

# Kanda Dolaşan Nükleik Asitten Kanser Tanısı

## Cancer Diagnosis from Circulating Nucleic Acids: Review

Dr. Şefik GÜRAN,<sup>a</sup>  
Dr. Hüseyin YURDAKUL<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Tıbbi Biyoloji AD, <sup>b</sup>Tıbbi Genetik BD,  
GATA, Ankara

Geliş Tarihi/Received: 31.12.2007  
Kabul Tarihi/Accepted: 26.02.2008

Yazışma Adresi/Correspondence:  
Dr. Şefik GÜRAN  
GATA, Tıbbi Biyoloji AD, Ankara,  
TÜRKİYE/TURKEY  
sefguran@yahoo.com

**ÖZET** Plazma ve serumda nükleik asitlerin varlığı 50 yıldır bilinen bir gerçektir. Günümüzde kan dolaşımında yer alan bu tür nükleik asitlerin özellikle kanser tanısında ve prenatal tanıya yaygın bir kullanımı bulunmaktadır. Bu yazıda, dolaşımında hücre dışında yer alan nükleik asitlerin kanser tanısında kullanılması ile ilgili farklı uygulamalar ve teknik ayrıntılar tartışılmaktadır. Geliştirilen en son moleküler tekniklerin kullanılması ile özgün tümör mutasyonları, mikrosatelit değişiklikleri, tümör etiyojisinde yer alan viral nükleik asitlerin bulunması veya tümör baskılayıcı genlere ait metilasyon farklılıkları analiz edilebilmektedir. Tümör kaynaklı nükleik asitlerin analiz edilmesi kanserin ortaya konması kadar prognoz saptanmasında da önemlidir. Her geçen gün daha hassas hale gelen bu testler kanser olgularının saptanması, prognozlarının tayini ve geniş kitlelerin risk yönünden taranabilmesi için imkân sağlamaktadırlar. Bir çalışmada, tümör oluşumuna bağlı p16 genindeki metilasyon değişikliklerinin, karaciğer kanserli olgularda dolaşımdaki serbest tümör DNA'larında saptanması, bu bulgunun kanser tanısında kullanılabileceğini ortaya koymaktadır. Kanda dolaşan Epstein-Barr virüsü (EBV) DNA'sının aranması ile EBV enfeksiyonuna bağlı olarak ortaya çıkan nazofarenks kanserli olgularda kandan tanı konulabilmektedir. Yeni moleküler tekniklerin dolaşımdaki nükleik asitlere uygulanması kanser olgularının klinik takiplerinde hızla kullanılmaya başlanacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Nükleik asit; kan; mutasyon; kanser

**ABSTRACT** The existence of extracellular nucleic acids in the circulation (in plasma and serum) has been known for 50 years. Today, circulating cell-free nucleic acid analysis has been studied in many clinical scenarios, such as cancer detection and prenatal diagnosis. Here, the different approaches and the technical challenges of using cell-free nucleic acids for the detection and monitoring of cancers were discussed. Finding special tumor-associated mutations, microsatellite alterations, virus associated nucleic acids or aberrant methylation of tumor suppressor genes can be diagnostic criteria in cancer patients by using recent molecular techniques. Analysis of tumour-derived nucleic acids were shown to be useful for the detection and monitoring of cancers as well as for prognosis. Many such tests were shown to be robust enough for clinical utilization. In one study, the detection of tumor-associated aberrant p16 methylation in the circulation of patients with hepatocellular carcinoma represented the usefulness of circulating liver tumor DNA in the detection of cancer diagnosis. Epstein-Barr virus (EBV) DNA was also detectable in the serum of some patients with EBV related nasopharyngeal carcinoma, represented tumor DNA, and might have clinical implications in the clinical diagnosis. New molecular techniques will be used increasingly in circulating nucleic acid analysis for the clinical management of cancers in the future.

**Key Words:** Nucleic acid; blood; mutation; neoplasms

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2009;29(2):488-91

Günümüzde kandan prenatal tanı yapılması, kanser tanısının konması, kanserli bir olguda prognoz tayini ve tedavi takibi olasıdır. Serum ve plazmada serbest bulunan DNA'ların varlığı yıllardır bilinmek-

tedir. İlk kez 1997 yılında Leon ve ark. iyi huylu tümörlere sahip bireylerde serum DNA miktarı ile kanserli olgulardaki serum DNA miktarının farklı olduğunu ve bunun tedavi protokolleri yönünden önemli olabileceğini belirtmişlerdir.<sup>1</sup> Çalışmalar, kanser hastalarının serum ve plazmasından izole edilen DNA'ların aynı kişilerin tümör hücrelerinden elde edilen DNA'lar ile benzer mutasyonları taşıdığını ortaya koymaktadır. Bu bulgu bize bireyin kan plazması ve serumundan kanser tanısı yapılabileceğini düşündürmektedir.<sup>2</sup>

## SERBEST DOLAŞAN DNA UYGULAMALARI

En yaygın uygulama tümöre bağlı DNA değişikliklerinin (mutasyonların) saptanması yönündeki uygulamalardır. Günümüzde kansere özgün birçok mutasyonlar tanımlanmış ve saptanan mutasyonların tanı, tedavi takibi ve prognoz üzerindeki etkileri ortaya konmuştur. İlk çalışmada pankreas kanserli üç olgu çalışılmış, olgularda kanda dolaşan DNA'da hastalığa özgü K-ras gen mutasyonları gösterilmiştir.<sup>3</sup> Benzer bir çalışmada miyelodisplastik sendrom ve akut miyelositer lösemi olgularının plazmalarından izole edilen DNA örneklerinde N-ras genindeki nokta mutasyonu gösterilmiştir. Çalışmaya kemik iliği hücrelerinde N-ras mutasyonu gözlenen miyelodisplastik sendrom ve miyelositer lösemi olguları alınmıştır ve kemik iliği hücrelerinde saptanan tüm mutasyon tipleri plazmadan elde edilen DNA örneklerinde de gösterilmiştir.<sup>4</sup> Küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde epidermal büyüme faktör reseptör (EGFR)'lerinin somatik mutasyonları EGFR inhibitörü olarak kullanılan "gefitinib" tedavisinin biyoyararlanımını arttıran bir faktör olarak bilinmektedir. Kimura ve ark. bu mutasyonu hasta bireylerin serumlarından tedavi öncesi dönemde çalışarak ilaç biyoyararlanımını saptamışlardır.<sup>5</sup>

Kanda dolaşan nükleik asitlerden kanserli olgularda mikrosatellit değişiklikler de gösterilmektedir. Genomda kısa tekrarlayan diziler olan mikrosatellitler değişen tekrar sayılarına bağlı olarak adli uygulamalarda kimlik tayininde ve genetik analizlerde polimorfik "marker" (belirteç) olarak kullanılmaktadır. Mikrosatellit instabilitesi özellikle herediter non-polipozis kolon kanserleri (Lynch sendromu) ve

küçük hücreli akciğer kanserlerinin %50'sinde saptanan bir bulgudur. Tedavi sonrası dönemde mikrosatellit instabilite küçük hücreli akciğer kanserli olguların balgam DNA'larında araştırılmış, sonuçlar tümör DNA'ları ile karşılaştırılarak tedaviden yarar görüp görmediği ortaya konmuştur.<sup>6</sup>

Kanserlerde özellikle tümör baskılayıcı genlerde bir alelin kaybı [loss of heterozygosity (LOH)] sık gözlenen bir bulgudur. Bir alelin kayıp olup olmadığının polimorfik belirteç ile saptanması hem tümör tanısını hem de prognozu göstermesi açısından önemlidir. Bu alanda yapılan çalışmalar da kanserli olguların plazma ve serumunda LOH bakılmasının önemini ortaya koymaktadır.<sup>7</sup> Kullanılan yöntem ile primer tümörler bulunabilmektedir. Erken evrelerde dahi tümör DNA'larının dolaşımında olduğunun gösterilmesi tedavi yaklaşımları açısından da ilgi çekicidir. Ancak bazı yazarlar plazmadaki mikrosatellit değişikliklerinin erken evrede değil, metastaz riski bulunan ileri evre olgularda gözlendiğini ileri sürmektedirler.<sup>8</sup>

Bastian ve ark.nın yaptıkları çalışmada, radikal prostatektomi yapılacak hastaların preoperatif dönemde serumda serbest dolaşan DNA konsantrasyonları saptanmış, operasyon sonrası nüks görülen hastalar ve ölçülen DNA konsantrasyonları arasındaki anlamlı ilişki gösterilmiştir. Bu çalışma serumda serbest dolaşan DNA miktarının preoperatif dönemde ölçülmesi ile bu moleküllerin radikal prostatektomi planlanan hastalarda kullanışlı bir prognostik biyobelirteç olabileceğini düşündürmüştür.<sup>9</sup>

Hasta plazma ve serum örneklerinde, kanser etiolojisinde rol alan virüslere bağlı nükleik asitler de yer alabilir. Belli tümör tipleri ile kanserler arasındaki ilgi bilinmektedir. Buna örnek olarak insan papilloma virüs ile serviks kanseri, EBV ile Burkitt lenfoma arasındaki ilişki verilebilir. Buna benzer bir ilişki özellikle Güney-Doğu Asya ülkelerinde nazofarenks kanserleri ile EBV arasında kurulmaktadır. Bu olgularda kanda dolaşan viral nükleik asitlerin gösterilmesi hastalığın tanısında önemlidir.<sup>10</sup> 1998 yılında Mutirangura ve ark. nazofarenks kanserli hastaların serumlarında polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile Epstein-Barr viral DNA varlığını göstermişlerdir.<sup>11</sup> Ardından 1999 yılı

ında Lo ve ark. “real time PCR” ile nazofarenks kanserli olguların %96’sında kanda dolaşan EBV’ye ait viral nükleik asitleri göstermişler ve ardışık ölçümlerde bu nükleik asitlerin miktar tayinlerini yapmışlardır.<sup>12</sup> Çalışmalarda nükleik asit miktarı ile hastalığın evresi arasında doğru orantı saptanmış, elde edilen bulgunun tedavi sonrası prognozu gösteren önemli bir parametre olarak kullanılabilceği ortaya konmuştur.<sup>13</sup> Tedavi öncesi EBV DNA düzeyi güçlü bir tanı kriteri olarak karşımıza çıkmaktadır. Tedavi sonrasında kanda viral DNA’ların kaybolması tedavi sonrası remisyon takibinde önemlidir.<sup>14</sup> Radyoterapiden 6-8 hafta sonra hasta kanında EBV DNA konsantrasyonunun saptanması prognoz açısından önemlidir.<sup>15</sup>

Tümör baskılayıcı genlerin farklı metilasyon parametreleri kansere özgü bir bulgudur ve bu bulgu kanda dolaşan tümör kaynaklı DNA’larda tespit edilebilir. Tümör baskılayıcı genlere ait artmış metilasyon (hipermetilasyon) farklı tümör tiplerinde önemlidir. Bu grup içinde p15, p16, APC, E-caderin, h MLH1, 06-Methylguanine DNA Methyl Transferase (MGMT), ve caderin genleri sayılabilir. MGMT hücrede DNA hasarlarının tamirinde önemli rolü olan bir genidir. Bu genin promotöründe hipermetilasyon saptanmasının özefagus adenokanserleri için önemli olduğu bilinmektedir. Bu bulgu olguların serum DNA’larında rahatlıkla ortaya konabilmektedir.<sup>16</sup> Meme kanserinde metilasyon paterni etkilendiği bilinen APC, GSTP1, Rassf 1A ve RAR beta 2 genlerine ait metilasyon değişiklikleri meme kanserli olgularda incelenmiş, bu yolla erken evredeki olguların üçte birinde tanıyı destekler bulgular saptanmıştır.<sup>17</sup> Wong ve ark. hepatoselüler karsinomali olguların kanser dokusunda ve kanda p16 gen bölgesinin metilasyon paternini araştırmış, 22 hepatoselüler kanser olgusunun 16’sında tümör dokusunda, 13’ünde serum ve plazma örneklerinde artmış metilasyon varlığını göstermiştir.<sup>18</sup>

### SERBEST DOLAŞAN RNA UYGULAMALARI

Tümörden kaynaklanan RNA’ların da benzer yöntemlerle tespiti önemli bir kriterdir. Normal dokunun ve tümör dokusunun gen ekspresyon profilleri birbirlerinden farklıdır. Bu bulgunun yanında tü-

mörlü olgularda serum RNaz’ları kanda artmış olarak bulunur. Kopreski ve ark.nın yaptıkları çalışmada sağlıklı kontrol ve malign melanoma olgularının serumlarında revers transkriptaz PCR (RT-PCR) tekniği ile tirozinaz mRNA düzeylerine bakılmıştır. Sağlıklı kontrollerde tirozinaz mRNA bulunmamış, 6 malign melanoma olgusunun 4’ünde pozitif olarak saptanmıştır.<sup>19</sup> Sonradan yapılan çalışmalarda meme kanseri, kolorektal kanser, foliküler lenfoma ve hepatoselüler karsinomalarda hastaların serum ve plazmalarında tümör ilişkili mRNA’ların varlığı gösterilmiştir.<sup>20</sup>

### İDRARDA SERBEST DOLAŞAN NÜKLEİK ASİTLERİN TAYİNİ

Bazı kanser tiplerinde serbest dolaşan DNA’ların serum ve plazmada tayini ile birlikte idrar örneklerinde de analizi mümkündür. Eisenberger ve ark. renal kanserlerde primer tümör mikrosatellit değişikliklerini serumda ve idrarda eş zamanlı olarak göstermişlerdir.<sup>21</sup> Utting ve ark. mesane kanserlerinde idrar, serum ve plazma örneklerinde mikrosatellit değişimleri saptayarak bu metodu kanser tanısında minimal invaziv bir yöntem olarak tanımlamışlardır.<sup>22</sup>

### YÖNTEMİN DEZAVANTAJLARI

Kanda dolaşan nükleik asitlerden kanser tanısı yöntemleri üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Yöntemlerin uygulanmasında ve tanı kriterlerinin belirlenmesinde bazı zorluklar mevcuttur: Plazmadaki nükleazlar sayesinde serbest dolaşan nükleik asitlerin hızlı bir yıkımı vardır. Ayrıca bu moleküllerin hepatik ve renal yolla atılmaları henüz detaylı bir şekilde incelenmemiştir. Ayrıca tümör ilişkili serbest nükleik asitlerin serumda saptanan toplam serbest nükleik asitlere oranı hastadan hastaya farklılıklar gösterebilmektedir. Kanda saptanan genetik değişikliğin bazen birkaç farklı kanser tipinde de gözlenmesi kanserin tipinin ortaya konmasında problemlere yol açtığı gibi primer odağın belirlenmesi konusunda da sıkıntı oluşturabilir.<sup>23</sup>

### SONUÇ

Serumda ve plazmada yapılan bu tetkikler kanser olgularında tanı, tedavinin yönlendirilmesi ve

hastalığın takibi açısından önemli avantajlar sağlamıştır. Ayrıca invaziv olmayan bu yöntemin geniş topluluklarda tarama testi olarak kullanıla-

bilirliği böylece kanser hastalıklarının erken tanısında önemli bir kriter olacağı değerlendirilmektedir.<sup>23-25</sup>

## KAYNAKLAR

- Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977;37(3):646-50.
- Jackson PE, Kuang SY, Wang JB, Strickland PT, Muñoz A, Kensler TW, et al. Prospective detection of codon 249 mutations in plasma of hepatocellular carcinoma patients. *Carcinogenesis* 2003;24(10):1657-63.
- Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994;3(1):67-71.
- Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. 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(4):774-9.
- Kimura H, Kasahara K, Kawaishi M, Kunitoh H, Tamura T, Holloway B, et al. Detection of epidermal growth factor receptor mutations in serum as a predictor of the response to gefitinib in patients with non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12(13):3915-21.
- Chen XQ, Stroun M, Magnenat JL, Nicod LP, Kurt AM, Lyautey J, et al. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat Med* 1996;2(9):1033-5.
- Wang Q, Larson PS, Schlechter BL, Zahid N, Finnemore E, de las Morenas A, et al. Loss of heterozygosity in serial plasma DNA samples during follow-up of women with breast cancer. *Int J Cancer* 2003;106(6):923-9.
- Wang YC, Hsu HS, Chen TP, Chen JT. Molecular diagnostic markers for lung cancer in sputum and plasma. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1075:179-84.
- Bastian PJ, Palapattu GS, Yegnasubramanian S, Lin X, Rogers CG, Mangold LA, et al. Prognostic value of preoperative serum cell-free circulating DNA in men with prostate cancer undergoing radical prostatectomy. *Clin Cancer Res* 2007;13(18 Pt 1):5361-7.
- Gallagher A, Armstrong AA, MacKenzie J, Shield L, Khan G, Lake A, et al. Detection of Epstein-Barr virus (EBV) genomes in the serum of patients with EBV-associated Hodgkin's disease. *Int J Cancer* 1999;84(4):442-8.
- Mutirangura A, Pornthanakasem W, Theamboonlers A, Sriuranpong V, Lertsanguansinchi P, Yenrudi S, et al. Epstein-Barr viral DNA in serum of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 1998;4(3):665-9.
- Lo YM, Chan LY, Lo KW, Leung SF, Zhang J, Chan AT, et al. Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 1999;59(6):1188-91.
- Lo YM, Chan AT, Chan LY, Leung SF, Lam CW, Huang DP, et al. Molecular prognostication of nasopharyngeal carcinoma by quantitative analysis of circulating Epstein-Barr virus DNA. *Cancer Res* 2000;60(24):6878-81.
- Lo YM, Chan LY, Chan AT, Leung SF, Lo KW, Zhang J, et al. Quantitative and temporal correlation between circulating cell-free Epstein-Barr virus DNA and tumor recurrence in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 1999;59(21):5452-5.
- Chan AT, Lo YM, Zee B, Chan LY, Ma BB, Leung SF, et al. Plasma Epstein-Barr virus DNA and residual disease after radiotherapy for undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2002;94(21):1614-9.
- Baumann S, Keller G, Pühringer F, Napieralski R, Feith M, Langer R, et al. The prognostic impact of O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT) promoter hypermethylation in esophageal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2006;119(2):264-8.
- Hoque MO, Feng Q, Toure P, Dem A, Critchlow CW, Hawes SE, et al. Detection of aberrant methylation of four genes in plasma DNA for the detection of breast cancer. *J Clin Oncol* 2006;24(26):4262-9.
- Wong IH, Lo YM, Zhang J, Liew CT, Ng MH, Wong N, et al. Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. *Cancer Res* 1999;59(1):71-3.
- Kopreski MS, Benko FA, Kwak LW, Gocke CD. Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 1999;5(8):1961-5.
- Tong YK, Lo YM. Diagnostic developments involving cell-free (circulating) nucleic acids. *Clin Chim Acta* 2006;363(1-2):187-96.
- Eisenberger CF, Schoenberg M, Enger C, Hortopan S, Shah S, Chow NH, et al. Diagnosis of renal cancer by molecular urinalysis. *J Natl Cancer Inst* 1999;91(23):2028-32.
- Utting M, Werner W, Dahse R, Schubert J, Junker K. Microsatellite analysis of free tumor DNA in urine, serum, and plasma of patients: a minimally invasive method for the detection of bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8(1):35-40.
- Gormally E, Caboux E, Vineis P, Hainaut P. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance. *Mutat Res* 2007;635(2-3):105-17.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996;6(10):986-94.
- Bièche I, Olivi M, Champème MH, Vidaud D, Lidereau R, Vidaud M. Novel approach to quantitative polymerase chain reaction using real-time detection: application to the detection of gene amplification in breast cancer. *Int J Cancer* 1998;78(5):661-6.