体分裂。染色体由于严重的DNA损伤而被分解成小块,片段连接后产生大量的DNA重排,同时也为癌症核型进化产生强大的驱动力。在某些情况下,一些破碎的DNA片段可以缝合在一起,形成环状ecDNA^[13-14]。(2)轻度DNA损伤和连接。理论上,如果一段线性双链DNA片段从头到尾连接,就会形成环状DNA。一项使用CRISPR对荧光生物传感器进行片段化和循环化的研究,通过非同源末端连接和钝端连接修复过程产生了内源性ecDNA,表明产生游离DNA片段的DNA双链断裂足以产生ecDNA,该DNA在细胞周期中存在复制^[15]。(3)分叉停滞和模板切换。对ecDNA断点的同源性分析表明,DNA复制过程中的分叉停滞和模板切换是ecDNA的另一个可能起源。在这个模型中,DNA复制又在病变处停滞,滞后链与当前模板脱离,通过微同源性侵入并退到活跃的相邻复制叉,继续合成新生DNA。链入侵和再合成可能会在链最终返回其原始模板之前发生多次。因此,在模板切换过程中合成的新生DNA与原始模板并不完全互补,导致两条链中的单链DNA凸起,然后单链DNA可以进行复制并产生ecDNA^[16]。(4)断裂-融合-桥(BFB)循环。BFB循环从DNA断裂开始,然后是端粒缩短和染色体的端到端连接,从而形成具有两个着丝粒的末期桥。桥经历断裂和重组,导致染色体的结构改变。由于子细胞含有异常着丝粒数量的染色体,因此该循环在子细胞中继续。几轮BFB循环的终产物可以重新排列并形成ecDNA。经过几轮细胞周期后,BFB循环机制导致基因扩增和染色体排列,促使癌症进展^[14,17]。(5)预先存在的ecDNA组合。ecDNA组合一旦形成,就容易继续进化。对多形性GBM儿科患者的全基因组测序数据的分析表明,与诊断样本相比,在复发样本中可以发现新形成的ecDNA。新的ecDNA可以由染色体DNA形成,也可以由现有ecDNA二次改变形成^[18]。

影像学检测是鉴定ecDNA存在和分布的金标准,具体的方法是通过药物处理或有丝分裂脱落,采用低渗溶液溶胀处于有丝分裂期的细胞,并用3:1甲醇乙酸固定剂固定后,将细胞滴到加湿的载玻片上,最后用DNA染料染色后在显微镜下观察,将该实验与荧光原位杂交实验相结合,可以明确地检测目的基因是否在ecDNA上扩增;基于此方法开发的算法和软件工具ecDetect和ecSeg等可以进一步提高检测的敏感度和精度,降低检测的假阳性率^[19]。近年来,高通量测序技术的发展实现了批量检测肿瘤ecDNA上基因表达的空间和结构基础,例如转座酶可及性染色质测序(assay for transposase accessible chromatin with high-throughput sequencing, ATAC-seq)^[20]、染色质免疫沉淀测序(chromatin immunoprecipitation sequencing, ChIP-seq)、高通量染色体构象捕获技术(high-throughput chromosome conformation capture, Hi-C)^[21]、通过配对末端标签测序进行染色质作用分析(chromatin interaction analysis by paired-end tag sequencing, ChIA-PET)^[22]、染色质相互作用分析与液滴测序(chromatin interaction analysis and droplet sequencing, ChIA-Drop)^[23]以及单细胞测序技术等,这些不同的方法已被应用于研究ecDNA的基因调控,测序信号代表样品中的所有DNA物质,包括染色体DNA和ecDNA^[24]。

二、ecDNA与胶质瘤耐药和恶性预后密切相关

ecDNA最近被确定为GBM异质性和治疗耐药性的关键因素^[25],ecDNA在癌基因扩增、染色体重排和细胞过程等多种细胞通路中起主要作用,这些通路与癌症的发展有关,包括转移/侵袭、自噬、免疫逃逸、药物反应和临床结局^[26]。Kumar等^[27]的研究表明,与非肿瘤组织相比,肿瘤组织来源的ecDNA尺寸明显更长;该研究还表明,术后循环ecDNA长度缩短可以预测患者预后良好,而循环ecDNA长度的延长可能与疾病复发有关^[28]。在GBM患者中,新的ecDNA类型在肿瘤复发时出现,这些类型是通过将新的含有癌基因的片段整合到诊断时发现的ecDNA中产生,ecDNA很容易进化,从而迅速增加肿瘤异质性^[18]。

相关研究表明,在GBM的ecDNA上发现了包括EGFR、PDGFRA、ERBB2和KIT在内的癌基因,并且这些癌基因大量扩增,进而在肿瘤进展中起关键作用^[29-30]。EGFR在GBM患者中经常发生突变,形成致癌变异型EGFRv III。EGFRv III促进肿瘤生长,但会使GBM细胞对EGFR酪氨酸激酶抑

制剂更敏感^[31]。Zhou等^[32]的研究表明,GBM细胞ecDNA上的EGFR增加,携带ecDNA的GBM细胞具有更高的侵袭性和放疗抵抗性。此外,在GBM细胞的ecDNA上,中期分析还表明组蛋白激活标记基因(H3K4me1和H3K27ac)的水平增加,而抑制性标记基因(H3K4me1和H3K27ac)的水平降低^[33]。几项研究证实,药物治疗后ecDNA丰度发生改变。某些药物治疗导致ecDNA拷贝数增加以产生耐药性,而另一些药物治疗导致携带药物靶标的ecDNA下降以产生耐药性,这取决于细胞的生长速度或治疗适应性^[34],如甲氨蝶呤是一种靶向核苷酸代谢关键酶(称为二氢叶酸还原酶)的药物,用甲氨蝶呤处理细胞导致携带二氢叶酸还原酶基因(dihydrofolate reductase, DHFR)的ecDNA数量增加,从而导致甲氨蝶呤耐药。在这种情况下,药物靶标的增加会使细胞适应性增强。相反,携带EGFR突变体(EGFRv III)的ecDNA增加细胞对EGFR抑制剂的敏感性,当细胞产生耐药性时会降低。这些细胞中均匀染色区(homogeneously staining regions, HSR)的染色分析显示这些ecDNA重新整合到染色体中。ecDNA的这种重新定位是可逆的,因为携带突变体的ecDNA在去除药物干预后会重新出现。用EGFR抑制剂处理后,同基因细胞系对(一对含有EGFRv III对染色体HSR的扩增,另一对含有对ecDNA的扩增)之间的药物治疗效果对比显示,HSR细胞系对药物保持敏感,而含有ecDNA的细胞在2周内产生耐药性^[35]。

三、ecDNA在胶质瘤中的致癌机制

Morton等^[36]的研究表明,致癌转录调控由ecDNA的增强子结构介导,而且在ecDNA的产生过程中,局部增强子元件通常总是与ecDNA结构中的癌基因结合。此外,Zhu等^[37]的研究报道了癌症中ecDNA的染色质连接网络,进一步支持ecDNA可以作为移动超级增强子,驱动全基因组转录扩增,包括癌基因。这一发现解释了与ecDNA相关的癌基因被大量转录的原因^[6]。在ecDNA的合成过程中,增强子位于癌基因EGFR的非编码区域,这些区域位于原始染色体的拓扑结构域(topologically associating domains, TAD)之外,这可能意味着ecDNA能够建立超远程染色质相互作用。这些增强子在ecDNA中重新连接以增加癌基因EGFR表达和肿瘤适应性,使用CRISPR干扰禁用单个增强子活性揭示了增强子在控制癌基因扩增方面的独特机制^[36]。有证据表明,ecDNA可出现继发性体细胞改

变,包括点突变、插入和缺失,这意味着GBM在原始肿瘤治疗和复发中具有不断改变的轨迹^[38]。de Carvalho等^[39]通过对13个GBM肿瘤样本、神经球形形成培养物和源自这些样本的原位异种移植模型进行全面的基因组和转录组学分析,发现ecDNA在后代细胞之间表现出不同的遗传模式和克隆选择动力学,这进一步支持了ecDNA介导的GBM基因组异质性迅速增加的观点。子细胞中不均匀的ecDNA遗传导致胶质瘤发生期间基因组异质性迅速增加,这种异质性与染色体DNA变化无关。ecDNA还与染色体DNA相互作用或形成ecDNA中心以调节癌基因表达。ecDNA作为一种移动反式作用组分,通过与染色体DNA相互作用增强转录。Hi-C分析表明,在来自GBM患者的3个细胞系中,其中2个细胞系的ecDNA呈阳性,并且ecDNA与富含H3K27ac信号的染色体非编码序列相互作用。此外,ecDNA和染色质之间的相互作用与转录活性有关,人工合成的模拟ecDNA的环状DNA增加了ecDNA阴性细胞中染色体癌基因的表达。因此,上述证据支持ecDNA通过与染色体DNA相互作用而成为癌基因表达的有效反式调节因子^[37]。此外,在源自多种癌症类型并含有MYC、FGFR2和EGFR癌基因扩增的细胞中发现了ecDNA枢纽,即细胞核内10~100个ecDNA的簇,当该枢纽与其他ecDNA在空间方面聚集时,通过分子间增强子,即基因的相互作用,每个ecDNA更有可能转录癌基因,促使癌基因过表达,表明ecDNA枢纽代表了ecDNA可以驱动癌基因过表达的常见机制^[40-41]。癌症基因组具有大量的体细胞突变,使癌细胞具有生存优势。早期的报道了一些聚集的体细胞突变,例如簇状单碱基替换、弥漫性超突变(称为omikli)和更长的链协调事件(称为kataegis)。Bergstrom等^[42]观察到含有癌症相关基因的ecDNA经常遭受kyklonic超突变,这促进了ecDNA的进化。此外,复发性kyklonic超突变在癌症相关基因内或附近增加,包括ARNT、TP53和MDM2。研究证实ecDNA中的kyklonic超突变由APOBEC3主导,APOBEC3介导的kyklonic超突变经常发生在ecDNA中,并且该过程经历了DNA片段的广泛重组,这可能由染色体分裂引起,而这种新的肿瘤发生模型也为新的治疗模式奠定了基础。开发限制APOBEC3活性的药物可能对癌症患者有利^[42]。

四、ecDNA在胶质瘤治疗中的临床意义

ecDNA在GBM中常见,90%患者来源的GBM

肿瘤模型含有ecDNA^[1]。肿瘤细胞通过不断改变其基因组获得生存优势。癌基因扩增是基因组改变的一种经典形式。在癌细胞中ecDNA高表达是维持癌基因扩增的重要方式^[43]。因此,通过消除ecDNA限制癌细胞的存活可能是一种有效的治疗方法^[44]。然而,目前与ecDNA相关的靶向药物很少。更值得注意的是,由于微核的形成有助于ecDNA消除,因此已经证实抗代谢物羟基脲(hydroxyurea)可以增强这一过程。可惜的是,羟基脲在治疗当中未达到预期的效果,但现有的观察结果可能为进一步的药物筛选提供研究基础^[45]。形成ecDNA中心的ecDNA空间异常分布可导致ecDNA之间以及ecDNA与染色体DNA之间的反式相互作用。因此,ecDNA的空间异常分布可能代表着针对ecDNA治疗的另一途径。参与ecDNA中心形成的蛋白质被认为是新兴的潜在治疗靶点^[40];ecDNA枢纽的稳定性与末端外结构域(BET)蛋白BRD4的存在密不可分,BRD4抑制剂在神经母细胞瘤中已经取得了一定的治疗效果^[46]。

分析胶质瘤中ecDNA表达谱的生物信息学研究显示,ecDNA-BASP1存在于GBM组织中,并与患者的预后呈正相关。敲低ecDNA-BASP1后,GBM细胞的增殖、迁移和侵袭上调。双氢青蒿素可以通过上调胶质瘤ecDNA中抑癌基因BASP1从而抑制胶质瘤的上皮间质转化过程,逆转胶质瘤的恶性行为,这项研究揭示了ecDNA作为胶质瘤治疗靶点的潜力^[47]。

液体活检,如对循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)或血浆中游离DNA(circulating free DNA, cfDNA)进行诊断性分子检测,以发现血液中脱落的癌细胞或游离的肿瘤DNA片段,常被用于肿瘤筛查和癌症预后判断^[48]。然而线性DNA的半衰期非常短(15 min到几小时),原因在于血液中存在的核酸酶,而环状DNA保留时间更长^[49]。此外,环状DNA较线性DNA更容易通过细胞膜,ecDNA可以从原位肿瘤释放到循环系统中,提示ecDNA可以作为未来胶质瘤液体活检具有潜力的诊断标志物^[27, 49]。如果在原发性肿瘤样本中检测到ecDNA,GBM患者的无复发时间明显缩短^[39]。肿瘤异质性是耐药性的重要原因,ecDNA整合频率的增加可能会降低癌细胞之间的异质性。目前,PARP已被证明可以降低ecDNA重新整合的频率,因此可能成为候选的治疗靶点^[14]。然而,ecDNA重新整合也会不可避免地产生一些不利影响,例如影响邻近癌基因的表达、增

加基因组的不稳定性并破坏肿瘤抑制基因的序列结构。因此,需要进一步的研究以避免ecDNA的不良反应,改善临床治疗效果^[50]。

五、小结和展望

ecDNA研究正在迅速发展,但目前仍有一些关键领域问题必须解决:(1)阐明ecDNA的基本生物学,需要详细说明染色体不稳定性在ecDNA形成中的机制,并进一步探索NHEJ途径和双链断裂在这一过程中的作用。(2)ecDNA整合对基因组重排及其作为HSR的重新定位的影响仍未完全了解。此外,ecDNA与肿瘤进化的相关作用仍需进一步探讨。

随着对ecDNA致病机制的深入探索,研究者们有望克服与ecDNA相关的临床疾病。由于其具有相对稳定性和与人类疾病的关联性,ecDNA分子可以作为敏感的生物标志物,使相关疾病早期诊断成为可能。此外,作为一种预测性生物标志物,ecDNA可以为患者选择化疗、靶向治疗或免疫治疗提供指导,从而实现个体化精准医疗。另一方面,鉴于ecDNA在癌症进展中的重要作用,开发靶向ecDNA的药物是一种有潜力的肿瘤治疗策略^[51]。ecDNA对精准肿瘤学和靶向癌症治疗造成了阻碍,未来的研究将需要更好地了解ecDNA形成、功能、维持和脆弱性的分子发病机制以及其与微环境(包括免疫系统)的相互作用,以克服这些障碍并为癌症患者开发更有效的治疗方法。

利益冲突 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

作者贡献声明 资料收集与论文撰写为田少辉、刘国鸣、徐灿

参 考 文 献

- [1] Turner KM, Deshpande V, Beyter D, et al. Extrachromosomal oncogene amplification drives tumour evolution and genetic heterogeneity[J]. *Nature*, 2017, 543(7643): 122-125. DOI: 10.1038/nature21356.
- [2] Cox D, Yuncken C, Spriggs AI. Minute chromatin bodies in malignant tumours of childhood[J]. *Lancet*, 1965, 1(7402): 55-58. DOI: 10.1016/s0140-6736(65)90131-5.
- [3] Spriggs AI, Boddington MM, Clarke CM. Chromosomes of human cancer cells[J]. *Br Med J*, 1962, 2(5317): 1431-1435. DOI: 10.1136/bmj.2.5317.1431.
- [4] Kim H, Nguyen NP, Turner K, et al. Extrachromosomal DNA is associated with oncogene amplification and poor outcome across multiple cancers[J]. *Nat Genet*, 2020, 52(9): 891-897. DOI: 10.1038/s41588-020-0678-2.
- [5] Wu S, Bafna V, Chang HY, et al. Extrachromosomal DNA: an emerging hallmark in human cancer[J]. *Annu Rev Pathol*, 2022, 17: 367-386. DOI: 10.1146/annurev-pathmechdis-051821-114223.
- [6] Bailey C, Shoura MJ, Mischel PS, et al. Extrachromosomal DNA-relieving heredity constraints, accelerating tumour evolution[J]. *Ann Oncol*, 2020, 31(7): 884-893. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.03.303.
- [7] Uddin MS, Mamun AA, Alghamdi BS, et al. Epigenetics of glioblastoma multiforme: from molecular mechanisms to therapeutic approaches[J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 83: 100-120. DOI: 10.1016/j.semcancer.2020.12.015.
- [8] Nicholson JG, Fine HA. Diffuse glioma heterogeneity and its therapeutic implications[J]. *Cancer Discov*, 2021, 11(3): 575-590. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-20-1474.
- [9] Zuo S, Yi Y, Wang C, et al. Extrachromosomal circular DNA (eccDNA): from chaos to function[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 792555. DOI: 10.3389/fcell.2021.792555.
- [10] Wu S, Turner KM, Nguyen N, et al. Circular ecDNA promotes accessible chromatin and high oncogene expression[J]. *Nature*, 2019, 575(7784): 699-703. DOI: 10.1038/s41586-019-1763-5.
- [11] Paulsen T, Kumar P, Koseoglu MM, et al. Discoveries of Extrachromosomal Circles of DNA in Normal and Tumor Cells[J]. *Trends Genet*, 2018, 34(4): 270-278. DOI: 10.1016/j.tig.2017.12.010.
- [12] Nathanson DA, Gini B, Mottahedeh J, et al. Targeted therapy resistance mediated by dynamic regulation of extrachromosomal mutant EGFR DNA[J]. *Science*, 2014, 343(6166): 72-76. DOI: 10.1126/science.1241328.
- [13] Leibowitz ML, Zhang CZ, Pellman D. Chromothripsis: a new mechanism for rapid karyotype evolution[J]. *Annu Rev Genet*, 2015, 49: 183-211. DOI: 10.1146/annurev-genet-120213-092228.
- [14] Shoshani O, Brunner SF, Yaeger R, et al. Chromothripsis drives the evolution of gene amplification in cancer[J]. *Nature*, 2021, 591(7848): 137-141. DOI: 10.1038/s41586-020-03064-z.
- [15] Møller HD, Lin L, Xiang X, et al. CRISPR-C: circularization of genes and chromosome by CRISPR in human cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(22): e131. DOI: 10.1093/nar/gky767.
- [16] Yang L, Luquette LJ, Gehlenborg N, et al. Diverse mechanisms of somatic structural variations in human cancer genomes[J]. *Cell*, 2013, 153(4): 919-929. DOI: 10.1016/j.cell.2013.04.010.
- [17] Zakov S, Kinsella M, Bafna V. An algorithmic approach for breakage-fusion-bridge detection in tumor genomes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(14): 5546-5551. DOI: 10.1073/pnas.1220977110.
- [18] Xu K, Ding L, Chang TC, et al. Structure and evolution of double minutes in diagnosis and relapse brain tumors[J]. *Acta Neuropathol*, 2019, 137(1): 123-137. DOI: 10.1007/s00401-018-1912-1.
- [19] Rajkumar U, Turner K, Luebeck J, et al. EcSeg: Semantic Segmentation of Metaphase Images Containing Extrachromosomal DNA[J]. *iScience*, 2019, 21: 428-435. DOI: 10.1016/j.isci.2019.10.035.
- [20] Buenrostro JD, Wu B, Chang HY, et al. ATAC-seq: A Method for Assaying Chromatin Accessibility Genome-Wide[J]. *Curr Protoc Mol Biol*, 2015, 109: 21.29.1-21.29.9. DOI: 10.1002/0471142727.mb2129s109.
- [21] Mumbach MR, Rubin AJ, Flynn RA, et al. HiChIP: efficient and sensitive analysis of protein-directed genome architecture[J]. *Nat Methods*, 2016, 13(11): 919-922. DOI: 10.1038/nmeth.3999.
- [22] Tang Z, Luo OJ, Li X, et al. CTCF-mediated human 3D genome

- architecture reveals chromatin topology for transcription[J]. *Cell*, 2015, 163(7): 1611-1627. DOI: 10.1016/j.cell.2015.11.024.
- [23] Zheng M, Tian SZ, Capurso D, et al. Multiplex chromatin interactions with single-molecule precision[J]. *Nature*, 2019, 566(7745): 558-562. DOI: 10.1038/s41586-019-0949-1.
- [24] Lareau CA, Duarte FM, Chew JG, et al. Droplet-based combinatorial indexing for massive-scale single-cell chromatin accessibility[J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(8): 916-924. DOI: 10.1038/s41587-019-0147-6
- [25] Cortés-Ciriano I, Lee JJ, Xi R, et al. Comprehensive analysis of chromothripsis in 2, 658 human cancers using whole-genome sequencing[J]. *Nat Genet*, 2020, 52(3): 331-341. DOI: 10.1038/s41588-019-0576-7.
- [26] Wang Y, Huang R, Zheng G, et al. Small ring has big potential: insights into extrachromosomal DNA in cancer[J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 236. DOI: 10.1186/s12935-021-01936-6.
- [27] Kumar P, Dillon LW, Shibata Y, et al. Normal and Cancerous Tissues Release Extrachromosomal Circular DNA (eccDNA) into the Circulation[J]. *Mol Cancer Res*, 2017, 15(9): 1197-1205. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-17-0095.
- [28] Kumar P, Kiran S, Saha S, et al. ATAC-seq identifies thousands of extrachromosomal circular DNA in cancer and cell lines[J]. *Sci Adv*, 2020, 6(20): eaba2489. DOI: 10.1126/sciadv.aba2489.
- [29] Nikolaev S, Santoni F, Garieri M, et al. Extrachromosomal driver mutations in glioblastoma and low-grade glioma[J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 5690. DOI: 10.1038/ncomms6690.
- [30] Sanborn JZ, Salama SR, Grifford M, et al. Double minute chromosomes in glioblastoma multiforme are revealed by precise reconstruction of oncogenic amplicons[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(19): 6036-6045. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0186.
- [31] Iurlaro R, Waldhauer I, Planas-Rigol E, et al. A novel EGFRv III T-cell bispecific antibody for the treatment of glioblastoma[J]. *Mol Cancer Ther*, 2022, 21(10): 1499-1509. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-22-0201.
- [32] Zhou YH, Chen Y, Hu Y, et al. The role of EGFR double minutes in modulating the response of malignant gliomas to radiotherapy[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(46): 80853-80868. DOI: 10.18632/oncotarget.20714.
- [33] Corces MR, Granja JM, Shams S, et al. The chromatin accessibility landscape of primary human cancers[J]. *Science*, 2018, 362(6413): eaav1898. DOI: 10.1126/science.aav1898.
- [34] Nathanson DA, Gini B, Mottahedeh J, et al. Targeted therapy resistance mediated by dynamic regulation of extrachromosomal mutant EGFR DNA[J]. *Science*, 2014, 343(6166): 72-76. DOI: 10.1126/science.1241328.
- [35] Lange JT, Rose JC, Chen CY, et al. The evolutionary dynamics of extrachromosomal DNA in human cancers[J]. *Nat Genet*, 2022, 54(10): 1527-1533. DOI: 10.1038/s41588-022-01177-x.
- [36] Morton AR, Dogan-Artun N, Faber ZJ, et al. Functional Enhancers Shape Extrachromosomal Oncogene Amplifications[J]. *Cell*, 2019, 179(6): 1330-1341 e13. DOI: 10.1016/j.cell.2019.10.039.
- [37] Zhu Y, Gujar AD, Wong CH, et al. Oncogenic extrachromosomal DNA functions as mobile enhancers to globally amplify chromosomal transcription[J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(5): 694-707 e7. DOI: 10.1016/j.ccell.2021.03.006.
- [38] Karami Fath M, Karimfar N, Fazlollahpour Naghibi A, et al. Revisiting characteristics of oncogenic extrachromosomal DNA as mobile enhancers on neuroblastoma and glioma cancers[J]. *Cancer Cell Int*, 2022, 22(1): 200. DOI: 10.1186/s12935-022-02617-8.
- [39] de Carvalho AC, Kim H, Poisson LM, et al. Discordant inheritance of chromosomal and extrachromosomal DNA elements contributes to dynamic disease evolution in glioblastoma[J]. *Nat Genet*, 2018, 50(5): 708-717. DOI: 10.1038/s41588-018-0105-0.
- [40] Hung KL, Yost KE, Xie L, et al. ecDNA hubs drive cooperative intermolecular oncogene expression[J]. *Nature*, 2021, 600(7890): 731-736. DOI: 10.1038/s41586-021-04116-8.
- [41] Weiser NE, Hung KL, Chang HY. Oncogene convergence in extrachromosomal DNA hubs[J]. *Cancer Discov*, 2022, 12(5): 1195-1198. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-22-0076.
- [42] Bergstrom EN, Luebeck J, Petljak M, et al. Mapping clustered mutations in cancer reveals APOBEC3 mutagenesis of ecDNA[J]. *Nature*, 2022, 602(7897): 510-517. DOI: 10.1038/s41586-022-04398-6.
- [43] van Leen E, Brückner L, Henssen AG. The genomic and spatial mobility of extrachromosomal DNA and its implications for cancer therapy[J]. *Nat Genet*, 2022, 54(2): 107-114. DOI: 10.1038/s41588-021-01000-z.
- [44] Oobatake Y, Shimizu N. Double-strand breakage in the extrachromosomal double minutes triggers their aggregation in the nucleus, micronucleation, and morphological transformation[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2020, 59(3): 133-143. DOI: 10.1002/gcc.22810.
- [45] Raymond E, Faivre S, Weiss G, et al. Effects of hydroxyurea on extrachromosomal DNA in patients with advanced ovarian carcinomas[J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(5): 1171-1180.
- [46] Henssen A, Althoff K, Odersky A, et al. Targeting MYCN-driven transcription by BET-bromodomain inhibition[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(10): 2470-2481. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1449.
- [47] Que Z, Zhou Z, Liu S, et al. Dihydroartemisinin inhibits EMT of glioma via gene BASP1 in extrachromosomal DNA[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2023, 675: 130-138. DOI: 10.1016/j.bbrc.2023.07.019.
- [48] Aghamir SMK, Heshmat R, Ebrahimi M, et al. Liquid biopsy: the unique test for chasing the genetics of solid tumors[J]. *Epigenet Insights*, 2020, 13: 2516865720904052. DOI: 10.1177/2516865720904052.
- [49] Zhu J, Zhang F, Du M, et al. Molecular characterization of cell-free eccDNAs in human plasma[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10968. DOI: 10.1038/s41598-017-11368-w.
- [50] Koche RP, Rodriguez-Fos E, Helmsauer K, et al. Extrachromosomal circular DNA drives oncogenic genome remodeling in neuroblastoma[J]. *Nat Genet*, 2020, 52(1): 29-34. DOI: 10.1038/s41588-019-0547-z.
- [51] Foulkes I, Sharpless NE. Cancer grand challenges: embarking on a new era of discovery[J]. *Cancer Discov*, 2021, 11(1): 23-27. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-20-1657.

(收稿日期: 2023-07-30)

(本文编辑: 赵金鑫)