

Kanser Hastalarının Serum/Plazmalarında Tümör-Spesifik DNA: Kanser Erken Tanısında Potansiyel Önemi

Deligezer U.

Kanser, ölüme en sık yol açan hastalıkların başında gelmektedir. Bazı kanser tiplerinin tanı ve tedavisindeki ilerlemelere karşın, kanserin erken tanı ve tedavisi halen büyük bir sorun olmaya devam etmektedir. Zira kanser hastalarının bir çoğunda kanser tanısı hastalığın ileri safhalarında veya metastaz yapmasından sonra gerçekleşmektedir. Bu aşamada cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi gibi bugünkü tedavi seçeneklerinin de ancak sınırlı etki gösterebildiği bilinmektedir. Bu da mortalitenin yüksek olmasıyla sonuçlanmaktadır. Bu nedenle, hastalığın erken belirlenmesine olanak sağlayacak yeni gelişmeler ve teknikler kanser mortalitesini etkileyecektir.¹

Serumda bulunan ve kanserin belli tiplerine spesifik olan proteinlerin eser miktarlarının saptanması, karsinoembriyonik antijen ve alfa-fetoprotein gibi tümör belirleyicilerin geliştirilmesiyle başlamıştır. İmmündefüzyon ve daha sonra RIA ve ELISA tekniklerinin kullanılması pek çok serum tümör belirleyicinin bulunmasına yol açmış, bunların bir çoğu rutin kullanıma girmiştir. Ancak bu tür belirleyicilerin dezavantajı sınırlı spesifite ve sensitiviteye sahip olmalarıdır.^{2,3} Son yıllarda kanser hastalarının serum veya plazmalarında tümöre özgü moleküler değişikliklerin bulunduğunun anlaşılması ile kanser tanısında yeni bir dönem başlamaktadır. Moleküler biyomarkerlerin, özellikle de kanser inisiyasyon ve progresyonu ile ilişkili olanların bulunması kanserin erken belirlenmesi için geliştirilecek stratejiler için yararlı olacaktır. Serum/plazmadaki tümöre özgü moleküler değişiklikler, dolaşımda bulunan çok az miktarlardaki DNA'yı çoğaltabilen polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) dayalı metotlarla belirlenebilmekte ve kantitatif olarak analiz edilebilmektedirler. Çok duyarlı olan bu teknikler kanserin moleküler hedeflerini belirlemeye yönelik yeni imkanlar sunmaktadır.

Serum ve plazmada serbest DNA varlığının gösterilmesi 1970'li yıllara kadar uzanmaktadır. 1977 yılında, RIA metoduyla kanser hastalarının dolaşımında sağlıklı insanlara oranla daha yüksek miktarda DNA olduğu gösterilmiştir. Bazı kanser türlerinde serum veya plazmada DNA düzeyi yüksek bulunurken, en yüksek DNA düzeyleri pankreas kanserli hastalarda gözlenmiştir⁴. Diğer bir çalışmada, erken evre akciğer kanserli hastaların ileri evre hastalara göre daha düşük, ancak sağlıklı kontrollerden daha

yüksek DNA seviyelerine sahip olduğu gösterilmiştir.⁵ Furnie ve arkadaşları, dolaşımlarında düşük miktarlarda DNA'ya sahip olan kanser hastalarında sağkalımın, 100 ng/ml DNA'ya sahip olanlara göre daha uzun olduğunu bildirmiştir.⁶ 80 ng/ml DNA miktarı cut-off noktası olarak belirlenmek suretiyle, akciğer kanserli hastaların %71'i, selim pulmoner hastalarının ise %37'si bu oranla ayırt edilebilmiştir (Tablo 1).⁷ Bu araştırma aynı zamanda, plazma DNA düzeylerinin başarısız tedaviyi takiben artma, başarılı tedaviden sonra ise azalma eğiliminde olduğunu da göstermiştir.

Bugün artık bilinmektedir ki, dolaşıma salınan DNA miktarı tümörün büyüme hızı, histolojik grad veya apoptoz-nekroz derecesine göre değişmektedir.⁸ Burada cevabı henüz tam olarak bilinmeyen önemli soru, tümörden sirkülasyona DNA'nın nasıl geçtiğidir? Bunun mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, hızlı çoğalan hücrelerden aktif salınma ile tümör hücrelerinin apoptozu veya nekrozu gibi mekanizmalar önerilmiştir.⁹ Sonuçta, DNA bütün olarak veya apoptoz ve nekrozla ölmüş hücrelerden parçalanmış halde sirkülasyona verilmekte ve serum/plazmada belirlenebilmektedir.¹⁰

Kanda serbest dolaşan DNA'nın varlığı 1970'li yıllarda belirlenmiş olmasına rağmen, kanser hastalarının dolaşımında bulunan serbest DNA'nın neoplastik özelliği olduğu ve tümörün biyolojik karakterini yansıttığının anlaşılması 1980'li yılların sonlarında gerçekleşmiştir.¹¹ Bunu takip eden yıllarda, Sorenson ve arkadaşları¹², pankreas kanserli hastaların dolaşımlarında tümör-kökenli K-ras onkogen mutasyonlarını; Vasioukhin ve arkadaşları¹³ ise myelodisplastik sendromda N-ras mutasyonlarını bildirmişlerdir. Bu klasik çalışmaların ışığında, yeni tümör belirleyiciler geliştirme konusunda araştırmalara başlanmıştır.

Pek çok kanser türünde, tümör dokusunda belirlenen

Tablo 1. 80 ng/ml Plazma DNA Miktarına Göre Kanser Belirleme Oranı.

	Hasta sayısı	Belirleme Oranı (%)
Sağlıklı kontrol	59	0
Pulmoner hastalık	54	37
Akciğer kanseri	45	71

spesifik onkogenler, tümör baskılayıcı genlerdeki nokta mutasyonları, heterozigotluk kaybı, mikrosatellit instabilitesi, kromozomal translokasyonlar ve hipermetilasyon (p16) gibi moleküler değişiklikler hastaların önemli bir bölümünde serum veya plazmada da bildirilmiştir.¹⁴⁻¹⁸ Kolorrektal ve pankreas kanserli hastaların plazmalarında klinik tanıdan önce Ras geni mutasyonları gösterilmiştir.¹⁹⁻²¹ Hodgkin lenfoma ve B-hücre lösemili hastaların plazmalarında yeniden düzenlenmeye maruz kalmış immünglobulin ağır zincir DNA'sı belirlenebilmektedir. Mikrosatellit instabilitesi baş-boyun, akciğer, meme, renal hücre, kolon kanseri ve malign melanomalı hastaların plazma/serumlarında gösterilmiştir.²²⁻²⁴ Kanser hastalarının kan dolaşımında tümör-spesifik DNA dışında, virüs-spesifik nükleik asitler de belirlenebilmektedir. Hodgkin, Burkitt lenfoma ve nazofarenks kanserli hastaların plazmalarında Epstein-Barr virüs (EBV) DNA'sı^{25,26}, baş-boyun kanserli hastalarda human papilloma virüs (HPV) DNA'sı belirlenmiştir.²⁷ Bunun dışında, kanser hastalarında dolaşımda bulunan tümör mRNA'larının kantitatif analizi kanser progresyonunun takibinde ve tedaviye cevabının değerlendirilmesinde yararlı gözükmektedir.²⁸

Tümörün erken belirlenmesinde kullanılabilir, potansiyeli en yüksek biyomarkerlerden biri "DNA metilasyonu" olarak gözükmektedir. DNA metilasyonu, DNA'nın doğal olarak gerçekleşen tek epigenetik değişikliğidir. Fizyolojik DNA metilasyonunda meydana gelen bozukluklar karsinogeneizde önemli rol oynamaktadır. Genomun geniş çaplı hipometilasyonu genom instabilitesine yol açarken, bazı kanser-ilişkili genlerin (tümör baskılayıcı genler, DNA tamir genleri, metastaz-inhibitör genler) genellikle promotör bölgelerinde "CpG islands" olarak adlandırılan noktalarda hipermetilasyona maruz kalması, kanser baskılayıcı olan bu çok önemli genlerin inaktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Kanserde tümör baskılayıcı genlerin hipermetilasyonu oldukça sık görülmektedir.²⁹ En fazla etkilenen gen grubu, hücre döngüsünün kontrolünde önemli rol oynayan siklin-bağımlı kinaz (CDK) inhibitörleridir (p15, p16 ve p27 gibi).³⁰ Bu genlerin kodladığı proteinler, siklin-bağımlı kinazlara bağlanmakta ve bunların siklin proteinleri ile etkileşimini ve böylece CDK/siklin komplekslerinin kinaz aktivitesini önlemektedirler. Hücre döngüsünün G1/S, S/G2, G2/M ve Mitoz geçiş noktalarının kontrolü CDK/siklin komplekslerinin aktivitelerinin regülasyonu ile sağlanmaktadır. Örneğin tümör baskılayıcı gen p16, G1/S noktasında anahtar rol oynayan retinoblastoma proteininin (Rb) CDK-aracılıklı fosforilasyonunu önlemektedir. p16 geninin hipermetilasyonu fonksiyon kaybı ile sonuçlanmakta ve Rb'nin hiperfosforilasyonuna yol açmaktadır. Bu da, kontrolsüz ve sınırsız hücre çoğalmasına ve dolayısıyla kanser oluşumuna yol açabilmektedir. p16 metilasyonu akciğer, meme, karaciğer, kolon gibi farklı kanser türlerinden hastaların serum veya plazmasında belirlenmiştir.^{17,30,31} Bizim laboratuvarımızda ise p16 gen metilasyonu lenfomalı hastaların plazmalarında gösterilmiştir.³²

Çalışmalar, DNA metilasyonunun tümörün erken belir-

lenmesinde kullanılabilir, potansiyeli en yüksek biyomarkerlerden biri olduğunu göstermektedir. DNA hipermetilasyonu, mikrosatellit ve mutasyon analizini sensitivite açısından karşılaştıran bir çalışma, DNA metilasyonunun normal DNA içerisinde 1:1000 oranında bulunan tümör DNA'sını belirleyebilecek şekilde en yüksek duyarlılığı gösterdiğini bildirmektedir.³³ Farklı metilasyon markerları kullanılarak farklı tip kanser hastalarının hemen hepsinde dolaşımda bulunan tümör DNA'sının belirlenmesi mümkün olabilecektir. Ayrıca, kusurlu DNA metilasyonunun prognostik değeri ve metillenmiş genlerden metilasyon uzaklaştırılmasını hedef alan terapötik gelişmeler kanser hastalarının tanı ve takibinde yararlı olacaktır.

Yukarıda örneklerle verilen farklı tip moleküler genetik değişiklikler, kanserin erken ve non-invasiv taranmasında, risk belirlenmesinde kullanılabilir spesifik ve sensitif potansiyel biyomarkerler olarak görülmektedir.^{34,35} Bu tür moleküler değişikliklerin serum/plazmada incelenmesinin, tümörde bulunan moleküler lezyonlar konusunda daha belirgin bir tablo ortaya çıkarabileceğine inanılmaktadır. Ayrıca, serbest DNA'nın metastaz sürecinde rol alabileceği söylenmiş ve "genometastasis" hipotezi ortaya atılmıştır.³⁶ Hipotez, uzak organ metastazlarının, plazmada dolaşan tümör kaynaklı onkogenlerin bu organlardaki duyarlı hücrelere girerek bunları transforme etmesiyle oluşabileceğini ileri sürmektedir.

Serum veya plazmada belirlenen tümör-spesifik DNA, sağlıklı kontrollerde çok az veya hiç bulunmadığından, DNA'yı temel alan tümör belirleme metodları %100'e yakın spesifite göstermektedirler. Bu sonuç, moleküler markerların serum tümör markerlarından daha duyarlı olduğu anlamına gelmektedir. Moleküler markerları bilinen serum tümör markerları ile karşılaştıran çalışmalar bu sonuçları doğrulamaktadır. Örneğin, K-ras mutasyonları ile tümör marker CA19-9 veya hepatosellüler karsinomda serum p16 metilasyonu ile AFP karşılaştırılmış ve moleküler markerlar daha duyarlı bulunmuştur.³⁴ Ancak, test kriterleri, sensitivite ve spesifite, serum tümör markerları ile karşılaştırılmış olmasına karşın, şimdiye kadar plazma/serumda dolaşan serbest nükleik asitler klinik rutin kullanıma henüz girmemiştir. Ancak otomasyonun gelişmesiyle, önümüzdeki yıllarda tümör-spesifik nükleik asitlerin kanser hastalarının tanı ve takibinde kullanılmaya başlaması beklenmektedir.³⁷ Klinik düzeyde moleküler tümör markerların sensitivite ve spesifitesinin nasıl belirleneceği konusunda bazı zorluklar vardır. Farklı grup araştırmacıların plazma/serum için farklı nükleik asit izolasyon protokollerini kullanması, seriler arasında karşılaştırmayı zorlaştırmaktadır. Değişik protokollerin performansını karşılaştıran az sayıda çalışma mevcuttur. Bu nedenle, gelecekte plazma/serum DNA'sının yaygın kullanımı için, nükleik asit eldesinin otomatik hale getirilmesi gerekmektedir. Bu problemlerin çözülmesi farklı merkezlerde elde edilen sonuçların karşılaştırılmasına olanak sağlayacaktır.

Sonuç olarak, serum/plazmada saptanabilen tümör-spesifik moleküler değişiklikler, kanserin erken ve güvenli-

lir tanısında, ve böylece erken müdahale ve korunma stratejileri geliştirme ve risk altında bulunanların belirlenmesinde, ayrıca prognoz tahmininde ve tümör yükünü (ve bu nedenle terapinin etkinliğini) belirleme konularında değerlendirilmesi gereken potansiyel bir öneme sahiptir.³⁸

KAYNAKLAR

1. Patel A, Groopman JD, Umar A. DNA methylation as a cancer-specific biomarker: from molecules to populations. *Ann N Y Acad Sci* 2003;983:286-297.
2. ASCO Expert Panel. Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: report of the American Society of Clinical Oncology Expert Panel. *J Clin Oncol* 1996;4:2843-2877.
3. ASCO Expert Panel. 1997 update recommendations of the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1998;16:793-795.
4. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977;37:646-650.
5. Sozzi G, Conte D, Mariani L, et al. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res* 2001;61:4675-8.
6. Fournie GJ, Courtin JP, Laval F, et al. Plasma DNA as a marker of cancerous cell death. Investigations in patients suffering from lung cancer and in nude mice bearing human tumours. *Cancer Lett* 1995;9:221-227.
7. Maebo A. Plasma DNA level as a tumor marker in primary lung cancer. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 1990;28:1085-91.
8. Sorenson GD. Detection of mutated KRAS2 sequences as tumor markers in plasma/serum of patients with gastrointestinal cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:2129-2137.
9. Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, et al. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta* 2001;313:139-142.
10. Anker P. Quantitative aspects of plasma/serum DNA in cancer patients. *Ann N Y Acad Sci* 2000;906:5-7.
11. Stroun M, Anker P, Maurice P, et al. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 1989;46:318-322.
12. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, et al. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994;3:67-71.
13. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, et al. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 1994;86:774-779.
14. Yamada T, Nakamori S, Ohzato H, et al. Detection of K-ras gene mutations in plasma DNA of patients with pancreatic adenocarcinoma: correlation with clinicopathological features. *Clin Cancer Res* 1998;4:1527-1532.
15. Shaw JA, Smith BM, Walsb T, et al. Microsatellite alterations in plasma DNA of primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000;6:1119-1124.
16. Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, et al. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res* 1999;59:67-70.
17. An Q, Liu Y, Gao Y, et al. Detection of p16 hypermethylation in circulating plasma DNA of non-small cell lung cancer patients. *Cancer Lett* 2002;188:109-114.
18. Frickhofen N, Muller E, Sandherr M, et al. Rearranged Ig heavy chain DNA is detectable in cell-free blood samples of patients with B-cell neoplasia. *Blood* 1997;90:4953-4960.
19. Sorenson GD. A review of studies on the detection of mutated KRAS2 sequences as tumor markers in plasma/serum of patients with gastrointestinal cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2000;906:13-16.
20. Minamoto T, Yamashita N, Ochiai A, et al. Mutant K-ras in apparently normal mucosa of colorectal cancer patients. Its potential as a biomarker of colorectal tumorigenesis. *Cancer* 1995;75:1520-1526.
21. Mulcahy HE, Lyautey J, Lederrey C, et al. A prospective study of K-ras mutations in the plasma of pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res* 1998;4:271-275.
22. Nawroz H, Koch W, Anker P, et al. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nat Med* 1996;2:1035-1037.
23. Taback B, Giuliano AE, Hansen NM, et al. Microsatellite alterations detected in the serum of early stage breast cancer patients. *Ann N Y Acad Sci* 2001;945:22-30.
24. Chen XQ, Stroun M, Magnenat JL, et al. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat Med* 1996;2:1033-1035.
25. Lo YM. Quantitative analysis of Epstein-Barr virus DNA in plasma and serum: applications to tumor detection and monitoring. *Ann N Y Acad Sci* 2001;945:68-72.
26. Mutirangura A, Pornthanasakem W, Theamboonlers A, et al. Epstein-Barr viral DNA in serum of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 1998;4:665-669.
27. Capone RB, Pai SI, Koch WM, et al. Detection and quantitation of human papillomavirus (HPV) DNA in the sera of patients with HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000;6:4171-4175.
28. Wong IH, Lo YM. New markers for cancer detection. *Curr Oncol Rep* 2002;4:471-477.
29. Herman JG, Merlo A, Mao LI, et al. Inactivation of the CDKN2/p16 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 1995;55:4525-4530.
30. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, et al. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001;61:3225-3229.
31. Jabr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: Quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001;61:1659-1665.
32. Deligezer U, Yaman F, Erten N, Dalay N. Frequent copresence of methylated DNA and fragmented nucleosomal DNA in plasma of lymphoma patients. *Clin Chim Acta* 2003;335:89-94.
33. Goessl C, Muller M, Straub B, et al. DNA alterations in body fluids as molecular tumor markers for urological malignancies. *Eur Urol* 2002;41:668-76.
34. Wong IH, Johnson PJ, Lai PB, et al. Tumor-derived epigenetic changes in the plasma and serum of liver cancer patients. Implications for cancer detection and monitoring. *Ann N Y Acad Sci* 2000;906:102-105.
35. Wong IH, Lo YM, Johnson PJ. Epigenetic tumor markers in plasma and serum: biology and applications to molecular diagnosis and diseases monitoring. *Ann N Y Acad Sci* 2001;945:36-50.
36. Garcia-Olmo D, Garcia-Olmo DC. Functionality of circulating DNA: the hypothesis of genomestasis. *Ann N Y Acad Sci* 2001;945:265-275.
37. Goessl C. Diagnostic potential of circulating nucleic acids for oncology. *Expert Rev Mol Diagn* 2003;3:431-442.
38. Johnson PJ, Lo YM. Plasma nucleic acids in the diagnosis and management of malignant disease. *Clin Chem* 2002;48:1186-1193.