

Hücre Dışı DNA ve Genometastaz

Cell Free DNA and Genometastasis

Cemal Çağıl Koçana* , Selin Fulya Toprak* , Büşra Yaşa , Hilal Hekimoğlu ,
Selçuk Sözer Tokdemir 

İstanbul Üniversitesi Aziz Sançar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Cite this article as: Koçana CÇ, Toprak SF, Yaşa B, Hekimoğlu H, Tokdemir SS. Cell Free DNA and Genometastasis. Experimed 2019; 9(2): 69-74.

ÖZ

1948 yılında, kan plazmasında Mandel ve Metais tarafından keşfedilen hücre dışı DNA'lar (hdDNA), tüm biyolojik sıvılar ve hücre kültür medyasında var olduğu bilinen kısa DNA parçalarıdır. Bu hdDNA'lar ağırlıklı olarak endojen kökenli olup lipid ve protein içeren komplekslerde veya membranlı partiküllerin içinde bulunabilirler. Sağlıklı bireylerde periferik dolaşımda, mono-nükleozomlar şeklinde az miktarda hdDNA bulunur. hdDNA, hücre yüzeylerindeki bağlayıcı proteinlere veya fosfolipitlere tutunabilir. Bu mekanizma hdDNA Emilimi veya salınımıyla ilişkilendirilebilir. Deoksiribonükleaz (DNaz) gibi enzimler aracılığıyla hücreye tutunmuş olan hdDNA'ların yüzeyden ayırıp sirkülasyona geri salınımı sağlanabilir.

Kanda serbest halde dolaşan hdDNA'nın keşfedilmesi ile farklı klinik alanlarda tanı amaçlı kullanımlarına ilişkin çalışmalar da başlamıştır. Özellikle prenatal tanı, anne dolaşımında bulunan fetüse ait hdDNA analizleri halihazırda uygulanmaktadır. Bunun yanında, kanser, organ nakli, otoimmün hastalıklar, travma, miyokardial infarktüs ve sepsis gibi diğer klinik alanlar için de kullanılabildiği bilinmektedir. hdDNA analizi, çeşitli patolojiler ve spesifik fizyolojik durumların araştırılması ve tanısında yararlı görülse de, fragman boyutları dahil olmak üzere, kökenleri ve doğası hakkında kesin bir bilgi yoktur.

Bu derlemede, muhtemel hdDNA orijini hakkında literatür bilgileri bir araya getirilerek bir sentez oluşturulmaya çalışılmış bunun yanında genomestastazdaki rolü de irdelenmiştir. Son yıllarda hızla artan tanı amaçlı kullanımına özellikle de prenatal tanıdaki avantajları ele alınmıştır.

Anahtar Kelimeler: Hücre dışı DNA, Genometastaz, Hücre dışı fetal DNA

GİRİŞ

1948 yılında, kan plazmasında Mandel ve Metais tarafından keşfedilen hücre dışı DNA'lar (hdDNA), tüm biyolojik sıvılarda ve hücre kültür medyasında var olduğu bilinen kısa DNA parçalarıdır (1). Bu hdDNA'lar ağırlıklı olarak endojen kökenli olup lipid ve protein içeren komplekslerde veya membranlı partiküllerin içinde bulunabilirler (2).

ABSTRACT

Cell free DNAs (cfDNA) are short DNA fragments which are present in all biological fluids and cell culture medium. They were first detected in blood plasma by Mandel and Metais in 1948. cfDNAs are mostly endogenous-derived fragments that are determined in lipid/protein rich complexes or particles with membranes. In healthy individuals, there are small amounts of mono-nucleosome forms of cfDNA in the peripheral circulation. cfDNA can bind to proteins and phospholipids on cell surfaces. This mechanism may related to absorbance and release of cfDNA. Different enzymes such as deoxyribonuclease (DNase) may facilitate the unbounding and recirculation of membrane bound cfDNAs.

The investigation of cfDNA that circulates freely in the blood initiated its application in clinical research including diagnosis. Especially, cfDNA in mother's blood, which originated in fetus, has been in widely used in prenatal diagnosis already. Moreover, cfDNA has been applied in much clinical research, including cancer, organ transplantation, auto-immune diseases, trauma, myocardial infarcts, and sepsis. Although it is extremely useful to analyze cfDNA for certain pathologies and physiological conditions, there is no definite information about their fragment dimensions, origins nor their character.

In this review, the possible origins of cfDNA are explored with an overview of the literature regarding cfDNA and also, its role in genometastasis has been investigated.

In addition, the rapidly increasing diagnostic use in recent years, especially its advantages in prenatal diagnosis are discussed.

Keywords: Cell free DNA, genometastasis, Cell free fetal DNA

Sağlıklı bireylerde periferik dolaşımda, mono-nükleozomlar şeklinde az miktarda hdDNA bulunur. hdDNA, hücre yüzeylerindeki bağlayıcı proteinlere veya fosfolipitlere tutunabilir. Bu mekanizma hdDNA Emilimi veya salınımıyla ilişkilendirilebilir. Deoksiribonükleaz (DNaz) gibi enzimler aracılığıyla hücreye tutunmuş olan hdDNA'ların yüzeyden ayırıp sirkülasyona geri salınımı sağlanabilir.

* Eşit oranda katkı sağlamışlardır.

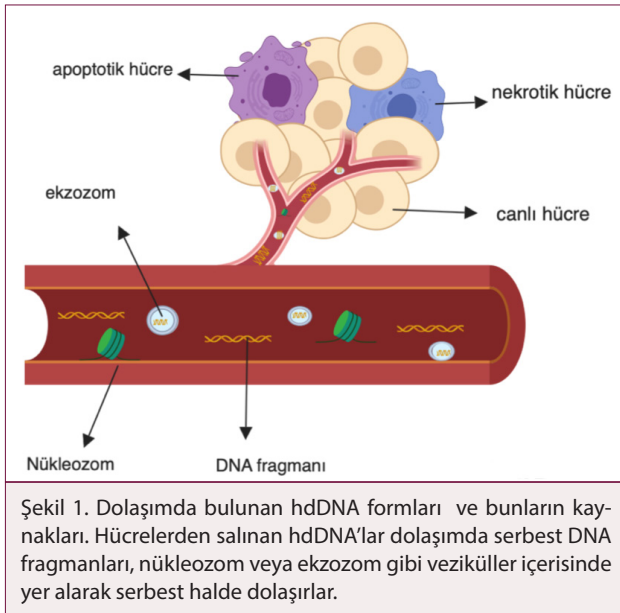
Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Selçuk Sözer Tokdemir **E-mail:** ssozer@istanbul.edu.tr

Geliş Tarihi/Received Date: 16.07.2019 **Revision Date/Revizyon Tarihi:** 08.08.2019 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 16.08.2019

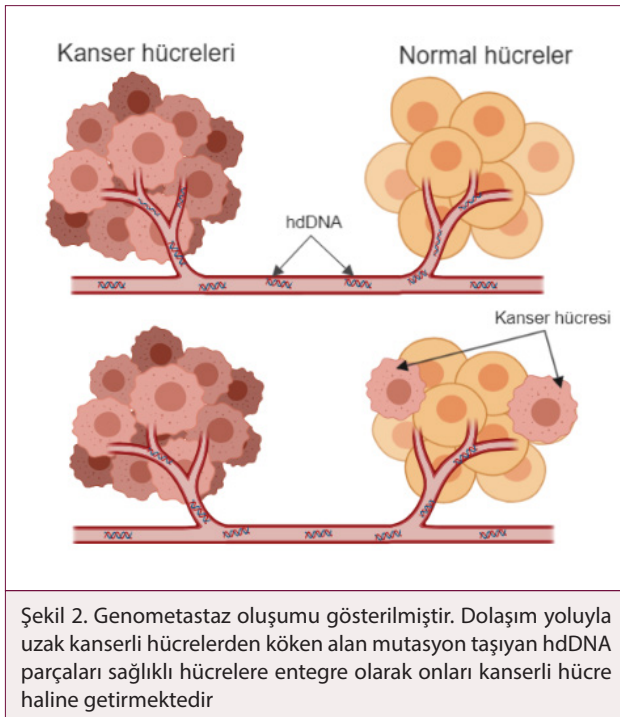


Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

Kanda serbest halde dolaşan hdDNA'nın keşfedilmesi ile birlikte farklı klinik alanlarda tanı amaçlı kullanılmak üzere çalışmalar da başlamıştır. Özellikle prenatal tanıda, anne dolaşımında bulunan fetüse ait hdDNA analizleri halihazırda uygulanmaktadır (3). Bunun yanında, kanser, organ nakli, otoimmün hastalıklar, travma, miyokardial infarktüs ve sepsis gibi diğer klinik alanlar için de kullanılabilirliği bilinmektedir (4). hdDNA analizi, çeşitli patolojiler ve spesifik fizyolojik durumların araştırılması ve tanısında yararlı görülse de, fragman boyutları dahil olmak üzere, kökenleri ve doğası hakkında kesin bir bilgi yoktur. Ancak, yapılan çalışmalarda histonlarla aralarında bir bağlantı olduğu gös-



Şekil 1. Dolaşımda bulunan hdDNA formları ve bunların kaynakları. Hücrelerden salınan hdDNA'lar dolaşımda serbest DNA fragmanları, nükleozom veya ekzozom gibi veziküller içerisinde yer alarak serbest halde dolaşırlar.



Şekil 2. Genometastaz oluşumu gösterilmiştir. Dolaşım yoluyla uzak kanserli hücrelerden köken alan mutasyon taşıyan hdDNA parçaları sağlıklı hücrelere entegre olarak onları kanserli hücre haline getirmektedir

terilmiştir (5). hdDNA yapısı ve büyüklüğü, hücrelerdeki hdDNA salınım mekanizmalarına bağlıdır. hdDNA fragmanları ~10 kb ile 150 kb arasında değişen uzunluklara sahip oldukları gözlemlenmiştir (6). 150 kb'ı ve katları olan fragmanlar, inter-nükleozomal parçalara ayrılan kromatin DNA'nın endojen bölünmesinden kaynaklanır (7). Oluşan bu fragmanların, apoptoz sonucu ortaya çıktıkları düşünülmektedir (8). Bunun yanı sıra, 10 kb'lık fragmanlardan daha büyük olan parçaların da nekrotik işlemlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

hdDNA Orijini

Biyolojik sınırlarda hdDNA belirgin bir şekilde bulunmasına rağmen nereden köken aldıkları hala tartışma konusudur. Dış kaynaklı DNA (örneğin, bakteriyel, viral ve parazitik) hariç, birkaç olası kaynak ve eş zamanlı mekanizma düşünülmüştür (9). İlk olarak, hdDNA'nın, tümör bölgesi ile dolaşım sınırında bulunan hücrelerin parçalanması sonucu kana karıştığı düşünülmüştür. Ancak, kanser hastasının dolaşımındaki hdDNA konsantrasyonunun, bu sınırdaki bulunan hücrelerden salınabilecek hdDNA miktarından daha fazla olduğu gösterildiği için bu fikirden vazgeçilmiştir (10). İkinci olarak, hdDNA'nın tümör mikrometastazı ve dolaşımdaki kanser hücre tahribatından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Ancak bu bilgilere dayanarak oluşturulan hipotezlerin hatalı olduğu da gösterilmiştir (11). Öyleyse, hdDNA oluşumunun apoptoz, nekroz ve aktif hücre salımlarından kaynaklandığı olasıdır (12).

DNA fragmanlarının boyutları önemli biyolojik bilgilere ulaşmayı sağlamaktadır. Bir hücre çekirdeğinde histonların çevresinin 146 kb'lık DNA ile sarılmasıyla nükleozomlar oluşur. Hücreler apoptoz veya nekroz geçirdiğinde, bu nükleozomlar kan dolaşımına salınır ve plazmada serbestçe dolaşır. Yapılan çalışmalarda, hdDNA'nın önemli bir kısmının ekzozomlar, apoptotik kabarcıklar, salınan veziküller, virtozomlar ve mikropartiküller gibi aktif hücre salımlarından elde edildiği gösterilmiştir (13).

Apoptoz sırasında DNA, ilk önce büyük parçalara (50-300 kb) ve daha sonra nükleozomal birimlerin katlarına (180-200 kb) parçalanır. Dolaşımdaki hdDNA büyüklüğünün sıklıkla düzgün biçimde kesilmiş fragmanlar olduğu ve bunların apoptotik veziküllerde de sıklıkla saptandığının gözlemlenmesi ile birlikte, hdDNA ana kaynağı olarak apoptoz gösterilebilir. Apoptoz sonucu oluşan hdDNA, jel görüntüsünde karakteristik merdiven (ladder) düzeni gösterir ve hdDNA'yı serbest bırakan aktif hücre salımları da benzer bir bantlama deseni gösterir (14). Diğer yandan, nekroz ise genomun daha rastgele bir şekilde bozunmasına neden olur ve önemli ölçüde daha büyük hdDNA fragmanlarının (~10 kb) oluşmasına yol açar (15). Kanserli hasta plazmasında gözlenen uzun hdDNA fragman varlığının başlangıçta nekroz, mitotik yıkım, otofaji veya mitokondriyal yıkım yoluyla malign hücrelerden kaynaklandığı düşünülmüştür (16).

In vivo çalışmaların çoğunda, hdDNA oluşumunun apoptoz veya nekroz ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda ise, hdDNA salınımının apoptoz, nekroz veya bir DNA replikasyonu sonucu değil esas olarak aktif salınım sonucu

olduğu gösterilmiştir (17). Literatür, aktif salınan hdDNA'nın bir çeşit hücreler arası haberci olarak hareket ettiğini belirtmektedir. hdDNA hedef hücelere girerek, konakçının genomuna entegre olarak veya geçici biyolojik bir etki ortaya çıkararak bu olayı gerçekleştirir. Şimdiye kadar tanımlanan en belirgin etkileri, farklı hücreler arasında hdDNA transferinin zararlı maddelere, immünomodülasyona ve metastaz gelişimine karşı toleransın indüklenmesini sağlamasıdır. Ek olarak, Bergsmedh ve ark. (18) hdDNA lateral transferinin sadece metastaza aracılık etmediğini, aynı zamanda malignite için gerekli olan genetik kararsızlığı da üretebileceğini öne sürmüştür.

Normalde homeostas içerisinde genom ve kromozomlar stabil yapılar değildir. Teknolojinin gelişmesiyle birlikte genomun ve kromozomların yeniden düzenlenebildiği bulunmuş ve bunların oluşum mekanizmaları ile ilgili yeni yaklaşımlar ortaya atılmıştır. Buradaki mekanizmalar *kromoanagenez* terimi altında üç farklı yaklaşımdan oluşmaktadır: kromotripsis, kromoanajenez ve kromopleksi (19).

Kromoanajenez, replikasyon çatalı durması ve kalıp değiştirme (FoStE) veya mikrohomoji aracılı kırık tetikli replikasyon (MMBIR) mekanizmalarını içeren replikasyon temelli karmaşık yeniden düzenlenme sürecidir (20). Endojen veya ekzojen ajanlar replikasyon stresi oluşturabilir. Bu durumda replikasyon çatalı durabilir ve replikasyon, alternatif DNA tamir mekanizmalarının devreye girmesine sebep olabilir. Bu mekanizmalar sonucu karmaşık yapısal değişiklikler ve kopya sayısında varyasyon oluşabilir. FoStE ve MMBIR modellerinde kolaylıkla kalıp zincir değişebilmektedir ve DNA başka bir aktif replikasyon çatalıyla kopyalanabilmektedir (21). Kromopleksi, çift zincir kırıkları (DSB) sonucu, çoklu kromozom içi ve kromozomlar arası translokasyonlar ve delesyonların birbirine bağımlı olarak gerçekleşmesiyle karakterize edilmiştir. Tek bir olay zinciri 7 kromozoma kadar etki gösterebilmektedir ve en az 3 olmak üzere 40'dan fazla değişimden oluşabilmektedir. Kromozomal düzenlenmeler, kopya sayısında artış oluşturmamaktadır veya çok az oluşturur (22). Kromoanajenez grubunda ilk olarak ortaya atılan yaklaşım olan kromotripsis, tek bir olay içinde gerçekleşen çoklu DSB sonucu oluşan DNA fragmanlarının rastgele düzende ve yönde tekrar birleşmesi şeklinde tanımlanmaktadır (23). Kümelenmiş kromozomal kırık noktalarının oluşumu, az miktarda DNA kopya sayısı değişimleri ve heterozigositenin yeniden düzenlenmiş bölgeler için korunması gibi kromotripsis için ortak olan farklı özellikler, kromotripsisin diğer kompleks kromozomal yeniden düzenlemelerden ayırt edilmesini sağlamaktadır (24-26).

Kanser durumunda ise yapılan çalışmalarda solid tümörlerin %70'inde, tüm kanserlerin ise %60-80'inde hücre bölünmesi sırasında meydana gelen hatalar sonucunda kromozom kararlılığının bozulduğu gösterilmiştir (27). Kromozomlarda meydana gelen kararsızlık genom bütünlüğünü negatif yönde etkileyerek agresif tümör oluşumunu desteklemektedir. Kromozom kararsızlığının kanser metastazı ile olan ilişkisi irdelendiğinde kanser hücrelerinden sitozole sızıntı yapan DNA'nın öncelikle mikro-çekirdek oluşturduğu, daha sonra bu yapıdan kurtula-

rak bağışıklık sistemi yolağı aracılığı ile uzak dokulara göç ettiği gösterilmiştir (28). Kronik sızıntı yapan DNA incelendiğinde çekirdekte bulunan genomik materyalin tamamının sitozolde bulunan DNA'da var olduğu tespit edilmiştir (28). Bu durum, kanserogenez sürecinde oluşan artmış hdDNA miktarını açıklamakta yardımcı olmaktadır. Ayrıca bu süreç, hdDNA kaynağını da açıklamaktadır.

Genomik kararsızlık ise, genomda yüksek mutasyon frekansı anlamına gelmektedir. Kanser hücreleri incelendiği zaman genetik mutasyonlar görülmektedir. Kanser oluşumu öncesinde küçük genetik mutasyonlar görülse de belli bir noktadan sonra bu hız artar. Oluşumda iki farklı mutasyon şekli vardır; bunlardan biri sürücü mutasyonlar olarak adlandırılır ve bu mutasyonlar kendi başlarına hücreye kanser özellikleri katabilir. Diğerleri ise yolcu mutasyonlardır; bu mutasyonlar hücreye kanser özelliklerini tek başlarına katamazlar ancak sürücü mutasyonlara eşlik ederek kanserin oluşumunu hızlandırır. Sürücü mutasyonlar iki tip genin mutasyonunu içerir: protoonkogenler ve tümör baskılayıcı genler. Protoonkogenler, hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında veya apoptozun baskılanmasında etkisi olan genlerdir. Mutasyonlar bu genlerin işlevlerinde artışa sebep olabilir ve böylece genler onkogenlere dönüşebilirler. Tümör baskılayıcı genler ise apoptozu indüklemeye ve hücre proliferasyonunu baskılamaya gibi olaylarda etkilidir. Mutasyonlar bu genleri susturabilir ve böylece kanser oluşumu başlayabilir. Genellikle, proto-onkogenler üzerinde monoallelik mutasyon yeteriyken tümör baskılayıcı genlerde iki allelin de mutasyonla işlevsiz hale gelmesi gerekir. Tümör baskılayıcı genlerdeki bu durum 1971 yılında Knudson tarafından ortaya atılan çift vuruş hipotezi (diğer adıyla Knudson hipotezi) ile açıklanmaktadır (29). Genetik mutasyonlar dışında translokasyonlar, insersiyonlar/delesyonlar ve amplifikasyonlar gibi kromozomal mutasyonlar da kanserde görülmektedir.

Genometastaz ve hdDNA

Yapılan çalışmalarda, metile olmayan hdDNA'nın 6 saatte ortadan kaybolduğu, metillenmiş hdDNA'nın 24 saatten daha uzun sürede bile tespit edilebildiği, tümörlü hayvanlarda ise hem metillenmiş hem de metillenmemiş hdDNA'nın 24 saatten daha uzun sürede tespit edilebildiği gösterilmiştir (30). Vücutta uzun süre kalabilen bu serbestçe dolaşan DNA parçalarının farklı hücreleri transfekte edip edemeyeceği ve metastazı kolaylaştırıp kolaylaştıramayacağı araştırılmaya başlanmıştır. 1999 yılında García-Olmo ve ark. (31) tarafından yayınlanan çalışma, kanser serbest dolaşan bir onkogenin uzak bir bölgedeki hücreyi transfekte ederek ona kanser özellikleri kazandıracağını öne sürdü ve buna genometastaz adı verildi. Literatürde farklı solid tümörler üzerine çalışmalar yapıldı (32-34). Bu çalışmalarda kanser hastalarından veya kanser modeli deney hayvanlarından serumlar alınarak *in vitro* ortamda onkogen taşımayan hücre hatlarına veya *in vivo* olarak kanser bulunmayan deney hayvanlarına uygulandı. Sonuç olarak serumlu ortamda inkübe edilen hücrelerde onkogen tespit edildi veya sağlıklı hayvanlarda tümör oluşumu gözlemlendi. Genometastaz çalışmalarından biri olarak Abdouh ve diğ. kanser hastalarının kanlarından serumlarını ve bu serumlardan eksozomları izole ettiler.

BRCA1 knock-out fibroblast hücrelerini elde edilen serum ve eksozomlarla *in vitro* ortamda muamele edip bu hücreleri NOD-SCID farelere enjekte ettiler. Sonuç olarak bu hücrelerin malign transformasyon geçirdiklerini ve farelerde tümör dokusu oluşturduğunu belirlediler (35).

Sonraki çalışmada Leon ve ark. (36) 1977 yılında, radyoimmünokimya kullanarak kanser hastalarının kanlarındaki hdDNA seviyesinin normal bireylerin kanlarındaki hdDNA seviyesinden daha yüksek olduğunu gösterdiler. Teknolojik sınırlamalar nedeniyle, ilk deneysel kanıtın bu durumu desteklemesi 12 yıl daha uzun sürdü. İnsan Genom Projesi'nin tamamlanmasıyla hdDNA'nın biyobelirteç olarak kullanımı gelişti ve kanser hastalarında tümör belirteçlerinin sorgulanmasına olanak sağladı. Ayrıca bazı kanser hastalarının hdDNA'larının tümörlerden kökenli oldukları gösterildi. 1994'te iki grup, hdDNA'nın tümöre özgü mutasyonları taşıdığını bildirdi. Her iki grup da, sırasıyla, pankreatik adenokarsinom ve akut miyeloid lösemi (AML) hastalarının plazma örneklerinde tümöre spesifik (N-RAS) mutasyonların tespiti için mutasyona özgü primerler kullandı (37, 38). hdDNA'da önceden bilinen belirli bir mutasyonun saptanmasına yönelik bu yaklaşım, tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir. Bu öncü çalışmalarda, dolaşımdaki tümör DNA (ctDNA)'sının saptanmasının "tanı, tedavi yanıtını belirleme ve prognozu öngörmek" gibi klinik uygulamalar için heyecan verici etkileri olduğu kabul edilmiştir (37). Bu erken gözlemler, ctDNA'yı tümör genomlarını analiz etmek için invazif olmayan bir yaklaşım olarak kullanmanın birçok olasılığını vurgularken, bu potansiyeli tam olarak kullanmak için yeterince hassas ve spesifik laboratuvar tekniklerinin henüz geliştirilmediği belirtilmiştir.

ctDNA analizi farklı örneklerden alınarak ve farklı yöntemler kullanılarak yapılabilmektedir. Çalışma sırasında öncelikle hangi örnek kullanılacağı belirlenmelidir. Bu örnek için uygun tüp ve koşullar belirlenmelidir. hdDNA izolasyonu için ise fenol kloroform, alkol presipitasyonu veya tuzla çöktürme metotları kullanılabilir ya da ticari olarak satılan hdDNA izolasyon kitleleri kullanılabilir (39). Geleneksel yöntemler daha fazla miktarda hdDNA izolasyonunu sağlayabilmekle birlikte kirlilik oranı daha yüksek olabilir ve uzun sürmektedir. Ticari kitleler daha hızlı ve daha saf izolasyon sağlamakla birlikte ücretlerinin yüksek olması dezavantajdır.

Kanser tedavisindeki en büyük problemlerden biri olan heterojenlik, hastadan alınan biyopsi örneğinde fark edilememekte ve bu durum hastalığın tekrarına veya tedavinin yanıtsız kalmasına sebep olabilmektedir (40-46). hdDNA analizi ile farklı alt gruplar yakalanabilmektedir ve bu da tedavi sürecinin daha verimli geçmesini sağlayabilmektedir (41, 42, 46).

Tanı Amaçlı hdDNA Kullanımı

Kanser hastalarında hdDNA artışı olduğunun gözlemlenmesinin dışında plazma genotiplenmesinin yapılabilir hale gelmesi onkoloji için büyük önem taşımaktadır. Sıvı biyopsi sayesinde hastalardan invazif yaklaşıma gerek kalmadan veya invazif biyopsi yapılamayacak hastalardan tümörle ilişkilendirilebilecek DNA dizileri analiz edilebilir hale gelmiştir. Buna en iyi örnek 2016 yılında FDA onay

alan Roche firmasının üretmiş olduğu "Cobas Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü Mutasyon Testi"dir (47). Bu, doku biyopsisi alınmayan akciğer kanseri hastaları için nasıl bir tedavi uygulanması gerektiği konusunda rehberlik yapacak bir testtir. Ayrıca hdDNA'nın erken teşhis amaçlı kullanılması araştırılmaktadır. Phallen ve ark. (48) tarafından yapılan çalışmada farklı evrelerdeki farklı kanserlerde evrenin ilerlemesiyle hdDNA artışı olduğu ve ilk evre hastalarda da hdDNA tespit edildiğini gösterdi.

Tüm bunlara ek olarak hücre dışı fetal DNA (hdfDNA)'nın tanıda kullanımı ise gün geçtikçe artmaktadır. hdfDNA, maternal dolaşımda serbest halde bulunan fetüs kaynaklı kısa DNA parçalarıdır. 1997 yılında Lo ve diğ. hdfDNA'yı keşfetmesiyle hdfDNA'ya dayanan girişimsel olmayan prenatal tanı için çeşitli metotlar geliştirilmiştir (49). İlk klinik uygulamalarda konjenital adrenal hiperplazi ve X'e bağlı hastalıklarda fetal cinsiyet belirlenmesinde ve yenidoğan hemolitik hastalığı için Rh(-) kadınlarda fetal Rh'in belirlenmesinde kullanıldı (50). Sonraki çalışmalarda NIPT (girişimsel olmayan prenatal test) olarak nitelendirilmiş ve tek gen hastalıklarının tanımlanması için de kullanılmaya başlanmıştır (3). Bunların dışında, Duchenne musküler distrofi ve hemofili için sonuçların kullanışlı olabileceği düşünülmektedir. Tek gen bozukluklarının tespit edilmesinde kullanılan fetal DNA'lar akondroplazi, hemoglobinopatiler, konjenital adrenal hiperplazi, kistik fibroz, Huntington hastalığı, miyotonik distrofi gibi giderek artan çeşitlilikte kalıtsal hastalıkların test edilmesinde kullanılmaktadır (51). Gebeliğin en erken 32. gününde görülmeye başlayan hdfDNA gebelik sırasında maternal plazmanın %3-6'sını oluşturduğu gösterilmiştir (51). Gebeliğin ilerlemesiyle birlikte hdfDNA miktarında %21 oranında bir artış gözlemlenmektedir (52). hdfDNA fragmanları genellikle 300 bp'den daha kısadır, sadece %20'inin 300 bp'den daha uzun olduğu saptanmıştır (53). hdfDNA'nın doğumdan 2 saat sonra, abortustan ise 24 saat sonra maternal dolaşımdan kaybolduğu gösterilmiştir. Bu durum prenatal tanı için önceki gebelikten oluşabilecek kontaminasyonları engellediği görülmüştür (54). Fetal cinsiyetin belirlenmesinde gebeliğin 7. haftasında %70,9. haftasından sonra ise %100 başarı sağlanmıştır. Hücre dışı fetal DNA, gebeliğin değişen şartlarından etkilenebileceği için preeklampsi ve anöploidi düşünülen durumlarda hdfDNA'nın miktarının artması bu durumların tespitinde kullanılmıştır (55). Embriyonik gelişim sırasında dokunun yapısal durumu ve şeklinin sağlanması için apoptoz ve nekroz olaylarının gerçekleşmesi sonucu oluşan hdfDNA'nın plasentadan geçerek maternal dolaşıma katılabileceği gösterilmiştir (56). Ayrıca, son zamanlardaki çalışmalarda hdfDNA'nın eksozomlar yoluyla da maternal sirkülasyona katılabileceği ortaya konulmuştur (57).

Öte yandan, hdDNA'nın tedavide kullanım alanları da yavaş yavaş belirlenmektedir. Garcia-olmo ve diğ. yakın zamanda bölünmemiş sağlıklı hücrelerden elde edilen hdDNA'nın tümör büyümesini durdurabileceğini göstermiştir (58). Bu bulgular, hdDNA'nın fonksiyonel çeşitliliğini daha iyi göstermektedir. İşin ille strese maruz bırakılmış hücrelerde oluşan apoptotik ölümünün, okside olmuş hdDNA'ların dolaşıma salınmasına neden olduğu bulunmuştur. Bu, stres durumunun tespitinde hdDNA'nın biyobelirteç olarak kullanılmasını sağlayabilir. Ek olarak, okside

olmuş hddDNA molekülünün radyasyon terapisine karşı direncini arttırarak diğer malign hücrelere hayatta kalma kabiliyeti sağlayabildiği gösterilmiştir (59).

Tüm bu çalışmalar yakın gelecekte günümüz tanı ve tedavi yaklaşımlarının temelden değişeceğini haber vermektedir.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - C.Ç.K, S.F.T.; Denetleme - S.S.T.; Gereçler - C.Ç.K, S.F.T., B.Y., H.H., S.S.T.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - C.Ç.K, S.F.T., B.Y., H.H., S.S.T.; Analiz ve/veya Yorum - S.S.T.; Literatür Taraması - C.Ç.K, S.F.T., B.Y., H.H.; Yazan - C.Ç.K, S.F.T., B.Y., H.H.; Eleştirel İnceleme - S.S.T.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TYL-2019-33725).

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - C.Ç.K, S.F.T.; Supervision - S.S.T.; Materials - C.Ç.K, S.F.T., B.Y., H.H., S.S.T.; Data Collection and/or Processing - C.Ç.K, S.F.T., B.Y., H.H., S.S.T.; Analysis and/or Interpretation- S.S.T.; Literature Search - C.Ç.K, S.F.T., B.Y., H.H.; Writing - C.Ç.K, S.F.T., B.Y., H.H.; Critical Reviews- S.S.T.

Conflict of Interest: The authors have no conflict of interest to declare.

Financial Disclosure: This work was supported by the Research Fund of the İstanbul University (Project number: TYL-2019-33725).

KAYNAKLAR

1. Volik S, Alcaide M, Morin RD, Collins C. Cell-free DNA (cfDNA): Clinical Significance and Utility in Cancer Shaped By Emerging Technologies. *Mol Cancer Res* 2016; 14: 898-908. [CrossRef]
2. Rykova EY, Morozkin ES, Ponomaryova AA, Loseva EM, Zaporozhchenko IA, Cherdyntseva NV, et al. Cell-free and cell-bound circulating nucleic acid complexes: mechanisms of generation, concentration and content. *Expert Opin Biol Ther* 2012; 12 Suppl 1: 141-53. [CrossRef]
3. Harraway J. Non-invasive prenatal testing. *Aust Fam Physician* 2017; 46: 735-9.
4. Duvvuri B, Lood C. Cell-Free DNA as a Biomarker in Autoimmune Rheumatic Diseases. *Front Immunol* 2019;10: 502. [CrossRef]
5. Sanchez C, Snyder MW, Tanos R, Shendure J, Thierry AR. New insights into structural features and optimal detection of circulating tumor DNA determined by single-strand DNA analysis. *NPJ Genom Med* 2018; 3: 31. [CrossRef]
6. Grunt M, Hillebrand T, Schwarzenbach H. Clinical relevance of size selection of circulating DNA. *Transl Cancer Res* 2018; 7(Suppl 2): 171-84. [CrossRef]
7. Heitzer E, Auer M, Hoffmann EM, Pichler M, Gasch C, Ulz P, et al. Establishment of tumor-specific copy number alterations from plasma DNA of patients with cancer. *Int J Cancer* 2013; 133: 346-56. [CrossRef]
8. Zhivotosky B, Orrenius S. Assessment of apoptosis and necrosis by DNA fragmentation and morphological criteria. *Curr Protoc Cell Biol* 2001; Chapter 18: Unit 18.3. [CrossRef]
9. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: Quantifications and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001; 61: 1659-65.
10. Bronkhorst AJ, Wentzel JF, Aucamp J, van Dyk E, du Plessis L, Pretorius PJ. Characterization of the cell-free DNA released by cultured cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1863: 157-65. [CrossRef]
11. Aucamp J, Bronkhorst AJ, Badenhorst CPS, Pretorius PJ. The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2018; 93: 1649-83. [CrossRef]
12. Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA: Apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta* 2001; 313: 139-42. [CrossRef]
13. Nagata S. DNA degradation in development and programmed cell death. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 853-75. [CrossRef]
14. Nagata S, Nagase H, Kawane K, Mukae N, Fukuyama H. Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ* 2003; 10: 108-16. [CrossRef]
15. Moulriere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, Del Rio M, Ychou M, Molina F, et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS One* 2011; 6: doi: 10.1371/journal.pone.0023418. [CrossRef]
16. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 426-37. [CrossRef]
17. Thakur BK, Zhang H, Becker A, Matei I, Huang Y, Costa-Silva B, et al. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res* 2014; 24: 766-9. [CrossRef]
18. Bergsmedh A, Szeles A, Henriksson M, Bratt A, Folkman MJ, Spetz AL, et al. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98: 6407-11. [CrossRef]
19. Holland AJ, Cleveland DW. Chromoanagenesis and cancer: Mechanisms and consequences of localized, complex chromosomal rearrangements. *Nat Med* 2012; 18: 1630-8. [CrossRef]
20. Gu W, Zhang F, Lupski JR. Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics* 2008; 1: 4. [CrossRef]
21. Zhang F, Khajavi M, Connolly AM, Towne CF, Batish SD, Lupski JR. The DNA replication FoStEs/MMBIR mechanism can generate genomic, genic and exonic complex rearrangements in humans. *Nat Genet* 2009; 41: 849-53. [CrossRef]
22. Baca SC, Prandi D, Lawrence MS, Mosquera JM, Romanel A, Drier Y, et al. Punctuated evolution of prostate cancer genomes. *Cell* 2013; 153: 666-77. [CrossRef]
23. Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ, et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* 2011; 144: 27-40. [CrossRef]
24. Maher CA, Wilson RK. Chromothripsis and human disease: Piecing together the shattering process *Cell* 2012; 148: 29-32. [CrossRef]
25. Korbel JO, Campbell PJ. Criteria for inference of chromothripsis in cancer genomes. *Cell* 2013; doi:10.1016/j.cell.2013.02.023 [CrossRef]
26. L'Abbate A, Tolomeo D, Cifola I, Severgnini M, Turchiano A, Augello B, et al. MYC-containing amplicons in acute myeloid leukemia: genomic structures, evolution, and transcriptional consequences. *Leukemia* 2018; 32: 2152-66. [CrossRef]
27. Duijff PHG, Schultz N, Benezra R. Cancer cells preferentially lose small chromosomes. *Int J Cancer* 2013; https://doi.org/10.1002/ijc.27924 [CrossRef]
28. Bakhomou SF, Ngo B, Laughney AM, Cavallo JA, Murphy CJ, Ly P, et al. Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response. *Nature* 2018; 553: 467-72. [CrossRef]

29. Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 1971; 68: 820-3. [\[CrossRef\]](#)
30. Barták BK, Nagy ZB, Spisák S, Tulassay Z, Dank M, Igaz P, et al. In vivo analysis of circulating cell-free DNA release and degradation. *Orv Hetil* 2018; 159: 223-33. [\[CrossRef\]](#)
31. García-Olmo D, García-Olmo DC, Ontañón J, Martínez E, Vallejo M. Tumor DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of the genometastasis. *Histol Histopathol* 1999; 14: 1159-64.
32. Abdouh M, Zhou S, Arena V, Arena M, Lazaris A, Onerheim R, et al. Transfer of malignant trait to immortalized human cells following exposure to human cancer serum. *J Exp Clin Cancer Res* 2014; 33: 1-12. [\[CrossRef\]](#)
33. Hamam D, Abdouh M, Gao ZH, Arena V, Arena M, Arena GO. Transfer of malignant trait to BRCA1 deficient human fibroblasts following exposure to serum of cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res* 2016; doi:10.1186/s13046-016-0360-9. [\[CrossRef\]](#)
34. Arena GO, Arena V, Arena M, Abdouh M. Transfer of malignant traits as opposed to migration of cells: A novel concept to explain metastatic disease. *Med Hypotheses* 2017; 100: 82-6. [\[CrossRef\]](#)
35. Abdouh M, Hamam D, Gao ZH, Arena V, Arena M, Arena GO. Exosomes isolated from cancer patients' sera transfer malignant traits and confer the same phenotype of primary tumors to oncosuppressor-mutated cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2017; 36: doi: 10.1186/s13046-017-0587-0. [\[CrossRef\]](#)
36. 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: 646-50.
37. 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: 67-71.
38. 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: 774-9. [\[CrossRef\]](#)
39. X, Teare MD, Holen I, Zhu YM, Woll PJ. Optimizing the yield and utility of circulating cell-free DNA from plasma and serum. *Clin Chim Acta* 2009; 404: 100-4. [\[CrossRef\]](#)
40. Diaz LA, Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 2012; 486: 537-540. [\[CrossRef\]](#)
41. Russo M, Siravegna G, Blaszkowsky LS, Corti G, Crisafulli G, Ahronian LG, et al. Tumor heterogeneity and Lesion-Specific response to targeted therapy in colorectal cancer. *Cancer Discov* 2016; doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-1283. [\[CrossRef\]](#)
42. Goyal L, Saha SK, Liu LY, Siravegna G, Leshchiner I, Ahronian LG, et al. Polyclonal secondary FGFR2 mutations drive acquired resistance to FGFR inhibition in patients with FGFR2 fusion-positive cholangiocarcinoma. *Cancer Discov* 2017; 7: 252-63. [\[CrossRef\]](#)
43. Hazar-Rethinam M, Kleyman M, Han GC, Liu D, Ahronian LG, Shahzade HA. Convergent therapeutic strategies to overcome the heterogeneity of acquired resistance in BRAFV600E colorectal cancer. *Cancer Discov* 2018; DOI: 10.1158/2159-8290.CD-17-1227. [\[CrossRef\]](#)
44. Bakhom SF, Cantley LC. The Multifaceted Role of Chromosomal Instability in Cancer and Its Microenvironment. *Cell* 2018; 174: 1347-60. [\[CrossRef\]](#)
45. Piotrowska, Z, Niederst MJ, Karlovich CA, Wakelee HA, Neal JW, Mino-Kenudson M, et al. Heterogeneity underlies the emergence of EGFR T790M wild-type clones following treatment of T790M-positive cancers with a third-generation EGFR inhibitor. *Cancer Discov* 2015; doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-0399. [\[CrossRef\]](#)
46. Blakely CM, Watkins TBK, Wu W, Gini B, Chabon JJ, McCoach CE, et al. Evolution and clinical impact of co-occurring genetic alterations in advanced-stage EGFR-mutant lung cancers. *Nat Genet* 2017; 49: 1963-704. [\[CrossRef\]](#)
47. Malapelle U, Sirera R, Jantus-Lewintre E, Reclusa P, Calabuig-Fariñas S, Blasco A, et al. Profile of the Roche cobas® EGFR mutation test v2 for non-small cell lung cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2017; 17: 209-15. [\[CrossRef\]](#)
48. Phallen J, Sausen M, Adleff V, Leal A, Hruban C, White J, et al. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Sci Transl Med* 2017; 16: 403. [\[CrossRef\]](#)
49. Ramezanzadeh M, Khosravi S, Salehi R. Cell-free Fetal Nucleic Acid Identifier Markers in Maternal Circulation. *Adv Biomed Res* 2017; 6: 89. [\[CrossRef\]](#)
50. Yau M, Khattab A, New MI. Prenatal Diagnosis of Congenital Adrenal Hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2016; 45: 267-81. [\[CrossRef\]](#)
51. Daley R, Hill M, Chitty LS. Non-invasive prenatal diagnosis: Progress and potential. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2014; 99: 426-30. [\[CrossRef\]](#)
52. Kenkhuis MJA, Bakker M, Bardi F, Fontanella F, Bakker MK, Fleurke-Rozema JH, et al. Effectiveness of 12-13-week scan for early diagnosis of fetal congenital anomalies in the cell-free DNA era. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2018; 51: 463-9. [\[CrossRef\]](#)
53. Yang Q, Du Z, Song Y, Gao S, Yu S, Zhu H, et al. Size-selective separation and overall-Amplification of cell-free fetal DNA fragments using PCR-based enrichment. *Sci Rep* 2017; doi:10.1038/srep40936. [\[CrossRef\]](#)
54. D'Aversa E, Breveglieri G, Pellegatti P, Guerra G, Gambari R, Borgatti M. Non-invasive fetal sex diagnosis in plasma of early weeks pregnant using droplet digital PCR. *Mol Med* 2018; doi:10.1186/s10020-018-0016-7 [\[CrossRef\]](#)
55. Contro E, Bernabini D, Farina A. Cell-Free Fetal DNA for the Prediction of Pre-Eclampsia at the First and Second Trimesters: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Mol Diagn Ther* 2017; 21: 125-35. [\[CrossRef\]](#)
56. Sherwood K, Weimer ET. Characteristics, properties, and potential applications of circulating cell-free dna in clinical diagnostics: a focus on transplantation. *J Immunol Methods* 2018; 463: 27-38. [\[CrossRef\]](#)
57. Fernando MR, Jiang C, Krzyzanowski GD, Ryan WL. New evidence that a large proportion of human blood plasma cell-free DNA is localized in exosomes. *PLoS One* 2017; doi:10.1371/journal.pone.0183915. [\[CrossRef\]](#)
58. Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomol Detect Quantif* 2019; doi:10.1016/j.bdq.2019.100087. [\[Cross-Ref\]](#)
59. Kostyuk SV, Ermakov AV, Alekseeva AY, Smirnova TD, Glebova KV, Efremova LV, et al. Role of extracellular DNA oxidative modification in radiation induced bystander effects in human endothelialocytes. *Mutat Res* 2012; 729: 52-60. [\[CrossRef\]](#)