

Detectie van tumorspecifiek DNA in feces en bloed van patiënten met een colorectumcarcinoom

D.W. SWINKELS*

Inzicht in de moleculaire genetica van het colorectumcarcinoom is het laatste decennium spectaculair toegenomen. De veranderingen op DNA-niveau kunnen niet alleen in het colorectumcarcinoom zelf worden gedetecteerd maar ook in lichaamsvloeistoffen die met het carcinoom in contact staan zoals feces en bloed (1-3). In dit artikel worden de resultaten van ons onderzoek met betrekking tot de diagnostiek van het colorectumcarcinoom met behulp van DNA-onderzoek van feces en serum samengevat.

DNA-veranderingen bij het colorectumcarcinoom
Ongebreidelde celdeling (= kanker) ontstaat door veranderingen in proto-oncogenen en tumorsuppressoren waardoor een groeivoordeel ontstaat ten opzichte van normale cellen (4). Deze moleculair-genetische veranderingen worden doorgegeven aan volgende generaties cellen. Door cumulatie van moleculaire veranderingen ontstaan meer agressieve cel-populaties, leidend tot invasieve maligniteit en metastasering. Zo is er voor het colorectumcarcinoom een tumorprogressiemodel opgesteld, waarbij de stadia in de adenoom-carcinoom sequentie in grote lijnen achtereenvolgens worden gekenmerkt door deleties en mutaties in het APC-tumorsuppressor, K-ras-oncogen en p53-tumorsuppressoren, die respectievelijk vroeg, intermediair en laat in de carcinogenese plaatsvinden (5).

Detectie van gemuteerd DNA in feces en bloed

Feces

Nieuwe inzichten in de moleculaire oncogenese van het colorectumcarcinoom bieden aanknopingspunten voor mutatiedetectie in feces. Afgestoten cellen van het normaal delende colonepithel komen in het darmlumen terecht en vermengen zich met de feces.

Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium (CKCL), Academisch Ziekenhuis Nijmegen St. Radboud

*Namens de onderzoeksgroep "Moleculaire oncologie" bestaande uit: J.B. de Kok, R.W.H.M. Roelofs, W.W. van Solinge, J.L. Willems en D.W. Swinkels (allen CKCL), G.N.P. van Muijen (Pathologie) en T.J.M. Ruers (Chirurgie). Naar een voordracht van J.B. de Kok voor de werkgemeenschap Klinische Chemie, januari 1998.

Correspondentie: Mw. Dr. D.W. Swinkels, Academisch Ziekenhuis Nijmegen St. Radboud, Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium, Postbus 9101, 6500 HB, Nijmegen.

E-mail: D. Swinkels@CKCL.AZN.nl

Ingekomen: 04.05.98

Ook cellen afkomstig van colorectumcarcinomen zijn dus theoretisch in feces detecteerbaar. Nadat Sidransky et al. (6) voor het eerst K-ras-mutaties in feces konden aantonen werden deze bevindingen in kleine patiëntengroepen in een tiental publicaties bevestigd met een variatie aan DNA-isolatie- en PCR-technieken om gemuteerde K-ras-oncogenen aan te kunnen tonen (1).

Hoewel ook onze onderzoeksgroep in staat is met Mutant Allel Specifieke Amplificatie (MASA) (7) gemuteerd K-ras aan te tonen tegen een hoge achtergrond van normaal (wild-type) DNA, bleken de in de literatuur gerapporteerde resultaten met betrekking tot K-ras-mutatiedetectie in feces maar matig reproduceerbaar (8,9). Gezamenlijk onderzoek met de Dr. Daniel den Hoed kliniek (R. van Schaik en L. Dorsers) en het AZM (E. Teunissen) heeft ons geleerd dat de opbrengst van menselijk DNA uit feces individueel sterk kan variëren, en ook samenhangt met de opslag van feces (tijd en temperatuur) (9). Daarnaast wordt de detectie van gemuteerd humaan DNA in feces gecompliceerd door de aanwezigheid van bacterieel DNA, PCR-inhiberende factoren en de hoge achtergrond van normaal humaan DNA. Een theoretische oplossing zou een verrijking van het humane DNA uit feces, door selectieve hybridisatie van het K-ras-gen met een K-ras specifieke probe gebonden aan paramagnetische bolletjes, kunnen zijn. In onze handen is deze methode echter tot nu toe nog niet efficiënt genoeg gebleken.

Samenvattend geeft de detectie van veranderingen in oncogenen en tumorsuppressoren in feces in potentie een verbetering van ons instrumentarium voor de diagnostiek van colontumoren. De invloed van opslag, tijd en omstandigheden, moet echter beter in kaart gebracht worden. Er zal verder onderzoek moeten gebeuren aan verrijking van gen van interesse, zoals het K-ras-gen, en het aantal markers zal moeten worden uitgebreid. In de toekomst zullen eenvoudige isolatie- en mutatietechnieken geschikt voor automatisering moeten worden ontwikkeld. En uiteindelijk zullen de diagnostische karakteristieken (sensitiviteit, specificiteit en predictieve waarde) van deze testen in kaart moeten worden gebracht.

Serum

Recentelijk is bij patiënten met longtumoren en hoofd/hals tumoren DNA afkomstig van tumorcellen in vrije vorm in de circulatie aangetoond, hetgeen perspectief kan bieden voor de diagnostiek, prognostiek en follow-up van deze tumoren (10,11).

Onlangs onderzocht onze groep of vrij tumor-DNA in serum ook bij het colorectumcarcinoom kon worden gedetecteerd (12). Tumorweefsel van 14 patiënten met een gemetastaseerd colorectumcarcinoom werd onderzocht op K-ras-mutaties m.b.v. MASA met primers voor puntmutaties in codon 12 en 13 (7). Bij 50% (7/14) van deze patiënten kon een K-ras-mutatie in de tumor worden gedetecteerd, en bij 6 van deze 7 kon deze ook in serum worden teruggevonden. Bij de overige 7 patiënten zonder K-ras-mutatie in de tumor werd geen mutant-DNA in de circulatie aangetroffen. We concluderen dat in het serum van patiënten met gemetastaseerd colorectumcarcinoom tumor-DNA kan worden aangetoond. In hoeverre de methode in de toekomst bruikbaar is in diagnostiek, prognostiek en follow-up van deze patiënten wordt momenteel verder onderzocht.

Commentaar

Moleculair-genetisch onderzoek in feces en plasma bij patiënten met colorectumcarcinomen beperkt zich grotendeels tot de detectie van K-ras-mutaties. Doordat deze mutaties in slechts 2 DNA-codons van het K-ras-gen voorkomen, wordt detectie tegen een hoge achtergrond van niet-gemuteerd DNA mogelijk. Het feit dat maar 30-50% van de colorectumcarcinomen K-ras-mutaties bevatten beperkt de sensitiviteit van deze marker voor het opsporen en vervolgen van de tumor echter aanzienlijk. De sensitiviteit van de feces en plasma DNA-test zou beduidend kunnen toenemen door ook andere DNA-veranderingen mee te nemen. Met name detectie van mutaties in het APC-gen, die in de regel als eerste in de colorectale carcinogenese optreden (5) en in 60% van de niet-erfelijke tumoren voorkomen, zou van waarde kunnen zijn. Ook detectie van mutaties in het p53-gen (65% van tumoren) zou de sensitiviteit van de DNA-test verhogen (2-3,13). Dit blijkt echter praktisch niet haalbaar omdat de huidige (PCR-)technieken niet geschikt zijn om mutaties zoals die verspreid over het APC-gen en p53-gen voorkomen tegen een hoge achtergrond van niet-gemuteerd DNA te detecteren. Als moleculair-genetische tumormarker voor het colorectumcarcinoom is het gemuteerde K-ras-gen vooralsnog de enige mogelijkheid.

Literatuur

1. Water C van de, Swinkels DW, Sturk A. Vroegdiagnostiek van carcinomen met behulp van puntmutatiedetectie in excreten en secreten. *Ned Tijdschr Klin Chem* 1996; 21: 132-138.
2. Duffy MJ. Can molecular markers now be used for early diagnosis of malignancy. *Clin Chem* 1995; 41: 1410-1413.
3. Sidransky D. Nucleic acid-based methods for the detection of cancer. *Science* 1997; 278: 1054-1058.
4. Bootsma AH, Cornelisse CJ, Klein A de. Oncogenen, tumorsuppressiegenen en de medische genetica van kanker. *Ned Tijdschr Geneesk* 1992; 136: 1009-1013.
5. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319: 525-532.
6. Sidranski D, Tokino T, Hamilton SR, Kinzler KW, Levin B, Frost P, Vogelstein B. Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science* 1992; 256: 102-105.
7. Hasegawa Y, Takeda S, Ichii S, Koizumi K, Maruyama M, Fujii A, Ohta A, Nakajima T, Okuda M, Baba S, et al. Detection of k-ras mutations in DNA's isolated from feces of patients with colorectal tumors by mutant-allele-specific amplification (MASA). *Oncogene* 1995; 10: 1441-1445.
8. Swinkels DW. Een moleculaire test in feces voor de vroegdiagnostiek van colontumoren. *Ned Tijdschr Klin Chem* 1997; 22: 98 (abstract).
9. Schaik RHN van, Smid M, Swinkels D, Lindemans J, Oosterhuis JW, Dorssers LCJ. Ontwikkeling van moleculaire diagnostiek op feces voor vroegdetectie van colonkanker. *Ned Tijdschr Klin Chem* 1998; 23: 79 (abstract).
10. Chen XQ, Stroun M, Magnenat JL, Nicod LP, Kurt AM, Lyautey J, Lederrey C, Anker P. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nature Med* 1996; 2(9): 1033-1034.
11. Nawroz H, Koch W, Anker P, Stroun M, Sidransky D. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nature Med* 1996; 2: 1035-1037.
12. Kok JB de, Solinge WW van, Ruers TJM, Roelofs RWHM, Muijen GNP, Willems JL, Swinkels DW. Detection of tumour DNA in serum of colorectal cancer patients. *Scan J Clin Lab Invest* 1997; 57: 601-604.
13. Anonymus. Screening for colorectal cancer by stool DNA analysis. *Lancet* 1992; 339: 1141-1142.