

Overzichten

Vroegdiagnostiek van carcinomen met behulp van puntmutatie-detectie in excreten en secreten: een realistisch of fictief toekomstbeeld?

C. van de WATER¹, D. W. SWINKELS² en A. STURK¹

In dit overzichtsartikel wordt ingegaan op de mogelijkheden om puntmutaties in oncogenen en tumor-suppressorgenen te gebruiken als tumormerkers in de vroegdiagnostiek van carcinomen. Door de recente ontwikkelingen in de moleculaire biologie neemt de kennis over de pathogenese van tumoren steeds verder toe. Inmiddels zijn een groot aantal veranderingen in het genetisch materiaal (met name puntmutaties) beschreven die zowel in een vroegtijdig stadium van de carcinogenese ontstaan alsook een hoge tumor-incidentie vertonen. Daarnaast zijn er ontwikkelingen in de technologie van de polymerase kettingreactie (PCR), die het mogelijk maken puntmutaties te detecteren in monsters die voor een zeer groot percentage uit "normale" cellen bestaan. Dit laatste biedt perspectief om voor een aantal tumoren screeningsprogramma's op te zetten, die gericht zijn op het detecteren van puntmutaties in matrices als urine, faeces en speeksel. Aan de hand van recente literatuur wordt aangetoond dat concrete toepassingen van puntmutatie-detectie in vroegdiagnostiek van carcinomen een alleszins realistisch toekomstbeeld is. Tevens worden een aantal bruikbare technieken voor puntmutatie-detectie kort besproken.

Trefwoorden: puntmutatie-detectie; vroegdiagnostiek; carcinoom

Bij het ontstaan en de progressie van tumoren staan veranderingen in het genoom centraal (1-3). Dankzij de indrukwekkende ontwikkelingen in de moleculaire biologie is inmiddels veel bekend over zowel tumor-specifieke als algemeen voorkomende veranderingen in het genetisch materiaal bij tumorcellen. Hierdoor is het inzicht in de pathogenese van tumoren enorm toegenomen. Genetische veranderingen in tumoren ontstaan al in een fase die voorafgaat aan het stadium waarop de klinische symptomen zich openbaren. Dit betekent dat de ontwikkelingen in de moleculaire biologie in principe ook nieuwe perspectieven bieden

met betrekking tot pré-symptomatische diagnostiek van tumoren. Aangezien operatieve resectie van "early-stage"-tumoren beschouwd wordt als de meest wenselijke therapie, is het uiterst belangrijk om tumoren in een zeer vroegtijdig stadium te detecteren. Nieuwe moleculair diagnostische testen, die gericht zijn op het detecteren van genetische veranderingen in de tumorcel, kunnen dankzij de mogelijkheden tot vroegdiagnostiek leiden tot een daling in zowel de morbiditeit als mortaliteit. Vroegdiagnostiek van tumoren bij goed gedefinieerde "high-risk"-groepen zal met name een brede ingang vinden als de matrix waarin wordt gescreend via eenvoudige, bij voorkeur niet-invasieve methoden, kan worden verkregen. Om deze reden zullen toepassingen van vroegdiagnostiek met name in het verschiep liggen voor carcinomen, die zodanig gelokaliseerd zijn, dat tumorcellen vrij eenvoudig in excreten, secreten of lichaamsvloeistoffen terecht komen. Hierbij kan worden gedacht aan: (i) tumoren van klieren of organen (speekselklier-tumor → speeksel; pancreastumor → pancreassap) en (ii) epitheliale tumoren waarbij tumorcellen terechtkomen in de tractus digestivus (tumoren in hoofdhalshals gebied → speeksel; colorectaal tumor → faeces), tractus urogenitalis (blaaskanker → urine) of tractus respiratorius (longkanker → speeksel).

Genetische afwijkingen in tumoren

Van diverse tumoren breekt momenteel het besef door dat hun ontstaan het gevolg is van een combinatie van erfelijke aanleg en omgevingsfactoren. Bij de erfelijke component wordt een gemuteerd allel geërfd via één van de ouders. Alle lichaamcellen bezitten in dat geval de betreffende mutatie. Deze erfelijke vormen van kanker vinden hun oorsprong in mutaties in de geslachtscellen (zogenaamde "germ-line"-mutaties) van één van de voorouders. Behalve de erfelijke component zijn er ook omgevingsfactoren zoals ultraviolet straling, chemische stoffen en virussen die kunnen leiden tot mutaties. Deze verworven mutaties (beter bekend als somatische mutaties) vinden lokaal plaats en kunnen niet worden doorgegeven aan de volgende generatie. Het erven van één gemuteerd allel of het ontstaan van één somatische mutatie is niet voldoende om een normale cel in tumorcel te veranderen. De oncogenese dient namelijk gezien te worden als een meerstapsproces waarbij een accumulatie van genetische defecten noodzakelijk is voor het ontwikkelen van tumoren. Dit laatste betekent uiter-

Afdeling Klinische Chemie, Academisch Ziekenhuis Leiden¹ en Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium, Academisch Ziekenhuis, St. Radboud, Nijmegen²

Correspondentie: Dr. C. van de Water, Afdeling Klinische Chemie (CKCL), Gebouw-1, E-2-P, Academisch Ziekenhuis Leiden, Rijnsburgerweg 10, 2333 AA Leiden.
Ingekomen: 09.10.95

aard wel dat bij personen die al een erfelijke aanleg voor tumor-ontwikkeling hebben, somatische mutaties eerder zullen resulteren in tumorvorming in vergelijking met personen die erfelijk onbelast zijn. Tot nu toe wordt ervan uitgegaan dat bij het ontstaan van tumoren meestal somatische mutaties een rol spelen. Meer en meer genen worden echter ontdekt die de erfelijke component van het ontstaan van tumoren illustreren, bijvoorbeeld bij borstkanker het BRCA1 (4) en BRCA2 (5).

De genetische veranderingen in tumoren als gevolg van erfelijke aanleg en omgevingsfactoren betreffen twee typen genen, namelijk de proto-oncogenen en tumorsuppressorgenen. Beide typen genen hebben normaliter een functie als regulator van celgroei en celdifferentiatie. Deze regulatie-functie van proto-oncogenen en tumorsuppressorgenen kan zich afspelen op celmembraanniveau (genproducten die coderen voor groeifactoren en hun receptoren), cytoplasma-niveau (genproducten die coderen voor intracellulaire boodschappermolekulen) en op kernniveau (genproducten die coderen voor transcriptiefactoren of celcyclusregulerende eiwitten). Proto-oncogenen hebben normaliter een stimulerend effect op de celgroei of celoverleving, of een remmend effect op geprogrammeerde celdood of apoptose, terwijl tumorsuppressorgenen juist een celgroei-remmend effect vertonen. Proto-oncogenen kunnen als gevolg van mutaties gedereguleerd raken, hetgeen kan resulteren in de productie van afwijkende eiwitten met transformerende eigenschappen. De "ontspoorde" proto-oncogenen worden in de literatuur als oncogenen aangeduid. Specifieke mutaties in tumorsuppressorgenen kunnen leiden tot het wegvallen van celdeling- en celgroei-remmende componenten waardoor cellen zich kunnen gaan onttrekken aan het complexe groei-regulatiesysteem. De celgroei wordt hierdoor autonoom en onafhankelijk van groei-remmende signalen uit de omgeving. Veranderingen in het genoom, die het gebalanceerde samenspel tussen proto-oncogenen en tumorsuppressorgenen in celgroei en -differentiatie verstoren, liggen dus aan de basis van de tumorvorming (6).

De typen veranderingen in het genoom, die verantwoordelijk kunnen zijn voor activatie van proto-oncogenen en inactivatie van tumorsuppressorgenen, zijn: (i) translocaties, (ii) amplificaties, (iii) inserties, (iv) deleties, (v) puntmutaties en (vi) genomische instabiliteit als gevolg van een defect "DNA-repair"-mechanisme.

Bij verreweg de meeste maligniteiten is sprake van activatie van proto-oncogenen als gevolg van somatische puntmutatie(s) of inactivatie van tumorsuppressorgenen als gevolg van deletie(s) en/of somatische puntmutaties. Dat in kwantitatief opzicht deleties en somatische puntmutaties de belangrijkste bijdrage leveren aan maligne transformaties, betekent niet dat de overige typen mutaties (translocaties, amplificaties en inserties) geen essentiële rol kunnen spelen bij zowel de ontwikkeling als de diagnostiek van tumoren (7). De translocaties bij maligne ziekteprocessen zoals Burkitt-lymfoom [t8;14] en chronische myeloïde leukemie [t9;22], evenals amplificaties van het erb

B-2(neu)-oncogen bij mammacarcinoom en het N-myc-oncogen bij neuroblastomen zijn hiervan een bewijs.

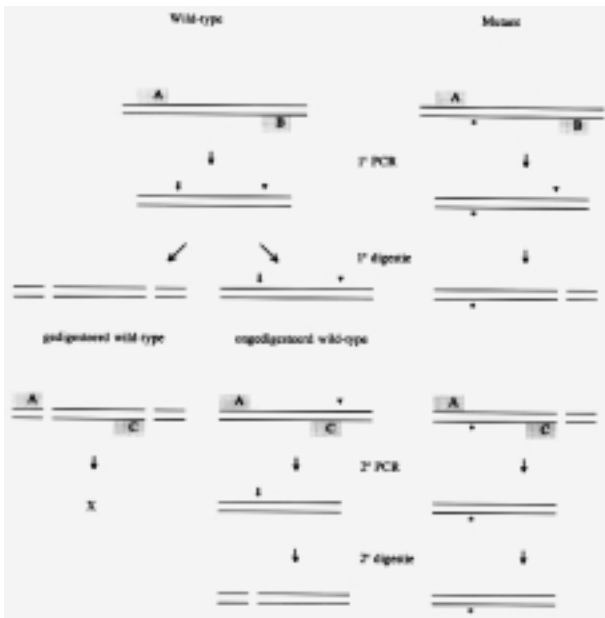
Behalve mutaties in de proto-oncogenen en tumorsuppressorgenen kunnen bij een aantal tumoren waaronder het colorectumcarcinoom ook defecten in het "DNA-repair"-mechanisme ten grondslag liggen aan de tumorogenese. Een defect in dit "repair"-mechanisme kan behalve clonale expansie van cellen die mutaties in een tumorsuppressorgen en/of proto-oncogen hebben ondergaan, ook veranderingen geven in microsatellieten (repeterende eenheden van korte DNA sequenties) en leiden tot de zogenaamde microsatelliet-instabiliteit. Het gebruik van microsatelliet-instabiliteit als merker bij de vroegdiagnostiek van tumoren (8,9) wordt in dit overzicht verder buiten beschouwing gelaten.

Puntmutaties treden zowel op in proto-oncogenen als in tumorsuppressorgenen (10). Somatische puntmutaties van het p53-tumorsuppressorgen, dat gelokaliseerd is op chromosoom 17p, zijn de meest voorkomende genetische veranderingen in humane tumoren (11). Het eiwitproduct van het p53-suppressorgen fungeert als regulator in de celcyclus. Via een specifieke DNA bindingscapaciteit remt dit eiwit de DNA synthese en vertraagt daarmee de celdeling. Mutaties ontregelen deze remming, met als gevolg een verhoogde proliferatieve activiteit. Binnen de groep van de oncogene puntmutaties wordt echter in de literatuur de meeste aandacht besteed aan de ras-genen (c-K-ras, c-H-ras en N-ras). Deze genen coderen voor membraangebonden eiwitten met intrinsieke GTP-ase-activiteit. Als gevolg van oncogene puntmutaties van ras-genen vindt er een voortdurende intracellulaire signaaloverdracht plaats, hetgeen resulteert in een verhoogde proliferatieve activiteit van deze cel.

Detectie van puntmutaties

De introductie van in-vitro enzymatische technieken zoals de polymerase kettingreactie (PCR) en ligase kettingreactie (LCR) hebben de opsporing van puntmutaties aanzienlijk vereenvoudigd. Met name de PCR heeft zijn intrede gedaan bij de detectie van puntmutaties. Er zijn vele PCR-varianten voor het detecteren van puntmutaties beschreven (10,12). De meeste zijn echter niet geschikt voor de detectie van puntmutaties tegen een sterke achtergrond van normale cellen. Enkele detectie-methoden kunnen hiervoor wel worden gebruikt, waaronder clonering gevolgd door hybridisatie met allel specifieke gelabelde oligonucleotiden (ASO), de allelspecifieke amplificatie (ASA, ook bekend als "mismatch PCR" en "mutation specific PCR assay") (13-15) en de "mutant enriched"-amplificatie (16,17). Deze methodieken zijn alleen toepasbaar in de diagnostiek wanneer de mutaties bekend zijn en op enkele plaatsen in het gen zijn geconcentreerd, zoals in het geval van K-ras-mutaties. Detectie van mutaties die verspreid liggen over het gen, zoals in het geval van p53-mutaties, is voornamelijk gecompliceerd en daarom ongeschikt voor diagnostische doeleinden (18).

Voor clonering van het (deel van het) gen waarin men geïnteresseerd is kan gebruik gemaakt worden van



Figuur 1 "Mutant-enriched" PCR-amplificatie. Met behulp van primers A en B wordt een eerste PCR uitgevoerd. Hierbij is primer A een "mismatch primer" die zodanig is gekozen, dat alleen in het wild-type allel een restrictieplaats (†) wordt gegenereerd. De aanwezige mutatie (*) in het mutant-allel is hierbij cruciaal, omdat deze de introductie van een restrictieplaats juist blokkeert. Primer B zorgt voor de introductie van een controle-restrictieplaats (▼) in zowel wild-type als mutant. Tijdens incubatie met het restrictie-enzym (1^e digestie) blijft de mutant-sequentie intact en wordt de wild-type-sequentie voor het grootste deel gesplitst. Na de 1^e digestie wordt een 2^e PCR uitgevoerd waarbij gebruik wordt gemaakt van dezelfde primer A en van een nieuwe primer C. Primer C hybridiseert aan de 5'-kant van de restrictieplaats die door primer B is geïntroduceerd. Door bij de 2^e PCR opnieuw gebruik te maken van primer A wordt specifiek het PCR-product van de mutant geamplificeerd. De mate van specificiteit wordt bepaald door de efficiëntie van de restrictie-enzym behandeling. Onvollende digestie van de door primer A geïntroduceerde restrictieplaats (†) gaat ten koste van de specificiteit omdat ongedigeteerde wild-type-PCR-producten tijdens de 2^e PCR-procedure ook worden geamplificeerd. Onvollende digestie van de controle-restrictieplaats is niet van belang omdat deze de 2^e PCR niet beïnvloedt. Om onderscheid te kunnen maken tussen het mutant PCR-product en het wild-type-PCR-product na de 2^e PCR-procedure wordt opnieuw een digestie met het betreffende restrictie-enzym uitgevoerd (= 2^e digestie). De uiteindelijk verkregen PCR-producten van wild-type en mutant verschillen in lengte en kunnen met behulp van agarose-gel-elektroforese van elkaar worden onderscheiden.

een bacteriofaagvector. Het in eerste instantie met behulp van PCR geamplificeerde DNA wordt daarbij middels bacteriofaagclonering verder geamplificeerd. Na blotting van het DNA van de individuele plaques wordt hybridisatie uitgevoerd met mutant-specifieke (radio-actief) gelabelde oligonucleotiden. Deze methode is gevoelig met een detectiegrens van ongeveer 1 mutant cel per 5000 normale cellen maar is te bewerkelijk voor diagnostiek in een klinisch-chemisch laboratorium. De hieronder beschreven allerspecifieke en "mutant enriched" amplificatie zijn relatief eenvoudig en in principe wel geschikt voor de diagnostiek.

In het geval van allel specifieke amplificatie worden primers gebruikt die volledig complementair zijn met

het DNA-fragment dat de betreffende mutatie bezit (13-15). Onder optimale PCR-condities vindt dan alleen hybridisatie plaats als de betreffende mutatie aanwezig is. De normale "wild-type"-sequentie wordt dus niet opgepikt.

De "mutant-enriched PCR"-amplificatie is een 2-staps PCR-procedure die gebaseerd is op specifieke digestie van het wild-type DNA (16,17). Op deze wijze kan zonder gebruik te maken van mutant-specifieke primers toch een specifieke amplificatie van de mutant-sequentie worden verkregen. De in de literatuur beschreven sensitiviteit varieert van 0,01% tot 0,2% (16,17). Het principe van de "mutant-enriched PCR"-procedure staat schematisch weergegeven in figuur 1.

Overigens kunnen technieken voor het detecteren van puntmutaties ook te gevoelig zijn (19,20). Bij testen waarmee zeer zeldzame puntmutaties kunnen worden opgespoord ($< 1:10^6$ cellen) wordt al een positief testresultaat gevonden in het stadium voorafgaand aan clonale expansie. In die fase is nog geen sprake van een "early stage" tumor en kan dus ook geen klinische interventie plaatsvinden. Op de problematiek betreffende het voorkomen van tumorgeassocieerde puntmutaties in een zodanig gering aantal cellen dat dit ook voorkomt in "normale populaties" wordt later ingegaan. Fout-positieve resultaten van de test kunnen worden voorkomen door negatieve controles (cellijnen, non-neoplastisch weefsel) mee te nemen en de bepaling in duplo te verrichten.

Screenen op tumoren?!

Dankzij de eerdergenoemde ontwikkelingen in de moleculaire biologie zijn de vermelde, zeer gevoelige methodieken voor het detecteren van puntmutaties beschikbaar. Zelfs bij een sterke achtergrond van tumorcellen met normale cellen kunnen puntmutaties in tumorcellen worden gedetecteerd en gekarakteriseerd. Vroegdiagnostiek van tumoren lijkt daarom tot de mogelijkheden te behoren (21-29). Een brede toepasbaarheid van deze nieuwe testen op moleculair niveau bij het screenen van asymptomatische patiënten op tumoren zal echter alleen worden verkregen als gebruik gemaakt wordt van relatief eenvoudig te verkrijgen matrices zoals urine, faeces en speeksel. Het scopiëren en nemen van biopten is in veel gevallen té patiënt-belastend, risicovol en kostbaar om in screeningsprogramma's te worden opgenomen. De recente literatuur die (vroeg)diagnostiek van tumoren als oogmerk heeft, richt zich dan ook op tumoren die zodanig gelokaliseerd zijn dat het vrijkomen van tumorcellen in urine, faeces, speeksel en bloed tijdens het proces van oncogenese onvermijdelijk is. In tabel 1 zijn de in de literatuur beschreven resultaten met betrekking tot de detectie van puntmutaties in urine, faeces, speeksel en pancreassap samengevat. De vermelde referenties kunnen in twee groepen worden ingedeeld:

- Detectie van puntmutaties in materiaal van symptomatische patiënten waarbij de klinische diagnose dus al is gesteld (13-15,18,30-34).
- Detectie van puntmutaties in materiaal van pré-symptomatische patiënten (24,26).

Tabel 1. Detectie van puntmutaties in lichaamsmaterialen (urine, faeces, pancreassap en speeksel) bij (pré-)symptomatische patiënten met solide tumoren

Tumor (ref.)	matrix (methode)	mutatie	sensitiviteit + specificiteit
Blaas-kanker (18)	urine (*)	p53	18 patiënten → bij 11 patiënten kon een p53-mutatie worden aangetoond in de primaire tumor → in 3 van deze 11 patiënten kon de tumor-specifieke p53-mutatie worden aangetoond in urine (de overige 8 patiënten worden verder niet beschreven); mutant-specifieke probes zijn negatief bij een normale (p53-"wild-type")
Blaas-kanker (24)	urine (*)	p53	bij 1 patiënt kon in urine, gedateerd 2 jaar voordat in situ de diagnose blaascarcinoom werd gesteld, een p53-mutatie worden aangetoond die identiek was aan de mutatie in de primaire tumor; de p53-mutatie kon niet worden aangetoond in 'non-neoplastic' weefsel van dezelfde patiënt
Long-kanker (26)	speeksel (*)	p53 + K-ras	15 patiënten: - bij 8 patiënten kon een K-ras-mutatie worden aangetoond in de primaire tumor → in 7 van deze 8 kon in ingevroren speekselmonsters die 1 tot 4 maanden waren verkregen voorafgaand aan de klinische diagnose, dezelfde mutatie worden aangetoond - in 2 gevallen was sprake van een p53-mutatie van de primaire tumor → hierbij kon in 1 geval dezelfde mutatie worden aangetoond in speeksel dat 13 maanden eerder gedateerd was dan de klinische diagnose - in 5 gevallen kon geen mutatie worden aangetoond in primaire tumor en/of speeksel; 5 controle patiënten waren negatief
Long-kanker (13)	speeksel (***)	K-ras	incidentie K-ras-mutatie in primaire tumor ≈10-30% ! 5 patiënten → in 1 geval kon een K-ras-mutatie in speeksel worden aangetoond; er is geen DNA onderzoek verricht aan de primaire tumor; negatieve controles worden niet vermeld
Hoofd-hals-tumoren (31)	speeksel	p53	incidentie p53-mutatie in primaire hoofd-hals tumoren ≈50% in 5 van 7 patiënten met een p53-mutatie in primaire tumor kon de tumor-specifieke p53-mutatie worden aangetoond in speeksel; de niet-tumorspecifieke probes gaven in alle gevallen negatieve uitslagen
Pancreas-carcinoom (32)	faeces (*)	K-ras	incidentie K-ras-mutatie in primaire tumor ≈85% 11 patiënten → bij 6 patiënten kon een K-ras-mutatie in faeces worden aangetoond → in 5 gevallen was deze mutatie identiek aan de K-ras-mutatie gevonden in de primaire tumor; incidentie van K-ras-mutaties in "normale" populatie vereist nader onderzoek
Pancreas-carcinoom (33)	pancreas-sap (**)	K-ras	incidentie K-ras-mutatie in primaire tumor > 95% 9 patiënten → in 6 gevallen kon een K-ras-mutatie in pancreassap worden aangetoond er is geen DNA-onderzoek verricht aan de primaire tumor; sensitiviteit mutatie-detectie > cytodiagnose; K-ras-mutaties konden niet worden aangetoond in pancreassap bij controlegroepen (14 gezonde personen, 10 patiënten met chronische pancreatitis, 3 patiënten met "islet cell" tumor)
Pancreas-carcinoom (15)	pancreas-sap (***)	K-ras	6 patiënten → in alle gevallen kon een K-ras-mutatie worden aangetoond in pancreassap; bij 6 andere patiënten kon in 2 gevallen een K-ras-mutatie worden aangetoond in perifere bloed; er is geen DNA-onderzoek verricht aan de primaire tumor; bij 3 controles (chronische pancreatitis en choledocholithiasis) kon geen K-ras-mutatie worden aangetoond
Colo-rectaal tumor (30)	faeces (*, ***)	K-ras	incidentie K-ras-mutatie in primaire tumor ≈50% 24 patiënten (colo-rectaal tumor of adenocarcinoom > 1cm) → bij 9 patiënten kon een K-ras-mutatie worden aangetoond in de primaire tumor (in totaal 3 verschillende mutaties) → in 8 van de 9 patiënten kon de tumor-specifieke mutatie eveneens worden aangetoond in faeces; bij zowel proximale als distale tumoren zijn K-ras-mutaties in faeces aan te tonen; bij een colo-rectaal tumor van 1.3 cm ³ is de tumor-specifieke K-ras-mutatie al aantoonbaar in faeces; controles (individuen zonder colo-rectale neoplasie + patiënten zonder K-ras-mutatie op codon 12 en 13) waren negatief voor de gebruikte mutant-specifieke probes
Colo-rectaal tumor (34)	faeces (***)	K-ras	incidentie K-ras-mutatie in primaire tumor ≈40-50% 11 patiënten → van 3 patiënten was geen tumorweefsel beschikbaar; bij de overige 8 patiënten kon in 7 gevallen een K-ras-mutatie worden aangetoond in de primaire tumor (in totaal 3 verschillende mutaties) → bij 4 van deze 7 patiënten kon de tumor-specifieke mutatie eveneens worden aangetoond in faeces; controle patiënten waren negatief (aantal?)
Colo-rectaal tumor	faeces (***)	K-ras	incidentie K-ras-mutatie in primaire tumor ≈50% 55 patiënten (adenocarcinoom of adenoom) → bij 19 patiënten kon een K-ras-mutatie worden aangetoond in de primaire tumor → in 10 van deze 19 patiënten kon de tumor-specifieke mutatie eveneens worden aangetoond in faeces; controle patiënten worden niet vermeld

*: PCR → klonering in bacteriofaagvector → hybridisatie met mutant-specifieke ³²P-gelabelde probes → autoradiografie; **: "mutant-enriched" PCR (PCR → enzymbehandeling → PCR → SSCP); ***: "allelic specific amplification" werd uitgevoerd voor 3 verschillende mutaties gevolgd door gelelektroforese; ****: PCR → southern blotting → hybridisatie met mutant specifieke ³²P-gelabelde probes → autoradiografie. De vermelde incidenties van de mutaties in de primaire tumoren zijn geen bevindingen van de auteurs, maar zijn afkomstig uit de door hen aangehaalde literatuurverwijzingen.

Bij de eerste groep heeft men in de meeste gevallen (14,18,30-32,34) de primaire tumor ook aan mutatie-onderzoek onderworpen. Op deze wijze heeft men geprobeerd de puntmutatie-detectie in de secreten/excreten te correleren aan de primaire tumor. In drie gevallen (13,15,33) is puntmutatie-detectie van de primaire tumor niet uitgevoerd en heeft men volstaan met puntmutatie-detectie in patiëntenmateriaal.

Bij de detectie van puntmutaties bij pré-symptomatische patiënten (24,26) had men, naast een biopsie van de primaire tumor, ook de beschikking over materiaal van de patiënt in het pre-symptomatische stadium. Hruban et al. (24) beschrijven een patiënt met blaaskanker waarbij in urine, gedateerd 2 jaar voordat de diagnose blaascarcinoom werd gesteld, een p53-mutatie kon worden aangetoond die identiek was aan de mutatie in de primaire tumor. Mao et al. (26) beschrijven 15 patiënten met longkanker waarbij in 10 gevallen een K-ras- of p53-mutatie kon worden aangetoond in de primaire tumor. In 8 van deze 10 gevallen kon dezelfde mutatie worden aangetoond in speeksel dat 1 tot 13 maanden eerder was gedateerd dan de klinische diagnose. De tot nu toe verkregen resultaten bij pré-symptomatische patiënten zijn hoopgevend, maar de schaarste aan patiëntenmateriaal, dat is verzameld voordat de tumor klinisch kon worden gediagnostiseerd, verhindert echter een concrete uitspraak over de perspectieven die puntmutatie-detectie biedt met betrekking tot vroegdiagnostiek van carcinomen.

De gevoeligheid van de moleculair diagnostische testen met betrekking tot de vroegdiagnostiek van carcinomen wordt bepaald door diverse factoren: (i) de sensitiviteit van de test in het laboratorium, (ii) de lokalisatie van de tumor (14), (iii) de efficiëntie waarmee "shedding" van tumorcellen in de te onderzoeken matrix (urine, faeces, speeksel, e.d.) optreedt, (iv) de incidentie van de betreffende mutatie in de primaire tumor, (v) het tijdstip in de carcinogenese waarop de betreffende mutatie ontstaat, (vi) de efficiëntie waarmee DNA kan worden geïsoleerd uit het betreffende excreet/secret, en (vii) de productiesnelheid van het betreffende excreet/secret. Men moet zich hierbij realiseren dat de punten (iv) en (v) strijdig met elkaar kunnen zijn: de mutatie met de hoogste incidentie in de primaire tumor is niet per definitie een mutatie die in een vroeg stadium van de carcinogenese ontstaat. Het onvoldoende zuiveren van DNA uit het excreet/secret (punt vi) kan leiden tot problemen bij de PCR-amplificatie. Uit de literatuur blijkt dat fout-negatieve uitslagen in een aantal gevallen worden toegeschreven aan remmers van de PCR afkomstig uit het betreffende excreet/secret (14). Daarnaast kan de kwaliteit van het DNA in het secret (ondermeer fragmentlengte) de detectie van puntmutaties bemoeilijken.

De literatuur betreffende vroegdiagnostiek van tumoren via puntmutatie-detectie beperkt zich tot mutaties in twee genen, namelijk het p53-tumorsuppressorgen en het K-ras-oncogen. De hoge mutatie-incidentie in deze genen bij veel tumoren en de grote beschikbare kennis over het p53- en K-ras-gen zijn ongetwijfeld de belangrijkste beweegredenen geweest om deze ge-

nen als uitgangspunt te nemen voor onderzoek naar (vroeg)diagnostiek van carcinomen. Het tijdstip in de carcinogenese waarop de betreffende mutatie ontstaat is echter een aspect dat in de literatuur enigszins onderbelicht blijft.

De in tabel 1 samengevatte literatuur vermeldt voor zover onderzocht de afwezigheid van fout-positieve uitslagen bij controle-patiënten. Een hoge specificiteit lijkt hierdoor gewaarborgd. Voor harde uitspraken betreffende de specificiteit dient echter eerst inzicht te worden verkregen in de incidentie van het voorkomen van de betreffende mutaties in (i) andere typen tumoren, en (ii) "normale" populaties. Voor het p53-tumorsuppressorgen is door Hollstein et al. (35) de lokatie en de aard van de mutaties bij een groot aantal tumoren (solide tumoren, lymfomen en leukemieën) in kaart gebracht. De p53-mutatie-spectra die op deze wijze voor de verschillende typen tumoren werden verkregen, zijn duidelijk verschillend. Hieruit zou mogen worden geconcludeerd dat aard en lokalisatie van de p53-mutaties gerelateerd zijn aan een bepaald tumor-type. Er bestaat echter een grote overlap in p53-mutaties tussen de verschillende typen tumoren. Hierdoor is het in de praktijk niet mogelijk om p53-mutaties te selecteren die volledig specifiek zijn voor één bepaald tumor-type. Daarnaast is het de vraag of de incidentie van het voorkomen van de spaarzame p53-mutaties die wel bij één tumor-type zijn aangetoond, en dus mogelijk tumor-specifiek zijn, hoog genoeg is om als bruikbare tumormerker te fungeren. Over de incidentie van mutaties in "normale" populaties is weinig bekend. Wel is met behulp van dier-experimenteel onderzoek aangetoond dat de aanwezigheid van mutaties in het K-ras-oncogen niet noodzakelijkerwijs resulteert in tumor-ontwikkeling (20), hetgeen past in het huidige inzicht dat de carcinogenese opgevat moet worden als een meerstapsmutatieproces. Het feit, dat tumorvorming het gevolg is van een accumulatie van genetische veranderingen, betekent, dat op theoretische gronden mag worden verondersteld, dat een bepaalde mutatie waarop wordt gescreend ook in "normale" cellen kan voorkomen. Immers, een mutatie zal alleen tot tumorvorming leiden als in de betreffende cel andere prédisponerende factoren met betrekking tot tumorvorming aanwezig zijn. Als deze prédisponerende factoren afwezig zijn, zal er als gevolg van de somatische mutatie geen maligniteit ontstaan. In het laatste geval brengt het screenen op deze ene puntmutatie wel het risico van het genereren van fout-positieve uitslagen met zich mee. Dit risico wordt groter naarmate de sensitiviteit van de test verder toeneemt. Juist met de zeer geavanceerde en gevoelige PCR-technieken kan dit een reëel probleem zijn. Opmerkelijk is dat in de literatuur weinig melding wordt gemaakt van dit fenomeen. De literatuur die handelt over p53-mutaties laat zien dat in het materiaal van controle-individueen alleen "wild-type"-sequenties kunnen worden aangetoond (35). Om meer inzicht te verkrijgen in de specificiteit dient de frequentie van mutaties in proto-oncogenen en tumorsuppressorgen in gezonde humane populaties als functie van leeftijd, blootstelling, e.d., te worden vastgesteld (36).

Het feit dat puntmutaties in proto-oncogenen en tumorsuppressorgenen eerder tumorgerelateerd dan tumorspecifiek zijn, zou de suggestie kunnen wekken dat het screenen op carcinomen met behulp van puntmutatie-detectie zinloos is vanwege een te geringe specificiteit. Dit behoeft geenszins het geval te zijn. Enerzijds is het de combinatie van tumortype en de aard van het lichaamsmateriaal waarop wordt gescreend, waardoor al een zekere specificiteit in de procedure wordt geïntroduceerd. Alleen al vanwege de tumorlokalisatie is het onwaarschijnlijk dat bijvoorbeeld bij het detecteren van p53-mutanten in speeksel in het kader van screenen op longkanker, een fout-positieve uitslag zou ontstaan als gevolg van de aanwezigheid van een blaascarcinoom. Anderzijds zal uitbreiding van de screeningsprocedure naar het detecteren van meerdere puntmutaties (combinatiemutatie-onderzoek) tot de gewenste reductie van het aantal fout-positieven kunnen leiden (27). Hierbij moet worden opgemerkt dat de specificiteit gezocht moet worden in een combinatie van mutaties in proto-oncogenen en tumorsuppressorgenen en niet zozeer in de aard of exacte lokalisatie van een puntmutatie als zodanig (1,10).

Om de perspectieven die puntmutatie-detectie biedt bij de vroegdiagnostiek van carcinomen verder te kunnen staven moet er meer materiaal van pré-symptomatische patiënten beschikbaar komen. Verder zal voor de juiste keuze van de puntmutatie de kennis van de pathogenese, met name wat betreft de genetische veranderingen die gerelateerd zijn aan bepaalde stadia in de carcinogenese, verder moeten toenemen. Een terrein waarop op dit moment al zeer veel moleculair genetische aanknopingspunten aanwezig zijn, is de colorectale carcinogenese. De tumorprogressie van het colorectumcarcinoom blijkt in een aantal stadia te kunnen worden onderscheiden, de zogenaamde adenoom-carcinoom-sequentie. Recent is gebleken dat deze stadia behalve door karakteristieke veranderingen op weefselniveau ook worden gekenmerkt door een reeks van moleculair genetische afwijkingen (37-39). Dankzij deze kennis kunnen PCR-methodieken vrij snel worden opgezet en kan een verantwoorde keuze van moleculairgenetische merker(s) worden gemaakt. Daarnaast is juist voor het colorectumcarcinoom een grote behoefte aan vroegdiagnostiek. Hiervoor zijn twee redenen aan te geven: (i) het colorectumcarcinoom vormt de tweede meest frequente doodsoorzaak ten gevolge van maligniteiten in de westerse wereld, en (ii) resectie van het colorectumcarcinoom in een vroegtijdig stadium verlaagt zowel de morbiditeit als mortaliteit. Studies hebben uitgewezen dat verwijdering in het adenoomstadium leidt tot een reductie in tumor-incidentie met 76-90% (37). Behalve dat puntmutatie-detectie perspectieven biedt voor vroegdiagnostiek van carcinomen (40) kan het ook als hulpmiddel worden gebruikt bij de stadiëring van tumoren. Het zal duidelijk zijn dat het vaststellen van het tumorstadium zowel prognostische als therapeutische consequenties heeft voor de patiënt. Voor het colorectumcarcinoom is aangetoond dat zowel het type als het aantal K-ras-mutaties gerelateerd zijn aan de stadiëring van de tumor (41).

Dankzij de moleculaire biologie zullen ook de inzichten in pathogenese en carcinogenese van andere tumoren dan het colorectumcarcinoom toenemen. Deze ontwikkeling kan de introductie van moleculair diagnostische testen op het terrein van de vroegdiagnostiek versnellen. Verder zal de opmars van vrij eenvoudige maar tevens meer geavanceerde PCR-technieken (zoals de "mutant-enriched PCR") ertoe bijdragen dat vroegdiagnostiek van carcinomen toegankelijk wordt voor steeds meer laboratoria. Het gebruik van puntmutaties als tumormerker in de vroegdiagnostiek van carcinomen lijkt dan ook een realistisch toekomstbeeld. Het klinisch-chemisch beroepenveld zal zich qua kennis en faciliteiten hierop moeten voorbereiden.

Literatuur

1. Bootsma AH, Cornelisse CJ, Klein A de. Oncogenen, tumorsuppressiegenen en de medische genetica van kanker. *Ned Tijdschr Geneesk* 1992; 136: 1009-1013.
2. Offerhaus GJA, Baas IO. Moleculair-genetische aanknopingspunten voor preventie en behandeling van colorectumcarcinoom. *Ned Tijdschr Geneesk* 1994; 138: 561-564.
3. 't Veer LJ van. Molecular aspects of colon cancer. *Tijdschr NVKC* 1994; 19: 7-8.
4. Chen Y, Chen C, Riley DJ, Allred DC, Chen P, Von Hoff D, Osborne CK et al. Aberrant subcellular localization of BRCA1 in breast cancer. *Science* 1995; 270: 789-791.
5. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 1995; 378: 789-792.
6. Coleman WB, Tsongalis GJ. Multiple mechanisms account for genomic instability and molecular mutation in neoplastic transformation. *Clin Chem* 1995; 41: 644-657.
7. Geurts van Kessel A. Detectie van chromosomale afwijkingen die betrokken zijn bij de ontwikkeling van humane maligne ziekteprocessen. *Tijdschr NVKC* 1994; 19: 235-236.
8. Mao L, Lee DJ, Tockman MS, Erozan YS, Askin F, Sidransky D. Microsatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9871-9875.
9. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260: 816-819.
10. Perucho M. PCR and cancer diagnostics: Detection and characterization of single point mutations in oncogenes and antioncogenes. In: Polymerase chain reaction, Mullis KB, Ferre F, Gibbs RA, ed., Birkhauser Boston, USA, 1994; 369-394.
11. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 4855-4878.
12. van Mansfeld ADM, Bos JL. PCR-based approaches for detection of mutated ras genes. *PCR Methods Applic* 1992; 1: 211-216.
13. Takeda S, Ichii S, Nakamura Y. Detection of K-ras mutation in sputum by mutant-allele-specific amplification (MASA). *Hum Mut* 1993; 2: 112-117.
14. Hasegawa Y, Takeda S, Ichii S, Koizumi K, Maruyama M, Fujii A, Ohta H et al. Detection of K-ras mutations in DNAs isolated from feces of patients with colorectal tumors by mutant-allele-specific amplification (MASA). *Oncogene* 1995; 10:1441-1445.
15. Tada M, Omata M, Kawai S, Saisho H, Ohto M, Saiki RK, Sninsky JJ. Detection of ras gene mutations in pancreatic juice and peripheral blood of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 1993; 53: 2472-2474.

16. Kahn SM, Jiang W, Culbertson TA, Weinstein B, Williams GM, Tomita N, Ronai Z. Rapid and sensitive non-radioactive detection of mutant K-ras genes via enriched PCR amplification. *Oncogene* 1991; 6: 1079-1083.
17. Levi S, Urbano-Ispizua S, Gill R, Thomas DM, Gilbertson J, Foster C. Multiple K-ras codon 12 mutations in cholangiocarcinomas demonstrated with a sensitive polymerase chain reaction technique. *Cancer Res* 1991; 51: 3497-3502.
18. Sidransky D, von Eschenbach A, Tsai YC, Jones P, Summerhayes I, Marshall F, Paul M et al. Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* 1991; 252:706-709.
19. Aguilar F, Harris CC, Sun T, Hollstein M, Cerutti P. Geographic variation of p53 mutational profile in nonmalignant human liver. *Science* 1994; 264: 1317-1319.
20. Ronai Z. Ras oncogenes detection in pre-neoplastic lesions: possible applications for diagnosis and prevention. *Oncol Res* 1992; 4: 45-48.
21. Mao L, Sidransky D. Cancer screening based on genetic alterations in human tumors. *Cancer Res (Suppl)* 1994; 54: 1939s-1940s.
22. Sidransky D. Molecular screening - How long can we afford to wait? *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 955-956.
23. Sidransky D, Boyle J, Koch W. Molecular Screening, prospects for a new approach. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993; 119: 1187-1190.
24. Hruban RH, Riet P van der, Erozan YS, Sidransky D. Brief report: Molecular biology and the early detection of carcinoma of the bladder - the case of Hubert H. Humphrey. *N Engl J Med* 1994; 330: 1276-1278.
25. Sidransky D. Screening for clonal genetic alterations. *Eur J Cancer* 1995; 31A: 1127-1129.
26. Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Tockman M, Sidransky D. Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 1634-1637.
27. Anonymous. Screening for colorectal cancer by stool DNA analysis. *Lancet* 1992; 339: 1141-1142.
28. Duffy MJ. Can molecular markers now be used for early diagnosis of malignancy? *Clin Chem* 1995; 41: 1410-1413.
29. Offerhaus GJA, Slebos RJC. Moleculair-genetische detectie van colorectumcarcinoom in de faeces. *Ned Tijdschr Geneesk* 1995; 139: 2714-2715.
30. Sidransky 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.
31. Boyle JO, Mao L, Brennan JA, Koch WM, Eisele DW, Saunders JR, Sidransky D. Gene mutations in saliva as molecular markers for head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Surg* 1994; 168: 429-432.
32. Caldas C, Hahn SA, Hruban RH, Redston MS, Yeo CJ, Kern SE. Detection of K-ras mutations in the stool of patients with pancreatic adenocarcinoma and pancreatic ductal hyperplasia. *Cancer Res* 1994; 54: 3568-3573.
33. Kondo H, Sugano K, Fukayama N, Kyogoku A, Nose H, Shimada K, Ohkura H, Ohtsu A, Yoshida S, Shimosato Y. Detection of point mutations in the K-ras oncogene at codon 12 in pure pancreatic juice for diagnosis of pancreatic carcinoma. *Cancer* 1994; 73: 1589-1594.
34. Smith-Ravin J, England J, Talbot IC, Bodmer W. Detection of c-Ki-ras mutation in faecal samples from sporadic colorectal cancer patients. *Gut* 1995; 36: 81-86.
35. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253: 49-53.
36. Zarbl H. Molecular tools for early detection of cancer: specificity, sensitivity and epidemiological consideration, In: Early detection of cancer, molecular markers, Srivastava S, Lippman SM, Hong WK, Mulshine JL (eds), Futura Publishing Company Inc., New York, 1994: 63-68.
37. Toribara NW, Slesinger MH. Screening for colorectal cancer. *N Engl J Med* 1995; 332: 861-867.
38. Vogelstein B, Fearon ER, Stanley BA, Hamilton R, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319: 525-532.
39. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767.
40. Blum HE. Colorectal cancer: future population screening for early colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1995; 31A: 1369-1372.
41. Moerkerk P, Arends JW, Driel M van, Bruïne A de, Goeij A de, Kate J ten. Type and number of Ki-ras point mutations relate to stage of human colorectal cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 3376-3378.

Summary

Early detection of cancer using point-mutation-detection: a realistic or fictive futuristic view? Water C van de, Swinkels DW and Sturk A. Ned Tijdschr Klin Chem 1996; 21: 132-138.

In this review the use of point-mutations in oncogenes and tumoursuppressorgenes as tumourmarkers will be discussed. As a result of the developments in molecular biology, our knowledge of the pathogenesis of tumours has increased considerably. Presently, a large number of changes in the genetic material especially point-mutations, with both an early occurrence during carcinogenesis and a high tumour-incidence, have been described. Furthermore, using recently developed PCR-techniques, tumour-specific point-mutations can be detected in samples which are highly contaminated with "normal" cells. This provides new perspectives for the development of screening procedures focussed on the detection of point-mutations in matrices such as urine, faeces and saliva. On the basis of recent literature we demonstrate that actual applications of point-mutation detection in early diagnosis of cancer is a realistic concept in the near future.

Key-words: point-mutation; early diagnosis; carcinoma