Tepecik Eğit. ve Araşt. Hast. Dergisi 2019;29(1):11-20
doi:10.5222/terh.2019.90267

# Kolorektal Kanser ve Dolaşımdaki Tümör DNA'sı: Geleceğin Biyobelirteci

# *Colorectal Cancer and Circulating Tumor DNA: Future Biomarker*

Derleme
*Review*

**Berke Manoğlu, Zekiye Altun, Tuğba Yavuzşen, Safiye Aktaş**

**ÖZ**

*Kolorektal kanser dünyada en sık görülen üçüncü kanser türü olup, ölüm nedenleri arasında dördüncü sırada yer almaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda yaklaşık 150,000 yeni kolorektal kanser tanısı konulmakta ve yılda yaklaşık 50,000 kişi bu hastalık nedeniyle ölmektedir. Hastalara tanı konduğunda, %90'ı bölgesel tümörle, %10'u uzak organlara yayılmış olarak karşımıza çıkmakta ve bu da erken tanı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi gerektiğini göstermektedir. Kolorektal kanser hastalarının takibini önemli ölçüde iyileştirmek için tanı anında ve rekürensin erken belirlenmesi için prognozun kesinleştirilmesini olası kılan girişimsel olmayan araçlara gereksinim vardır. Kolorektal kanserlerin oluşumu ve gelişiminde birden çok genetik ve epigenetik değişiklikler etkilidir. Bu genetik değişikliklerin farklı vücut sıvılarındaki tümör DNA'sının ve DNA'daki moleküler değişiklikler yolu ile saptanması ile önemli moleküler biyobelirteçler ortaya konabilir. Dolaşımdaki tümör hücreleri veya plazma türevli dolaşımdaki tümör DNA'sı kullanılarak yapılan "sıvı biyopsi" analizi, doku biyopsilerine invaziv olmayan bir alternatif sunmakta ve geleceğin biyobelirteçleri olma yolunda önemli bir yere ulaşmaktadırlar.*

***Anahtar kelimeler:*** *Kolorektal kanser, biyobelirteç, dolaşımdaki tümör DNA' sı, sıvı biyopsi*

**ABSTRACT**

*Colorectal cancer is the third most common cancer in the world and ranks fourth among the causes of death. In the United States, approximately 150.000 new colorectal cancers are diagnosed annually and approximately 50.000 people die annually. At the time of diagnosis, 90% of them are seen with regional tumors and in 10% of them distant organ metastasis is seen. This shows that early diagnosis and treatment methods should be developed. In order to significantly improve the follow-up of colorectal cancer patients, there is a need for non-invasive tools that enable the prognosis to be confirmed at the time of diagnosis and for early detection of recurrence. Multiple genetic and epigenetic changes are effective in the emergence and development of colorectal cancer. Significant molecular biomarkers can be identified by detection of these genetic changes by tumor DNA in different body fluids and by molecular changes in DNA. "Liquid biopsy" analysis using circulating tumor cells or plasma-derived circulating tumor DNA provides a non-invasive alternative to tissue biopsies and reaches an important place among future biomarkers.*

***Keywords:*** *Colorectal cancer, biomarker, circulating tumor DNA, liquid biopsy*

**Alındığı tarih:** 15.10.2018
**Kabul tarihi:** 09.11.2018
**Online Yayın tarihi:** 26.03.2019

**Berke Manoğlu**
Denizli Devlet Hastanesi,
Genel Cerrahi Kliniği,
Denizli, Türkiye
berkemanoglu@hotmail.com
**ORCİD:** 0000-0003-4755-2200

**Z. Altun** 0000-0002-1558-4534
*Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye*

**T. Yavuzşen** 0000-0001-9375-8133
*Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı, İzmir, Türkiye*

**S. Aktaş** 0000-0002-7658-5565
*Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye*

**Cite as:** Manoğlu B, Altun Z, Yavuzşen T, Aktaş S. Kolorektal kanser ve dolaşımdaki tümör DNA'sı: Geleceğin biyobelirteci. Tepecik Eğit. ve Araşt. Hast. Dergisi. 2019;29(1):11-20

## GİRİŞ

Gastrointestinal sistemin en yaygın malignitesi olan kolon kanseri, kanserli hastalar arasında mortalite ve morbiditenin ana nedenlerinden biridir [(1)]. Dünyada kolorektal kanser, en sık görülen üçüncü kanser türü olup, ölüm nedenleri arasında üçüncü sırada yer almaktadır (2,3, Siegel RL. Cancer Statistics, 2018). Erkeklerde prostat ve akciğer kanserinden sonra üçüncü, kadınlarda ise meme ve akciğer kanserinden sonra üçüncü sıklıkta görülmektedir (4, Siegel RL. Cancer Statistics, 2018). Amerika Birleşik Devletleri'nde 2002 yılıyla 2011 arasında kolorektal kansere bağlı ölüm oranları karşılaştırıl-

© Telif hakkı T.C. Sağlık Bakanlığı İzmir Tepecik Eğit. ve Araşt. Hastanesi. Logos Tıp Yayıncılık tarafından yayınlanmaktadır. Bu dergide yayınlanan bütün makaleler Creative Commons Atıf-GayriTicari 4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.
© Copyright Association of Publication of the T.C. Ministry of Health İzmir Tepecik Education and Research Hospital. This journal published by Logos Medical Publishing.
Licenced by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)

dığında, yaklaşık 3 kat artış olduğu görülmektedir [5]. Kanserli hastaların klinik sonuçları esas olarak kanser hücrelerinin birincil bölgeden uzak organlara kan yoluyla yayılması ve bu hücrelerin büyük ölçüde bilinmeyen bir alt kümesinin yeni mikroçevresinde metastazlara doğru ortaya çıkmasıyla belirlenir [6]. Tümöre ve bireye özgü tedavi yöntemlerine rağmen tüm kanserler, tümör heterojenliği, klonal evrim ve seleksiyona bağlı olarak direnç kazanırlar [7]. Subklonlar, hastalık ilerlemesi sırasında da ortaya çıkabilir ve metastatik lezyonların tümör hücrelerinin yanı sıra primer tümör hücreleri arasında spesifik aberasyonları da değişikliklere yol açabilir [8,9]. Tümör dokusu biyopsi örneklemesi ve patolojik incelenmesi tanı için altın standart bir yaklaşım olmuştur. Tedavi ile ilişkili biyobelirteçler, tümör ilerlemesi boyunca değişebileceğinden, seri biyobelirteç incelemeleri, tedavi seçimi ve dolayısıyla kişiselleştirilmiş tedavi için önemli bilgiler sağlayabilir [10]. Hastalığın takibinde ve izlemde görüntüleme yöntemeleri ve bazı spesifik biyobelirteçler kullanılmaktadır. Bunlar karsinoembriyonik antijen (CEA), kanser antijen 19-9 (CA 19-9), mikrosatellit instabilite (MSİ), v-Ki-ras2 Kirsten rat sarkoma viral homolog onkogen (KRAS), dolaşan DNA ve RNA'da p53 proteini, dolaşan tümör hücreleridir (CTCs). Kolon kanseri tedavisinde kemoterapi ve metastatik hastalıkta hedefe yönelik tedavi ajanların kemoterapi ajanları ile kombinasyonu sistemik tedavilerdeki standart yaklaşımımızdır. Bu tedavi ajanlarının ilk sıra tedavilerinde seçimi ve daha sonraki basamaklardaki kullanımlarımda direnç mekanizmalarının bilinmesi önemlidir. Hedefe yönelik tedavilere direnç geliştirmede rol alan moleküler yolakların günümüzde bilinmesine rağmen, teknik olarak bu değişiklikleri belirlemek büyük zorluklar doğurmaktadır. Bunlar; analiz için yeterli tümör hücresi elde edilmesindeki zorluklar, yanıtı izlemek için invaziv seri örneklemesine duyulan gereksinim, intratümöral ve inter-tümöral heterojeniteye bağlı olarak seçim yanlılığı potansiyeli olarak sıralanabilir [11-13]. Bu tür zorluklar, daha etkili biyopsi yöntemlerine duyulan gereksinimi doğurmaktadır. Dolaşımdaki tümör hücreleri (CTC'ler) veya plazma türevli dolaşımdaki tümör DNA'sı (ctDNA) kullanılarak yapılan "sıvı biyopsi" analizi, doku biyopsilerine invaziv olmayan bir alternatif sunmaktadır. CTC'ler, 1869'da Thomas Ashworth tarafından tanımlanmıştır. CTC'ler kanda çok düşük miktarlarda bulunurlar ($1/10^6$-$10^7$ çekirdekli kan hücresi) [14]. Çalışmalarda, kolorektal kanserde (CRC) ctDNA kullanılarak sıvı biyopsinin potansiyel klinik uygulamalarına odaklanılmıştır. Son yıllarda önemli sağkalım kazanımlarına rağmen, CRC; gelişmiş ülkelerde gelişen metastazlarıyla, hastaların yarısından fazlasında ölümle sonuçlanan bir hastalıktır [15,16]. CRC, moleküler heterojenite ve ardışık genetik değişiklikler ile karakterize edilen bir genetik hastalık olarak düşünülebilir [16,17]. Kolorektal karsinogenezin daha iyi anlaşılmasının bir sonucu olarak, metastatik CRC'li (mCRC) hastalarda iyileştirilmiş sonuçlara sahip olan hedefli ajanlar geliştirilmiştir. Bunlar arasında tümör oluşumu için kritik olan iki ana yolu, yani epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) sinyal yolaklarını hedef alan monoklonal antikorlar (mAb'ler) yer alır. Bu mAb'ler, son çalışmalarda 30 aydan fazla olan genel sağkalımda önemli bir artışa yol açmıştır. Anti-EGFR ajanlarına karşı birincil ve kazanılmış direncin klinik sorununa güçlü bir vurgu, CRC'deki direnci tahmin etmek ve izlemek için sıvı biyopsisi potansiyeline olan ilgiyi artırmıştır [16]. Dolaşımdaki tümör hücrelerinin, tümör dinamiklerini gözlemleme potansiyelini ve metastazdan sorumlu hücrelerin özellikleri hakkında bilgi sağladığı kabul edilmektedir [18]. Ancak klinik uygulamada, CTC'lerin kullanımını destekleyen sınırlı veriler bulunmaktadır [16]. Yapılan metastatik kolorektal kanserli hastalardaki çalışmalarının analizlerinde, hastaların kan alınma zamanı ile tedaviler ve görüntüleme yöntemleri arasındaki uyumsuzluklar, ayrıca CTC'lerin referans değerleri, tanı metotları konusunda daha net standartlara gereksinim vardır. Bu koşullara rağmen, CTC'ler tedavi yanıtını göstermede önemli bir biyobelirteç olarak ileriki dönemlerde karşımıza gelecek bir yöntem olacağına yönelik kanıtları güçlüdür. Tümör biyopsisi şu anda tanı koymada ve tedavi direncinin gelişiminde rol alan hücre sinyal yollarının

belirlenmesinde altın standarttır. Bununla birlikte, invaziv olan ve aynı zamanda tümör içi, tümörler arası heterojenite nedeniyle seleksiyona yönelik potansiyele sahip olan, tedavi direncini izlemek için seri örnekleme gereksinimini içeren bu teknikle ilgili büyük zorluklar vardır. Bu zorluklar, tümör örneklerini elde etmek için daha etkili yöntemlere olan gereksinimi arttırmaktadır. Sıvı biyopsi, birincil tümör ve metastatik bölgelerden kanın içine dökülen genetik materyal veya tümör hücrelerinin değerlendirilmesini sağlar. Hastadaki tümör yükünün kapsamlı, gerçek zamanlı bir görüntüsünü sağlar. Sıvı biyopsi yöntemi kanser yönetiminde devrim yapma potansiyeline sahiptir. Kolorektal kanserde dolaşımdaki tümör DNA'sı kullanılarak sıvı biyopsinin potansiyel klinik uygulamalarına ilişkin yeni çalışmalar gözden geçirilmiştir. Bunlar; tarama, tanı, cerrahi sonrası minimal rezidüel hastalığın saptanması, rekürensin saptanması, prognoz, tedaviye yanıtın öngörülmesi, tümör yükünün veya yanıtının izlenmesi gibidir.

**Kandaki Tümör DNA' sı Kullanılarak Yapılan Sıvı Biyopsisi**

İnsan kanında dolaşımdaki hücresiz DNA'nın (cfDNA) varlığı ilk olarak 1948 yılında tanımlanmıştır ve o zamandan günümüze birçok tıbbi durumda halen daha ümit verici araştırma alanıdır [19]. 1977'de kanser hastalarının sağlıklı bireylerden daha yüksek plazma cfDNA seviyelerine sahip olduğu bulunmuştur [20]. Mevcut moleküler biyoloji teknikleri, kandaki DNA'yı belirlemeyi kolaylaştırması, büyük araştırmaların ve yeni klinik uygulamaların önünü açmıştır. Tümöre özgü değişiklikleri taşıyan cfDNA'nın fraksiyonu ctDNA olarak adlandırılır [21]. Tümör hücreleri ctDNA'yı apoptoz ve nekrozla, olasılıkla daha az ölçüde aktif salgılama ile kan dolaşımına bırakırlar [21,22]. Apoptotik tümör hücrelerinin, kanda ctDNA'nın en önemli kaynağı olduğu düşünülmektedir. Çünkü saptanabilir ctDNA'sı tipik olarak yüksek oranda parçalanmıştır (180-200 baz çifti arasında), bu da apoptotik DNA'nın göstergesidir [21,23-25]. Genetik dengesizliği olan multiklonal tümördeki tüm klonların DNA'yı dolaşımda bırakıp bırakmayacağı bilinmemektedir. Bazı klonlar diğerlerine göre daha proliferatif ve daha az apoptotik aktiviteye sahip olabilir. Gerçekten de, ctDNA kullanılarak saptanan genetik profil, olasılıkla yüksek apoptotik aktiviteye sahip klonları yansıtmaktadır. Bunun yanı sıra kanserli hastalarda saptanabilir ctDNA seviyeleri, her zaman dolaşımdaki tümör hücrelerini (CTC'leri) belirleme yeteneğine karşılık gelmez. Bu da, iki biyobelirtecin ayrı olduğunu göstermektedir [21,23-26]. CTC'ler tüm hastalarda değerlendirilebilir. Ancak bazı hastalarda CTC sayımları çok düşük olması nedeniyle negatif sonuç verebilir [27]. Dahası, CTC sayımları diğer kanserlerle karşılaştırıldığında CRC'de daha düşük bulunmaktadır. Çünkü kolondaki primer tümörden salınan birçok CTC, sistemik dolaşıma ulaşmadan önce karaciğerde tutulmaktadır [28]. Bu gözlemlerle tutarlı ve mevcut teknikleri kullanarak, ctDNA'nın tanısal performansı CRC'deki CTC'lerden daha üstündür. ctDNA'nın hem plazma hem de serum cfDNA'dan izolasyonu, cfDNA'da genetik değişikliklerin düşük seviyelerde olmasından dolayı, teknik yeterliliğe bağlı olarak olasıdır [24]. Bu ctDNA fragmanları, orijinal tümörde görülenlere benzer genetik kusurlar içerirler ve neredeyse, somatik nokta mutasyonları, translokasyonlar, DNA metilasyon değişiklikleri dahil olmak üzere kanser ile ilgili tüm moleküler değişiklikler belirlenebilir [29-31]. Bununla birlikte, şu anda ctDNA'nın diğer dolaşımdaki DNA'lardan izole edilmesi veya moleküler değişiklikler (genetik veya epigenetik) saptanmadıkça cfDNA'nın tümörden kaynaklandığın saptanması olası değildir. cfDNA'da mutasyonların saptanması için iki ana yaklaşım vardır. Birincisi, belirli bir tümör tipinden bilinen genetik değişikliklerin, küçük bir sıklıkla meydana gelen mutasyonların (Örneğin, kolorektal kanserde; KRAS, NRAS, BRAF ve EGFR mutasyonları) analizini içeren hedeflenmiş bir yaklaşımı içerir. İkincisi, daha az maliyetli olan toplam cfDNA miktarını kullanarak hedeflenmemiş bir yaklaşımı içerir. CfDNA'nın genom dizi analizini veya tam-ekzom dizilemeyi kullanan hedeflenmemiş bir yaklaşım da olasıdır [32]. Kandaki ctDNA seviyeleri, tümör DNA salım mekanizmalarındaki farklılıklar ve cfDNA klirensinin etkinliği nedeniyle hastalar arasında büyük ölçüde

**Tablo 1. DNA analizlerinde kullanılan teknikler.**

| Belirleme Prensibi | Teknik | Duyarlılık | Uygulama | Sınırlama | Avantajları | Optimal Klinik Yarar |
|---|---|---|---|---|---|---|
| PCR temelli | Real-time PCR<br>ARMS PCR<br>Bi-PAP amplifikasyonu | 0,1%-10% | Yalnızca SNV belirlenmesi | Düşük duyarlılık | Rutinde kullanmak kolay, düşük maliyetli | Tümör dokusu |
| Dijital PCR | BEAMing<br>Droplet-based dijital PCR<br>Mikrofluidik dijital PCR | 0,01%-0,1% | SNV belirlenmesi ve yalnızca bilinen genomik yeniden düzenlemeler | Spesifik Ekipman, oldukça pahalı | Yüksek duyarlılık | ctDNA (Tümör nüksünün saptanması, prognozun belirlenmesii, tümör yanıtının ve direncinin izlenmesi) |
| Hedeflenmiş derin sıralama | Safe-SeqS<br>TAmSeq<br>Ion-AmpliSeq<br>CAPP-Seq | 0,01%-0,1% | SNV, CNV belirlenmesi ve yanlızca hedeflenen bölgelerdeki yeniden düzenlemeler | PCR örnekleme biyas ve sıralama hataları | Yüksek duyarlılık, maliyet düşürücü etki | ctDNA (Teşhis, tarama, prognoz belirleme) |
| Tüm genom dizileme | PARE tüm ekzom dizileme | 1% | Genom genişliğinde SNV, CNV Belirlenmesi ve yeniden düzenlenmenin saptanması | Pahalı duyarlılık, devam eden gelişme | Geniş genom uygulaması | Şu anda teknikte gelişmeler olduğundan, gelecekte ctDNA (kanser teşhis, tarama, izleme ve direnç) |

*ARMS: amplifikasyon-refrakter mutasyon sistemi; BEAMing: boncuk, emülsiyon, amplifikasyon ve manyetik; Bi-PAP: çift yönlü pirofosforlu polimerize polimerizasyon; CAPP-Seq:derin dizileme ile kanser kişiselleştirilmiş profilleme; CNV: kopya sayısı varyasyonları; PARE: yeniden düzenlenmiş uçların kişiselleştirilmiş analizi, PCR: polimeraz zincir reaksiyonu; Safe-SeqS: güvenli sıralama sistemi; SNV: tek nükleotid varyasyonu; TamSeq: etiketli amplikon derin sıralama, ctDNA: dolaşımdaki tümör DNA'sı.*

değişebilir, ctDNA'nın toplam cfDNA'da ki oranı %0,01 ila %90 arasında değişir [25,33]. Serum cfDNA seviyeleri, toplama tüpündeki beyaz kan hücrelerinin pıhtılaşmasına bağlı olarak plazma seviyelerine [25,34-38] göre önemli ölçüde daha yüksektir. Bu da parçalanmalarına yol açar [25,37,38]. Sonuç olarak, serum ctDNA, beyaz kan hücrelerinden salınan genomik DNA ile seyreltilir ve plazma bir ctDNA kaynağı olarak yeğlenir [24,39]. Kanser hastalarında, cfDNA seviyeleri metastatik hastalıkta daha da artmakta ve bu da total cfDNA'nın tümör yüküyle ilişkili olduğunu düşündürmektedir [25]. Bununla birlikte, cfDNA'nın artışı enflamasyon (DNA'nın kan dolaşımına hızlandırılmış atılımı ile ilişkilidir.) ve organ nekrozunu (Örn. miyokardiyal enfarktüs) içeren durumlar da ortaya çıkar. Bununla birlikte, akciğer kanseri hastalarının, kronik solunum yolu inflamasyonu olan hastalara göre daha yüksek plazma cfDNA seviyelerine sahip oldukları bulunmuştur. Bu da, kanserde cfDNA yükselmesinin, inflamasyondan ziyade tümör gelişimine bağlı olabileceğini düşündürmektedir [40]. Eksozomlar, geç endozomun çoklu-veziküler gövdelerinden ekzositoz ile salınan küresel, nano boyutlu keseciklerdir [41,42]. Hem normal hem de tümör hücrelerinden salınırlar, kan ve diğer vücut sıvılarında bulunurlar. Tümör kaynaklı eksozomlar, tümör büyümesini ve gelişimini etkileyen pleiotropik rollere sahiptir. Eksozomlar, çift sarmallı DNA, tek iplikli RNA, uzun kodlamayan RNA ve mikroRNA (miRNA) içeren proteinler, lipitler ve nükleik asitler içerir. Sonuç olarak, tümör mutasyonları eksozom türevi nükleik asitler kullanılarak tanımlanabilir. Veziküller serumdan ekstrakte edilebilir ve ekstraselüler veziküllerdeki tümör kaynaklı genomik materyal daha konsantre ve daha iyi korunmuş olduğundan, tümör DNA analizi için ctDNA'ya umut verici gelecek bir alternatif olabilir [41,42]. Bazı çalışmalar, dolaşımdaki serbest miRNA'yı (ekzozomal olmayan) biyobelirteçler olarak da değerlendirmişlerdir. Ancak sonuçlar yeterli bulunmamıştır. Ne dolaşımdaki serbest miRNA, ne de ekzosomal miRNA, klinik uygulamada sıvı biyopsi olarak kullanılmaya şimdilik hazır değildir [43]. Dolaşımdaki DNA seviyeleri; klirens, degradasyon ve diğer fizyolojik filtreleme olaylarından etkilenir [44-46]. Nükleik asitler, karaciğer ve böbrekler tarafından kandan elemine edilir. Dolaşımda değişken bir yarı ömre sahiptirler 15 dk. ila 2 saat arasında

değişkenlik gösterir [49]. Bireysel bir hastanın kan ctDNA seviyelerine dayanan tümör genetik profilinin tanımlanması, giderek hassas olan tekniklerin ortaya çıkmasıyla olası olmuştur [44-46]. Önceki çalışmalar, plazma ctDNA'yı saptamak için Sanger dizileme yöntemini kullanmıştır, ancak bu teknik, düşük hassasiyet ve zahmetli protokoller dahil olmak üzere birçok eksikliğe sahiptir. "İkinci jenerasyon" sekanslama teknikleri, ctDNA saptaması için önemli ölçüde daha yüksek hassasiyet sağlar (Tablo 1). Örneğin, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) bazlı iki yönlü pirofosforil-aktive edilmiş polimerizasyon (Bi-PAP) tekniği, daha sonra DNA polimerizasyonu ile genişletilmiş olan bir pirofosforil-aktive edilmiş oligonükleotid kullanılarak bir tek nükleotit değişimi hassas bir şekilde belirleyebilir [45]. Çoğu PCR tabanlı tekniklerde olduğu gibi, çok spesifiktir fakat ctDNA saptanması için sınırlı duyarlılığa sahiptir. BEAMing (boncuklar, emülsiyon, amplifikasyon ve manyetikler), hedef DNA segmentinin, bilinen etiket sekanslarını içeren primerler kullanılarak ve manyetik boncuklara kovalent olarak bağlı olduğu amplifiye edilmiş bir dijital PCR tekniğidir [25]. Floresan etiketli hibridizasyon probları ile inkübasyonun ardından, DNA mutasyonunu içeren taneciklerin ölçülmesi için manyetik akış sitometrisi kullanılır. Yeni nesil dizileme (NGS), analiz başına düşük maliyet ile çeşitli yüksek verimli teknolojileri kapsayan geniş bir terimdir. Bu yöntemin ilgi konusu gende sıklıkla mutasyona uğramış bölgeleri hedefleyen DNA oligonükleotidlerinden oluşan bir prob panelini kullanan derin dizilemeyi içerir [48,49]. Sistemik PCR ve dizileme hataları, yüksek verimli tekniklerin nadir mutasyonları belirleme yeteneğini tehlikeye atabilir. Bu sınırlamayı gidermek için, SafeSequencing Sistemi (Safe-SeqS), amplifiye edilecek her bir DNA parçasını etiketlemek için benzersiz bir DNA dizisi veya "barkod" kullanır. Ardından amplifiye edilmiş fragmanların yedek dizisi kullanılır [48,49]. Bu yaklaşım, düşük frekanslı mutasyonların güvenli bir şekilde tanımlanmasını sağlar [51]. "Üçüncü nesil" tam genom sıralama tekniklerinin geliştirilmesi devam etmektedir. Bunlar, tüm genom boyunca seçilmemiş genetik olayları tespit etmek için geliştirilmiş, yeniden düzenlenmiş uçların (PARE) kişiselleştirilmiş analizini içerir [52]. Mutasyon belirlemesi için daha etkin bir yaklaşım, edinilmiş ilaç direnci ve klonal evrimi inceleyen mutasyonları tanımlamak için potansiyele sahip olabilecek, bütünlük dizilemesi olacaktır [53]. DREAMing olarak bilinen yeni bir teknik, sıvı biyopsi örneklerinde çok nadir görülen epiallelik varyantların analizini olası kılmaktadır [54]. Bettegowda ve ark. [27], yaptıkları çalışmada, 16 farklı doku tipinden kaynaklanan 187 tümörde ctDNA'yı doğrudan karşılaştırarak, hangi ctDNA ölçümlerinin klinik olarak yararlı olabileceği değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, ctDNA düzeylerinin tümör tipleri arasında değiştiğini göstermişlerdir. ctDNA'nın incelenmesi, moleküler heterojenliği de değerlendirmeye de yardımcı olabilir. Çünkü periferik kan, primer tümörden ve farklı metastatik bölgelerden türetilmiş bir DNA havuzudur. Bu nedenle, bir hastada tüm tümör yükünün kapsamlı olarak gerçek zamanlı resmini ortaya koyabilir.

**Kolorektal Kanserde Sıvı Biyopsinin Potansiyel Klinik Uygulamaları**

Kanser tanısı ve taramasında sıvı biyopsinin büyük bir önemi vardır. CRC'deki en sık görülen gen mutasyonları, KRAS ve BRAF V600E'yi içerir, yaklaşık olarak %40 ve %5-9'luk bir sıklıkta görülür [55-58]. Oldukça hassas teknikler bu tür mutasyonların neredeyse tamamını belirleyebilir ancak iyi bir tarama veya tanı testi olguların en az %80'ini tanımlayabilmelidir. KRAS ve BRAF ctDNA testi kullanıldığında yaklaşık %50 tanımlanabilmektedir. Bu da bireysel mutasyonların ctDNA ile belirlenmesinin, popülasyon taraması için yeterli duyarlılığa sahip olmadığını göstermektedir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, RAS mutasyonlarının saptanması için genel duyarlılık %63 olarak belirlenmiştir. Primer tümör yerinde kaldığında bu duyarlılık %100 iken, rezeksiyon sonrası duyarlılık %46'ya gerilediği bildirilmiştir [59]. KRAS ile mutasyona uğramış tümörlerde, KRAS mutasyonuna uğramış ctDNA'nın saptanması için duyarlılık, metastatik olmayan hastalık için %20 ile %60 arasında değişmekte olduğu saptanmıştır [60,61]. Fekal immünokimyasal test (FIT), asemptomatik, ortalama riskli eriş-

kinlerden oluşan 19 çalışmanın verilerine dayanılarak değerlendirildiğinde, bu testin, CRC taraması için %79 duyarlılık ve %94 özgüllüğe sahip olduğu saptanmıştır [62]. ctDNA'nın tanımlanmasına yönelik alternatif bir yaklaşım, mutasyonlara göre tümörler arasında daha tutarlı olan spesifik promotör bölgelerinin anormal DNA metilasyonunun saptanmasıdır [63]. DNA metilasyonu, CRC karsinogenezinde erken bir olaydır ve çeşitli çalışmalarda CRC tarama, teşhisi için metile ctDNA kullanımı araştırılmıştır (Tablo 2) [64-72]. Çeşitli çalışmalarda, Septin 9 (SEPT9) gen promotörünün tedavi öncesi metilasyon durumunu değerlendirilmiştir. SEPT9 metilasyonu, hastalık evresine (metastatik ve metastatik olmayan) bağlı olarak yaklaşık %70 (%50-90) ve CRC'yi saptamak için yaklaşık %90 (%70-100) bir duyarlılığa sahip olduğu gösterilmiştir [46,66,67,71-73]. Bu bulguların kullanılan tekniğin duyarlılığına bağlı olduğunu belirtmek gerekir. Bu teknikler, hem SEPT9 geninin segmentinde hem de pozitif olduğu düşünülen kesme seviyesinde varyasyona sahip, karmaşık ve heterojendirler. Bu faktörler rapor edilen farklı SEPT9 metilasyon duyarlılığını açıklayabilmektedir. Gelecek yönelimlerle ilgili olarak, yeni çalışmalar CRC tanısı için uygun olabilecek ek DNA metilasyon biyobelirteçleri belirlenmektedir [54,74,75]. Kolorektal kanser taramalarında, hassasiyet ve özgüllüğü arttırmak için multigen metilasyon imzaları kullanılmış, sonuçlar umut verici olarak bildirilmektedir [64-72]. Buna iyi örnek olacak bir çalışma gösterecek olursak, BCAT1 ve IKZF1 metilasyon testi

**Tablo 2. Tedaviden önce metillenmiş ve/veya mutasyona uğramış ctDNA'nın saptanmasıyla kolorektal kanser taraması veya teşhisi.**

| Referans | Gen | ctDNA ölçümü için kullanılan teknik | Hasta sayısı | Hastalık evresi (%) | Kandaki algılama oranı (% (n)) |
|---|---|---|---|---|---|
| Cassinotti et al.[64] | CYCD2<br>HIC1<br>PAX5<br>RASSF1A<br>RB1<br>SRBC<br>Tüm genler birlikte | Mikroarray aracılı metilasyon analizi | 30 | Evre M0 (%100) | %97 (n=29)<br>%63 (n=19)<br>%87 (n=26)<br>%93 (n=28)<br>%90 (n=27)<br>%33 (n=10)<br>%84 (n=25) |
| Church et al.[65] | SEPT9 | Bisülfit dönüşümü ve metillenmiş gerçek zamanlı SEPT9 | 53 | Evre M0 (%91)<br>Evre M1 (%9) | %51 (n=27) |
| deVos et al.[66] | SEPT9 | Bisülfit dönüşümü ve metillenmiş gerçek zamanlı PCR SEPT9 | 187 | Evre M0 (%96)<br>Evre M1 (%4) | %56 (n=105) |
| Grutzmann et al.[67] | SEPT9 | Bisülfit dönüşümü ve metillenmiş gerçek zamanlı PCR SEPT9 | 378 | Evre M0 (%84)<br>Evre M1 (%11)<br>Bilinmeyen (%5) | %51 (n=193) |
| Herbst et al.[68] | NEUROG1 | Bisülfit dönüşümü ve metillenmiş gerçek zamanlı PCR NEUROG1 | 95 | Evre M0 (%81)<br>Evre M1 (%19) | %66 (n=63) |
| Lee et al.[69] | APC<br>MGMT<br>RASSF2A<br>Wif-1<br>Tüm genler birlikte | Metilasyon spesifik PCR | 243 | Evre M0 (%100) | %27 (n=66)<br>%39 (n=95)<br>%58 (n=141)<br>%74 (n=180)<br>%86 (n=210) |
| Lee et al.[70] | SEPT | Bisülfit dönüşümü ve metillenmiş gerçek zamanlı PCR SEPT9 | 101 | Evre M0 (%83)<br>Evre M1 (%17) | %37 (n=37) |
| Lofton-Day et al.[71] | TMEFF2<br>NGFR<br>SEPT9 | Bisülfit dönüşümü ve metillenmiş gerçek zamanlı PCR, TMEFF2, NGFR, ve SEPT9 | 133 | Evre M0 (%75)<br>Evre M1 (%23)<br>Bilinmeyen (%2) | %65 (n=87)<br>%51 (n=68)<br>%69 (n=92) |
| Warren et al.[72] | SEPT9 | Bisülfit dönüşümü ve metillenmiş gerçek zamanlı PCR SEPT9 | 50 | Evre M0 (%90)<br>Evre M1 (%10) | %90 (n=45) |

*APC: Adenomatozis Polipozis Koli; CYCD2: siklin-D2-1; HIC1: kanserde hipermetilasyon 1; MGMT: O-6-metilguanin-DNA metiltransferaz; NEUROG1: nörogenin 1; NGFR: sinir büyüme faktör reseptörü; PAX5: kopyalama faktörü 5; PCR: polimeraz zincir reaksiyonu; RASSF2A: Ras ilişkilendirme alanı ailesi 2A; RB1: retinoblastoma; SEPT9: septin 9; SRBC: serpentin reseptörü, class BC; TMEFF2: EGF-benzeri ve iki follistatin benzeri alanla transmembran protein 2; Wif-1: WNT inhibitör faktör 1; ctDNA: dolaşımdaki tümör DNA; CRC: kolorektal kanser.*

**Tablo 3. ctDNA ile kolorektal kanser rekürensinin saptanması.**

| Referans | Gen | Plazmadan DNA ekstraksiyon periyodu | ctDNA ölçme metodu | Tedavi | Hasta sayısı | Plazmada rekürrens oranı (%, n-positive ctDNA/n rekürrens) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Diehl et al.[25] | APC, TP53, KRAS, ve PI3K | Cerrahiden önce ve sonra (Evre IV) | BEAMing | Cerrahi ± Kemoterapi (61%) | 18 | %100 (n = 15/15) |
| Ryan et al.[80] | KRAS | Cerrahiden 1 hafta, 1 ay ve 3 ay sonra (Evre I-III) | Yarı yuvalanmış mutant zenginleştirme tekniği ve doğrudan sıralama | Cerrahi ± Kemoterapi (53%) | 94 | %91 (n = 10/11) |
| Frattini et al.[82] | Total DNA, KRAS ve p16INK4a | Cerrahiden önce ve sonra 4, 10, ve 16 aylar | Mutant zenginleştirilmiş PCR and F-MSP | Cerrahi ± Kemoterapi | 70 | %100 (n = 18/18) |
| Tie et al.[83] | Kişiselleştirilmiş analiz | Cerrahiden 4-10 hafta sonra (Evre II), daha sonra bir hasta alt grubunda 2 yıla kadar her 3 ayda bir | Safe-SeqS | Cerrahi ± Kemoterapi | 230 | %41 (n = 11/27) yalnızca ameliyat grubu |

*APC: Adenomatöz Polipozis Koli; BEAMing: boncuk, emulsion, amplifikasyon ve manyetik; F-MSP: ffloresan metilasyona özgü PCR; PI3K: fosfoinozitide 3-kinaz; PCR: polimeraz zincir reaksiyonu; Safe-SeqS: safe-sequencing sistemi; ctDNA: dolaşımdaki tümör DNA'sı.*

kullanıldığında, kolorektal kanserli hastaların yaklaşık %70'ini tanımlanabilmiştir [76-78]. Tümör rekürrensi, minimal rezidüel hastalık ve prognoz değerlendirilmesinde de sıvı biyopsisinin önemli bir yeri olduğu anlaşılmıştır. Cerrahi tek başına lokalize CRC'li hastaların büyük bir kısmını tedavi etmektedir. Bununla birlikte, hangi hastaların nüks ile sonuçlanacak rezidüel hastalığa sahip olduğunu belirlemek için şu anda etkili bir yöntem bulunmamaktadır. Sonuç olarak, yüksek riskli klinikopatolojik özelliklere sahip hastalar, potansiyel olarak toksik ve gereksiz adjuvan tedavi alırlar. ctDNA rezeksiyon sonrası rezidüel hastalığın potansiyel bir göstergesi olduğundan, sıvı biyopsi hangi hastaların rekürrens yaşayacağına ve adjuvan tedaviden yarar sağlayacağına karar verebilir. Bugüne kadar, az sayıda çalışma kolorektal kanserde küratif cerrahiden sonra rekürrens belirteci olarak ctDNA'yı kullanmıştır. Ancak, güncel çalışmalar, cerrahi rezeksiyon sonrası ctDNA belirlenmesinin minimal rezidüel hastalık ve yüksek nüks oranı ile ilişkili olduğunu göstermektedir [25,79-83]. Küratif cerrahiden sonra tümör nüks oranını özel olarak değerlendiren çalışmalar Tablo 3'te gösterilmiştir [25,80,82,83]. Bazı çalışmalarda, kolorektal kanser rekürensini saptamak için KRAS mutasyonuna uğramış ctDNA kullanılmıştır [80]. Böyle bir çalışmada, saptanabilir KRAS-mutasyona uğramış ctDNA'sı olan hastaların %63'ünde, serum mutantı negatif olan hastaların yalnızca %2'sinde rekürrens gelişmiştir. Rekürensi değerlendirilmesinde duyarlılık %91, özgüllük %88 olarak bildirilmiştir [80]. Kolorektal kanserde, cerrahi sonrası, kemoterapi verilmeyen, dolayısıyla çok yüksek rekürrens riski olan bir hasta alt kümesi tanımlanmış ve postoperatif ctDNA pozitif olan hastaların % 79'unda, ctDNA negatif hastaların %9,8'inde radyolojik rekürrens doğrulanmıştır [83]. Postoperatif ctDNA'nın 3 yıl içerisinde gelişebilecek nüksleri öngörebilme duyarlılığı %48, özgüllüğü %100 olarak bildirilmiştir. Bu bulgular, ctDNA'nın rezeksiyon sonrası minimal rezidüel hastalığı belirlemeye tümör duyarlılığını yüksek hassasiyetle tahmin etmeye ve hangi hastaların adjuvant tedaviden en fazla yararlanacağını belirlemeye yardımcı olabileceğini göstermektedir. Literatürde metastatik CRC hastalarda yapılan CTC seviyelerinin radyolojik tümör yanıtı üzerine ilişkisinin değerlendirildiği bazı klinik çalışmalarda, genel sağkalım ve hastalıksız sağkalım oranları değerlendirilmiştir. CTC seviyeleri için farklı zamanlarda, farklı eşik ve ölçüm değerleri olmasına rağmen, tümör yanıtı ile körele sonuçlar bulunmuştur. Tartışma kısımlarında tümör yanıtının değerlendirilmesinde de potensiyel bir biyobelirteç olarak önemli bir yer ileride bulabilir şeklinde sonlandırılmıştır [84-90].

## SONUÇ

Bugüne dek elde edilen veriler, sıvı biyopsinin kolorektal kanserin değerlendirmesini optimize etme, evrimi izlemi, hedefe yönelik tedavilere direnci izleme ve özel tedaviler tasarlama potansiyeline sahip yeni bir teknoloji olarak potansiyelini desteklemektedir. Klinikte bize çok değerli bilgiler sağlayan dolaşımdaki tümör DNA'ı ve tümör hücrelerine büyük ilgi vardır. KRAS ile mutasyona uğramış dolaşımdaki tümör DNA'sının saptanmasının, hem uygun bir tedavi stratejisinin belirlenmesinde, hem de tedavi direncini değerlendirmede büyük önem taşıdığı belirtilmektedir. Sıvı biyopsinin klinik pratiğe entegrasyonu, gelecekte yapılacak kapsamlı çalışmalarda tartışılabilecektir.

**Çıkar Çatışması:** Çıkar çatışması yoktur.
**Finansal Destek:** Finansal destek alınmamıştır.

**Conflict of Interest:** There is no conflict of interest.
**Funding:** No financial support was received.

## KAYNAKLAR

1. Kumar R, Abbas A, DeLancey A, Malone E. Pathologic Basis of Disease. Philadelphia: Saunders. 2010: 815-26.
2. Haggar FA, Boushey RP. Colorectal Cancer Epidemiology Incidence, Mortality, Survival and Risk factors. Clin Colon Rectal Surg. 2009: 191-7.
3. World Cancer Research Fundand American Institute for Cancer Research Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. Washington DC, American Institute for Cancer Research. 2007: 1-20.
4. Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P, Ilyas M, Morreau H, Nakamura SI, et al. Carcinoma of the Colon and Rectum. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND (editors). Pathology and Genetics of Tumors of the Digestive System. Lyon: IARC Press. 2010: 132-81.
5. Siegel RL, Sahar L, Portier KM, Ward EM, Jemal A. CA Cancer J Clin. 2015 Sep-Oct;65(5):339-44.
6. Pantel K and Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. Nat Rev Cancer. 2004;4:448-56. [CrossRef]
7. Greaves M and Maley CC. Clonal evolution in cancer. Nature. 2012;481:306-13. [CrossRef]
8. Loeb LA. Human cancers express mutator phenotypes: origin, consequences and targeting. Nat Rev Cancer. 2011;11:450-7. [CrossRef]
9. Klein CA. Selection and adaptation during metastatic cancer progression. Nature. 2013;501:365-72. [CrossRef]
10. Li SC, Tachiki LM, Kabeer MH, et al. Cancer genomic research at the crossroads: realizing the changing genetic landscape as intratumoral spatial and temporal heterogeneity becomes a confounding factor. Cancer Cell Int. 2014;14:115. [CrossRef]
11. Bedard PL, Hansen AR, Ratain MJ, et al. Tumour heterogeneity in the clinic. Nature. 2013;501:355-64. [CrossRef]
12. Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, et al. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. Nature. 2013;501:338-45. [CrossRef]
13. Meacham CE and Morrison SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. Nature. 2013;501:328-37. [CrossRef]
14. Yang D, Wang L and Tian X. Application of circulating tumor cells scope technique on circulating tumor cell research. Mol Cell Ther. 2014;2:8. [CrossRef]
15. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Clinical practice guidelines in oncology (NCCN Guidelines®; Colon Cancer Version 2). Fort Washington, PA: NCCN, 2016.
16. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. Ann Oncol. 2016;27:1386-422. [CrossRef]
17. Misale S, Di Nicolantonio F, Sartore-Bianchi A, et al. Resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer: from heterogeneity to convergent evolution. Cancer Discov. 2014;4:1269-80. [CrossRef]
18. Gazzaniga P, Raimondi C, Nicolazzo C, et al. The rationale for liquid biopsy in colorectal cancer: a focus on circulating tumor cells. Expert Rev Mol Diagn. 2015;15:925-32. [CrossRef]
19. Mandel P and Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. C R Seances Soc Biol Fil. 1948;142:241-3.
20. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. Cancer Res. 1977;37:646-50.
21. Jahr 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;61:1659-65.
22. 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;313:139-42. [CrossRef]
23. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, et al. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105:16266-71. [CrossRef]
24. Diehl F, Li M, Dressman D, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102:16368-73. [CrossRef]
25. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. Nat Med. 2008;14:985-90. [CrossRef]
26. Kin C, Kidess E, Poultsides GA, et al. Colorectal cancer diagnostics: biomarkers, cell-free DNA, circulating tumor cells and defining heterogeneous populations by single-cell analysis. Expert Rev Mol Diagn. 2013;13:581-99. [CrossRef]
27. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. Sci Transl Med. 2014;6:224ra24.
28. Gkountela S, Szczerba B, Donato C, et al. Recent advances in the biology of human circulating tumour cells and metastasis. ESMO Open. 2016;1:e000078.
29. Wang JY, Hsieh JS, Chang MY, et al. Molecular detection of APC, K-ras, and p53 mutations in the serum of colorectal cancer patients as circulating biomarkers. World J Surg. 2004;28:721-6. [CrossRef]
30. Shaw JA, Smith BM, Walsh T, et al. Microsatellite alterations plasma DNA of primary breast cancer patients. Clin Cancer Res. 2000;6:1119-24.
31. Fujiwara K, Fujimoto N, Tabata M, et al. Identification of epigenetic aberrant promoter methylation in serum DNA is

useful for early detection of lung cancer. Clin Cancer Res. 2005;11:1219-25.
32. Chan KC, Jiang P, Zheng YW, et al. Cancer genome scanning in plasma: detection of tumor-associated copy number aberrations, single-nucleotide variants, and tumoral heterogeneity by massively parallel sequencing. Clin Chem. 2013;59:211-24. [CrossRef]
33. Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. N Engl J Med. 2013;368:1199-1209. [CrossRef]
34. Jing RR, Wang HM, Cui M, et al. A sensitive method to quantify human cell-free circulating DNA in blood: relevance to myocardial infarction screening. Clin Biochem. 2011;44:1074-9. [CrossRef]
35. Shimony A, Zahger D, Gilutz H, et al. Cell free DNA detected by a novel method in acute ST-elevation myocardial infarction patients. Acute Card Care. 2010;12:109-11. [CrossRef]
36. Macher H, Egea-Guerrero JJ, Revuelto-Rey J, et al. Role of early cell-free DNA levels decrease as a predictive marker of fatal outcome after severe traumatic brain injury. Clin Chim Acta. 2012;414:12-7. [CrossRef]
37. Ohayon S, Boyko M, Saad A, et al. Cell-free DNA as a marker for prediction of brain damage in traumatic brain injury in rats. J Neurotrauma. 2012;29:261-7. [CrossRef]
38. Tsai NW, Lin TK, Chen SD, et al. The value of serial plasma nuclear and mitochondrial DNA levels in patients with acute ischemic stroke. Clin Chim Acta. 2011;412:476-9. [CrossRef]
39. Holdhoff M, Schmidt K, Donehower R, et al. Analysis of circulating tumor DNA to confirm somatic KRAS mutations. J Natl Cancer Inst. 2009;101:1284-5. [CrossRef]
40. Szpechcinski A, Chorostowska-Wynimko J, Struniawski R, et al. Cell-free DNA levels in plasma of patients with nonsmall-cell lung cancer and inflammatory lung disease. Br J Cancer. 2015;113:476-83. [CrossRef]
41. Cai J, Wu G, Jose PA, et al. Functional transferred DNA within extracellular vesicles. Exp Cell Res. 2016;349:179-83. [CrossRef]
42. Gold B, Cankovic M, Furtado LV, et al. Do circulating tumor cells, exosomes, and circulating tumor nucleic acids have clinical utility? A report of the association for molecular pathology. J Mol Diagn. 2015;17:209-24. [CrossRef]
43. Uratani R, Toiyama Y, Kitajima T, et al. Diagnostic potential of cell-free and exosomal microRNAs in the identification of patients with high-risk colorectal adenomas. PLoS ONE 2016;11:e0160722.
44. Vogelstein B and Kinzler KW. Digital PCR. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96:9236-41. [CrossRef]
45. Dressman D, Yan H, Traverso G, et al. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100:8817-22. [CrossRef]
46. Liu Q and Sommer SS. Pyrophosphorolysis-activated polymerization (PAP): application to allele-specific amplification. Biotechniques. 2000;29:1072-1076, 1078, 1080 passim.
47. Madic J, Piperno-Neumann S, Servois V, et al. Pyrophosphorolysis-activated polymerization detects circulating tumor DNA in metastatic uveal melanoma. Clin Cancer Res. 2012;18:3934-41. [CrossRef]
48. Forshew T, Murtaza M, Parkinson C, et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. Sci Transl Med. 2012;4:136ra68.
49. Newman AM, Bratman SV, To J, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. Nat Med. 2014;20:548-54. [CrossRef]
50. Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, et al. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. Proc Natl Acad Sci U S A 2011;108:9530-5. [CrossRef]
51. Kou R, Lam H, Duan H, et al. Benefits and challenges with applying unique molecular identifiers in next generation sequencing to detect low frequency mutations. PLoS ONE. 2016;11:e0146638.
52. Leary RJ, Sausen M, Kinde I, et al. Detection of chromosomal alterations in the circulation of cancer patients with whole-genome sequencing. Sci Transl Med. 2012;4:162ra54.
53. Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. Nature. 2013;497:108-12. [CrossRef]
54. Pisanic TR 2nd, Athamanolap P, Poh W, et al. DREAMing: a simple and ultrasensitive method for assessing intratumor epigenetic heterogeneity directly from liquid biopsies. Nucleic Acids Res. 2015;43:e154.
55. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. Nature. 2012;487:330-7. [CrossRef]
56. Douillard JY, Oliner KS, Siena S, et al. PanitumumabFOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. N Engl J Med. 2013;369:1023-34. [CrossRef]
57. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. Lancet Oncol. 2010;11:753-62. [CrossRef]
58. Tol J, Nagtegaal ID and Punt CJ. BRAF mutation in metastatic colorectal cancer. N Engl J Med. 2009;361:98-9. [CrossRef]
59. Rachiglio AM, Abate RE, Sacco A, et al. Limits and potential of targeted sequencing analysis of liquid biopsy in patients with lung and colon carcinoma. Oncotarget. 2016;7:66595-605. [CrossRef]
60. Taly V, Pekin D, Benhaim L, et al. Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. Clin Chem. 2013;59:1722-31. [CrossRef]
61. Lin JK, Lin PC, Lin CH, et al. Clinical relevance of alterations in quantity and quality of plasma DNA in colorectal cancer patients: based on the mutation spectra detected in primary tumors. Ann Surg Oncol. 2014;21(Suppl. 4):680-6.
62. Song LL and Li YM. Current noninvasive tests for colorectal cancer screening: an overview of colorectal cancer screening tests. World J Gastrointest Oncol. 2016;8:793-800. [CrossRef]
63. Warton K, Mahon KL and Samimi G. Methylated circulating tumor DNA in blood: power in cancer prognosis and response. Endocr Relat Cancer. 2016;23:R157-R71.
64. Cassinotti E, Melson J, Liggett T, et al. DNA methylation patterns in blood of patients with colorectal cancer and adenomatous colorectal polyps. Int J Cancer. 2012;131:1153-7. [CrossRef]
65. Church TR, Wandell M, Lofton-Day C, et al. Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer. Gut. 2014;63:317-25. [CrossRef]
66. deVos T, Tetzner R, Model F, et al. Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer. Clin Chem. 2009;55:1337-46. [CrossRef]
67. Grutzmann R, Molnar B, Pilarsky C, et al. Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay. PLoS ONE. 2008;3:e3759.
68. Herbst A, Rahmig K, Stieber P, et al. Methylation of NEUROG1 in serum is a sensitive marker for the detection of early colorectal cancer. Am J Gastroenterol. 2011;106:1110-8. [CrossRef]
69. Lee BB, Lee EJ, Jung EH, et al. Aberrant methylation of APC, MGMT, RASSF2A, and Wif-1 genes in plasma as a biomarker

for early detection of colorectal cancer. Clin Cancer Res. 2009;15:6185-91. [CrossRef]
70. Lee HS, Hwang SM, Kim TS, et al. Circulating methylated septin 9 nucleic acid in the plasma of patients with gastrointestinal cancer in the stomach and colon. Transl Oncol. 2013;6:290-6. [CrossRef]
71. Lofton-Day C, Model F, Devos T, et al. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. Clin Chem. 2008;54:414-23. [CrossRef]
72. Warren JD, Xiong W, Bunker AM, et al. Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer. BMC Med. 2011;9:133. [CrossRef]
73. Weirich CS, Erzberger JP and Barral Y. The septin family of GTPases: architecture and dynamics. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008;9:478-89. [CrossRef]
74. Lam K, Pan K, Linnekamp JF, et al. DNA methylation based biomarkers in colorectal cancer: a systematic review. Biochim Biophys Acta. 2016;1866:106-20. [CrossRef]
75. Rasmussen SL, Krarup HB, Sunesen KG, et al. Hypermethylated DNA as a biomarker for colorectal cancer: a systematic review. Colorectal Dis. 2016;18:549-61. [CrossRef]
76. Pedersen SK, Symonds EL, Baker RT, et al. Evaluation of an assay for methylated BCAT1 and IKZF1 in plasma for detection of colorectal neoplasia. BMC Cancer. 2015;15:654. [CrossRef]
77. Symonds EL, Pedersen SK, Baker RT, et al. A blood test for methylated BCAT1 and IKZF1 vs. a fecal immunochemical test for detection of colorectal neoplasia. Clin Transl Gastroenterol. 2016;7:e137.
78. Young GP, Pedersen SK, Mansfield S, et al. A cross-sectional study comparing a blood test for methylated BCAT1 and IKZF1 tumor-derived DNA with CEA for detection of recurrent colorectal cancer. Cancer Med. 2016;5:2763-72. [CrossRef]
79. Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. PLoS ONE. 2011;6:e23418.
80. Ryan BM, Lefort F, McManus R, et al. A prospective study of circulating mutant KRAS2 in the serum of patients with colorectal neoplasia: strong prognostic indicator in postoperative follow up. Gut. 2003;52:101-8. [CrossRef]
81. Bazan V, Bruno L, Augello C, et al. Molecular detection of TP53, Ki-Ras and p16INK4A promoter methylation in plasma of patients with colorectal cancer and its association with prognosis. Results of a 3-year GOIM (Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale) prospective study. Ann Oncol. 2006;17(Suppl. 7):vii84-vii90.
82. Frattini M, Gallino G, Signoroni S, et al. Quantitative and qualitative characterization of plasma DNA identifies primary and recurrent colorectal cancer. Cancer Lett. 2008;263:170-81. [CrossRef]
83. Tie J, Wang Y, Tomasetti C, et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. Sci Transl Med. 2016;8:346ra92.
84. Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, Picus J, Morse M, Mitchell E, Miller MC, Doyle GV, Tissing H, Terstappen LW, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression- free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol. 2008;26:3213-21. [CrossRef]
85. Tol J, Koopman M, Miller MC, Tibbe A, Cats A, Creemers GJ, Vos AH, Nagtegaal ID, Terstappen LW, Punt CJ. Circulating tumour cells early predict progression-free and overall survival in advanced colorectal cancer patients treated with chemotherapy and targeted agents. Ann Oncol. 2010;21:1006-12.
86. Matsusaka S, Suenaga M, Mishima Y, Kuniyoshi R, Takagi K, Terui Y, Mizunuma N, Hatake K. Circulating tumor cells as a surrogate marker for determining response to chemotherapy in Japanese patients with metastatic colorectal cancer. Cancer Sci. 2011;102:1188-92.
87. Sastre J, Maestro ML, Gomez-Espana A, Rivera F, Valladares M, Massuti B, Benavides M, Gallén M, Marcuello E, Abad A, Arrivi A, Fernández-Martos C, González E, et al. Circulating tumor cell count is a prognostic factor in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line chemotherapy plus bevacizumab: a Spanish Cooperative Group for the Treatment of Digestive Tumors study. Oncologist. 2012;17:947-55. [CrossRef]
88. de Albuquerque A, Kubisch I, Stolzel U, Ernst D, Boese-Landgraf J, Breier G, Stamminger G, Fersis N, Kaul S. Prognostic and predictive value of circulating tumor cell analysis in colorectal cancer patients. J Transl Med. 2012;10:222. [CrossRef]
89. Barbazan J, Muinelo-Romay L, Vieito M, Candamio S, Diaz-Lopez A, Cano A, Gómez-Tato A, Casares de Cal Mde L, Abal M, López-López R. A multimarker panel for circulating tumor cells detection predicts patient outcome and therapy response in metastatic colorectal cancer. Int J Cancer. 2014;135:2633-43. [CrossRef]
90. Gazzaniga P, Raimondi C, Nicolazzo C, Carletti R, di Gioia C, Gradilone A, Cortesi E. The rationale for liquid biopsy in colorectal cancer: a focus on circulating tumor cells. Expert Rev Mol Diagn. 2015;15:925-32. [CrossRef]