

Cell-free circulating DNA as a biomarker of several human diseases

Sergey Chasovskikh, M.D., Ph.D.

**Lombardi Comprehensive Cancer Center
Georgetown University
Washington, DC**



Cell-free DNA concentration in the normal= 0-50 ng/ml, 60–100 bp fragments

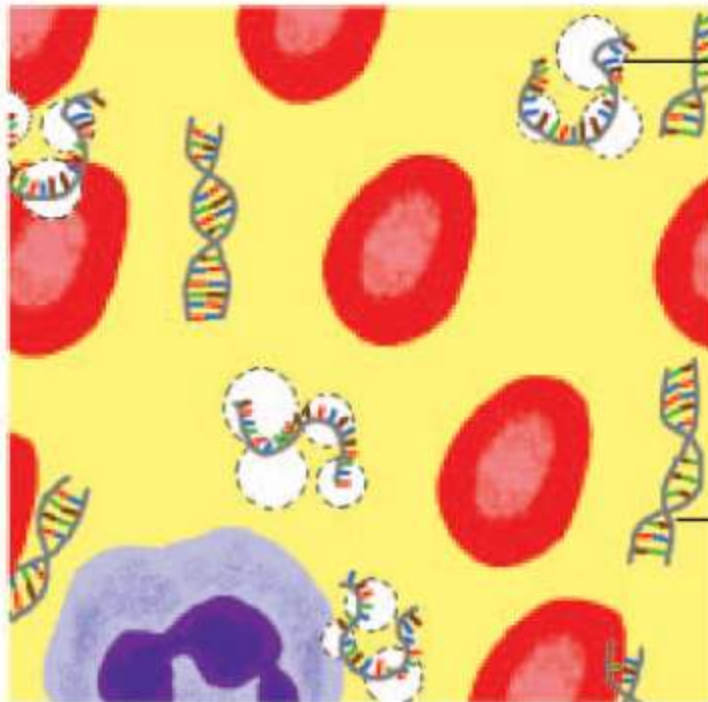
The increased levels of plasma cfDNA have been reported in a number of clinical disorders like
cancer,
stroke,
trauma,
myocardial
infarction,
autoimmune disorders,
pregnancy-associated complications.

Pregnant Women

Cancer Patients

Trauma Patients

Transplanted Patients



**Particle-associated
Cell-free RNA**

- **Apoptosis/ Necrosis**
- **Active Release**
- **Lysis of Circulating Cells**

**Cell-free DNA of
different sizes**

Mechanisms of release of cell-free DNA into circulation

Necrosis

Apoptosis

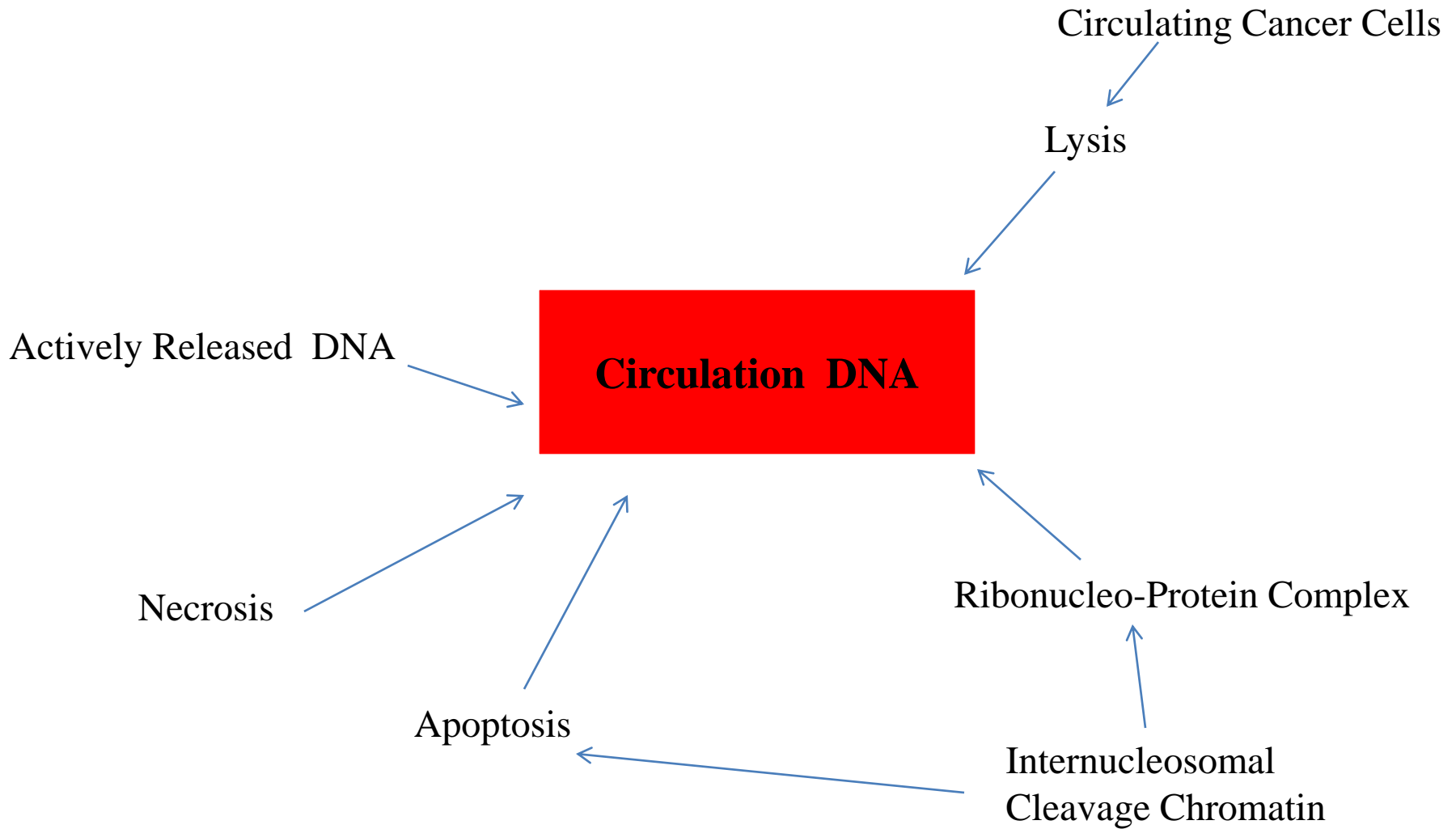
Actively Released DNA
from cells

In healthy individuals, the concentration of circulating DNA is low, because dead cells are removed efficiently from circulation by phagocytes. Circulating DNA has a short half life (10 to 15 minutes) and is removed mainly by the liver. Accumulation of DNA in the circulation can result from an excessive release of DNA caused by massive cell death, inefficient removal of the dead cells or a combination of both.

In various diseases, such as cancer, autoimmune disease, sepsis or myocardial infarction, elevated levels of circulating DNA.

Circulating DNA concentrations are elevated early in patients with trauma, stroke, and ACS, and are generally highest in patients with a high risk of death.

Various pathways by which nucleic acids are released into circulation



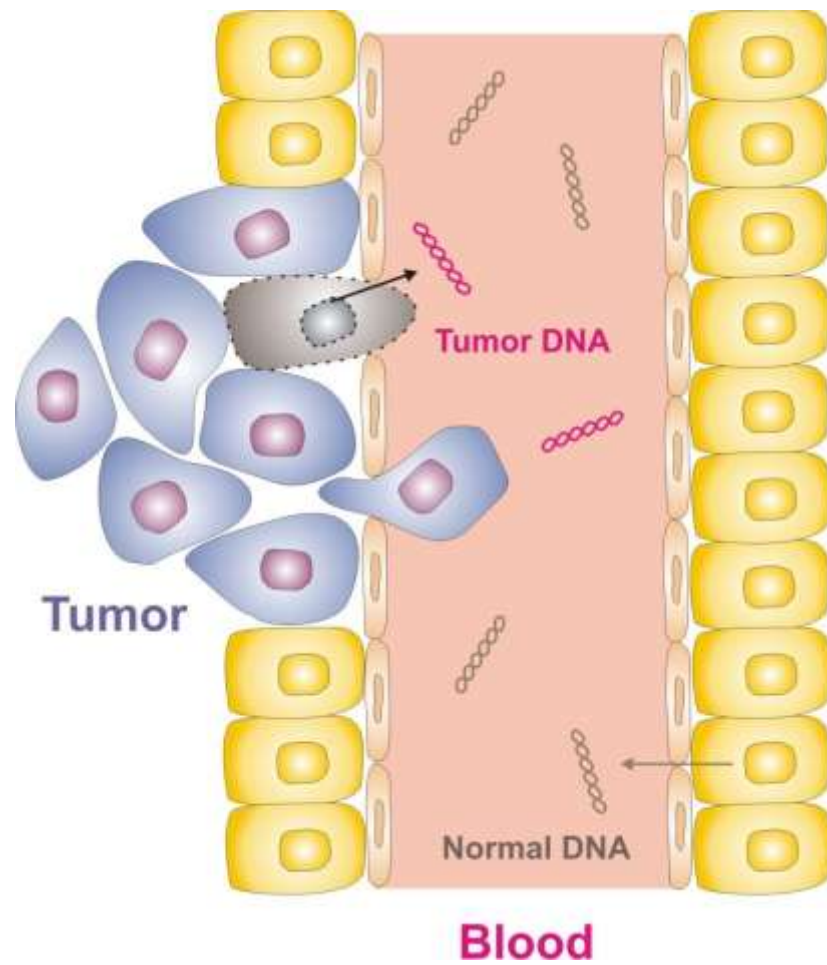
Cancer

Cell-free DNA concentration in the cancer = 50-5000 ng/ml

DNA concentration in plasma can be influenced by tumor stage, size and location

cfDNA concentration and integrity indexes (mean \pm SE) with corresponding p values.

Amplicon size	<u>Melanoma patients</u> (n = 67)	<u>Controls</u> (n = 34)	Probability (P)
67 bp	12.4 \pm 1.4	8.2 \pm 0.9	0.015
180 bp	9.1 \pm 0.9	4.4 \pm 0.7	<0.001
306 bp	2.9 \pm 0.3	1.8 \pm 0.2	0.001
476 bp	1.9 \pm 0.2	1.0 \pm 0.2	0.006
180/67 bp ratio	0.8 \pm 0.05	0.5 \pm 0.04	<0.001
306/67 bp ratio	0.3 \pm 0.03	0.2 \pm 0.02	0.008
476/67 bp ratio	0.2 \pm 0.03	0.1 \pm 0.01	0.002



Genometastasis

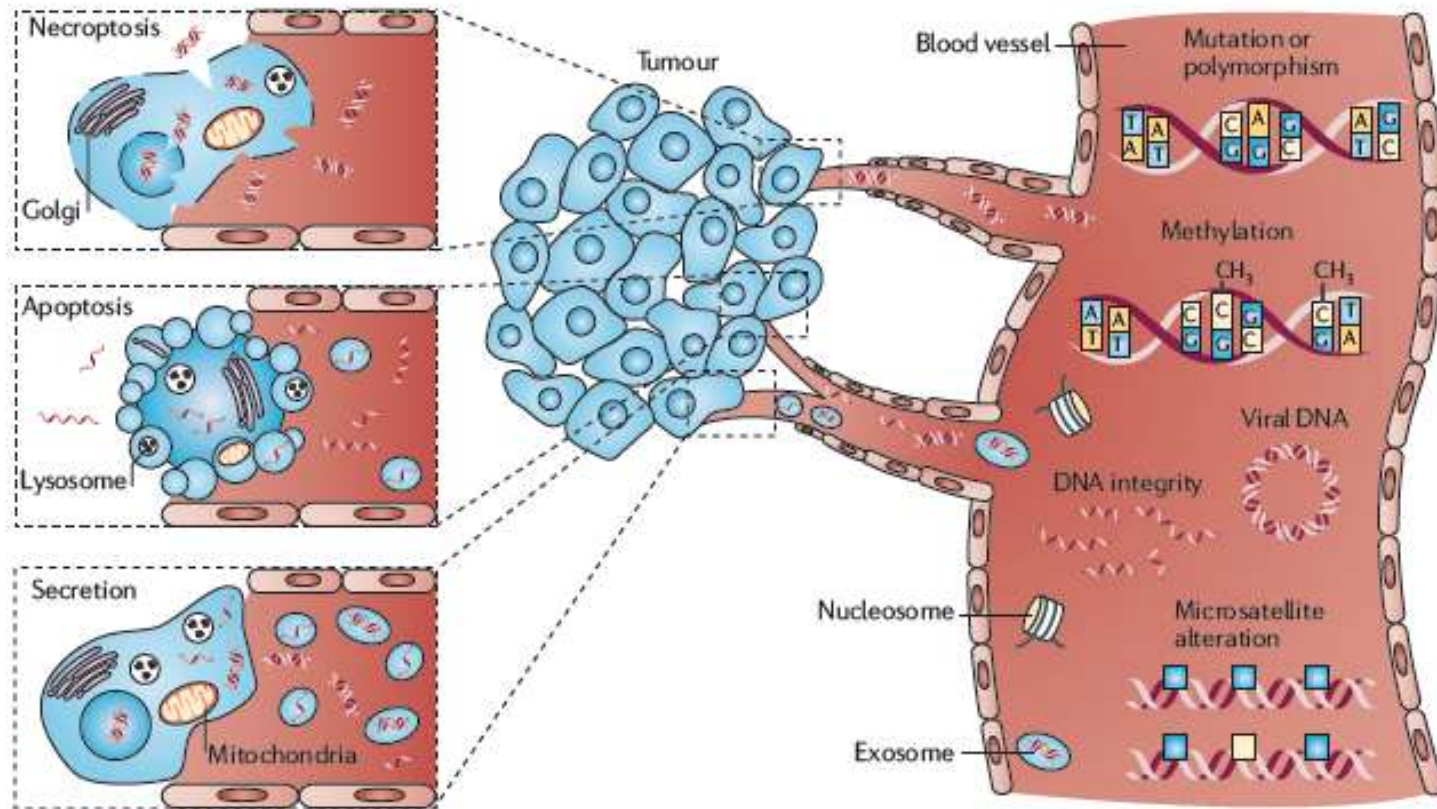


Figure 1 | **Cell-free nucleic acids in the blood.** Mutations, methylation, DNA integrity, microsatellite alterations and viral DNA can be detected in cell-free DNA (cfDNA) in blood. Tumour-related cfDNA, which circulates in the blood of cancer patients, is released by tumour cells in different forms and at different levels. DNA can be shed as both single-stranded and double-stranded DNA. The release of DNA from tumour cells can be through various cell physiological events such as apoptosis, necrosis and secretion. The physiology and rate of release is still not well understood; tumour burden and tumour cell proliferation rate may have a substantial role in these events. Individual tumour types can release more than one form of cfDNA.

Alterations of cfDNA as cancer biomarkers

Concentration of cfDNA in cancer > healthy

High Fragmentation cfDNA

Mutations in oncogenes and tumor suppressor genes

Microsatellite alterations (microsatellite instability and loss of heterozygosity)

Epigenetic alterations (play a role in many cellular processes, including chromatin remodeling, imprinting, gene silencing, X chromosome inactivation and carcinogenesis)

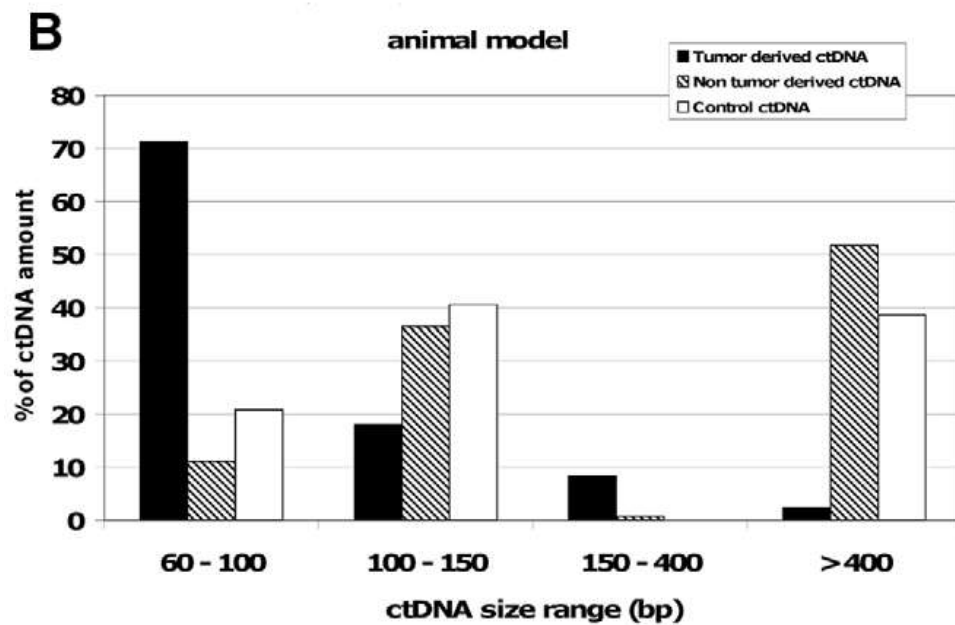
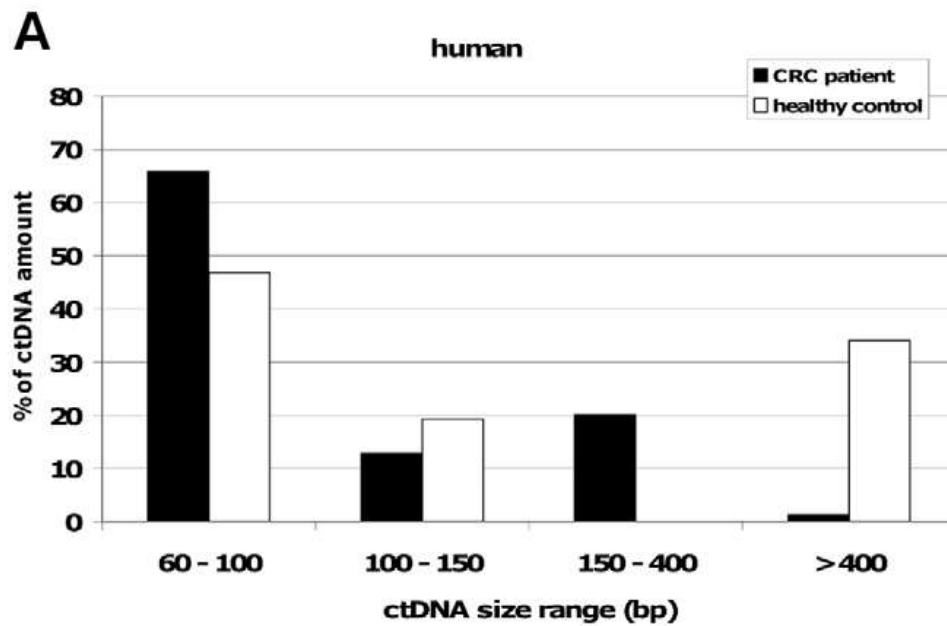
High Fragmentation cfDNA in Cancer

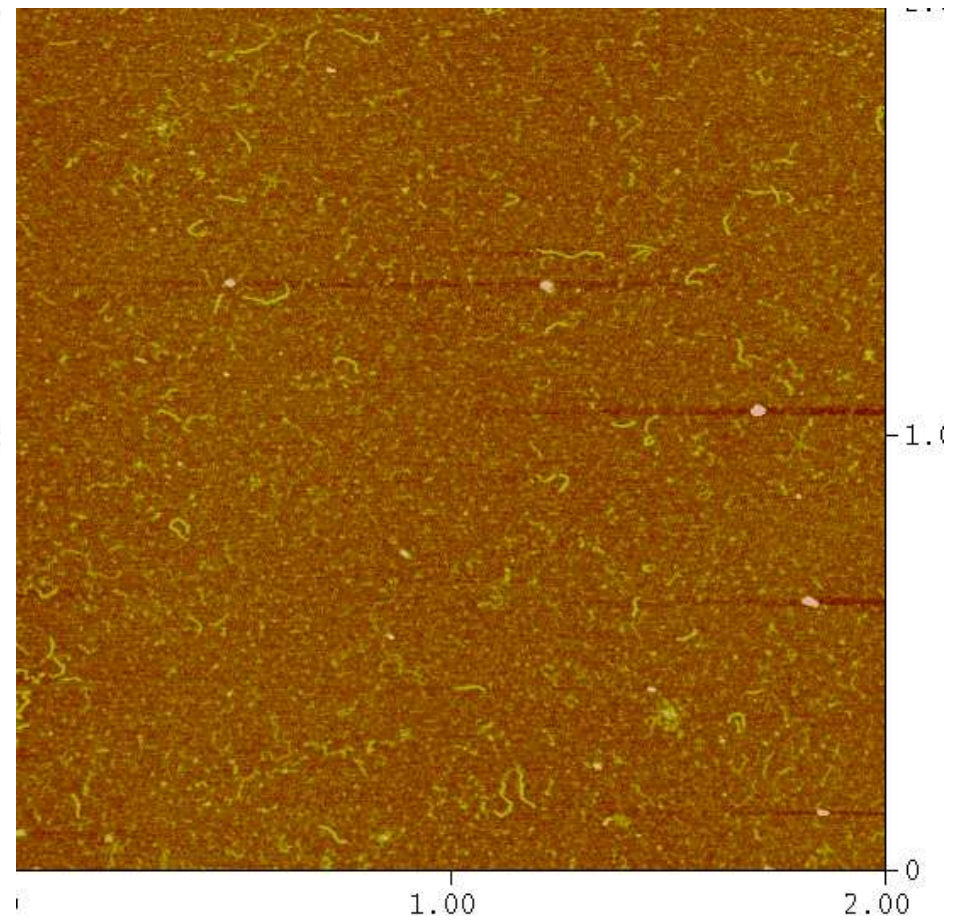
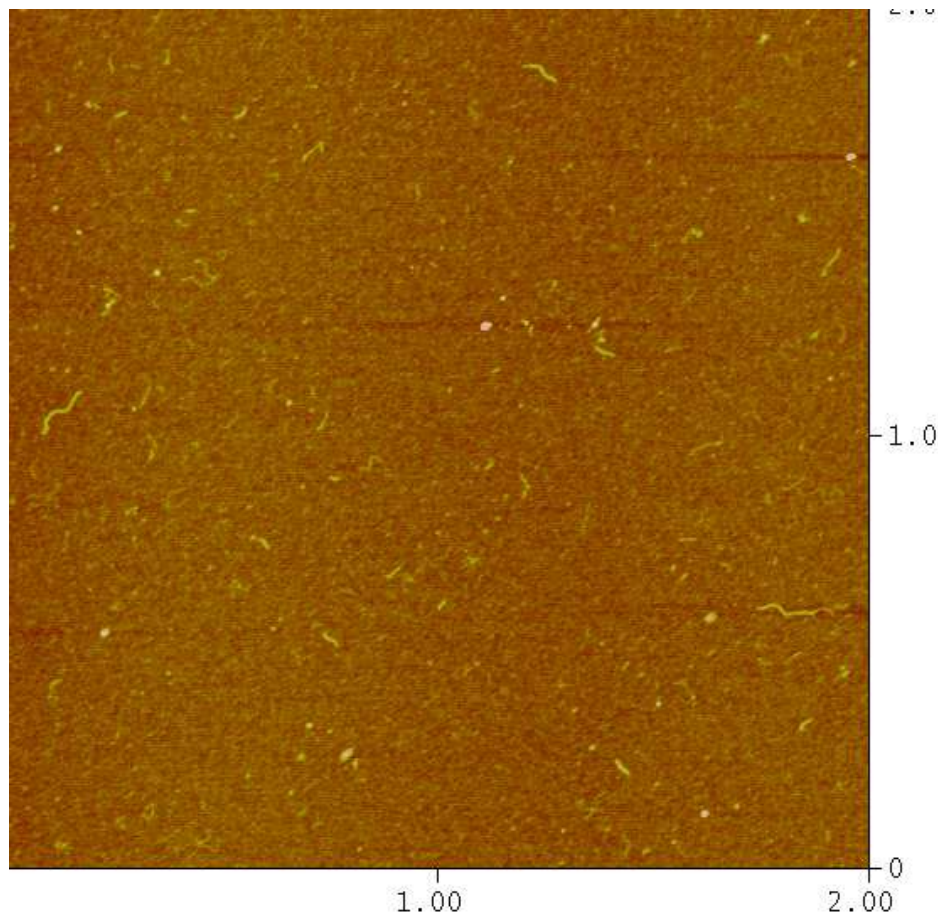
145-400 bp

<80 bp

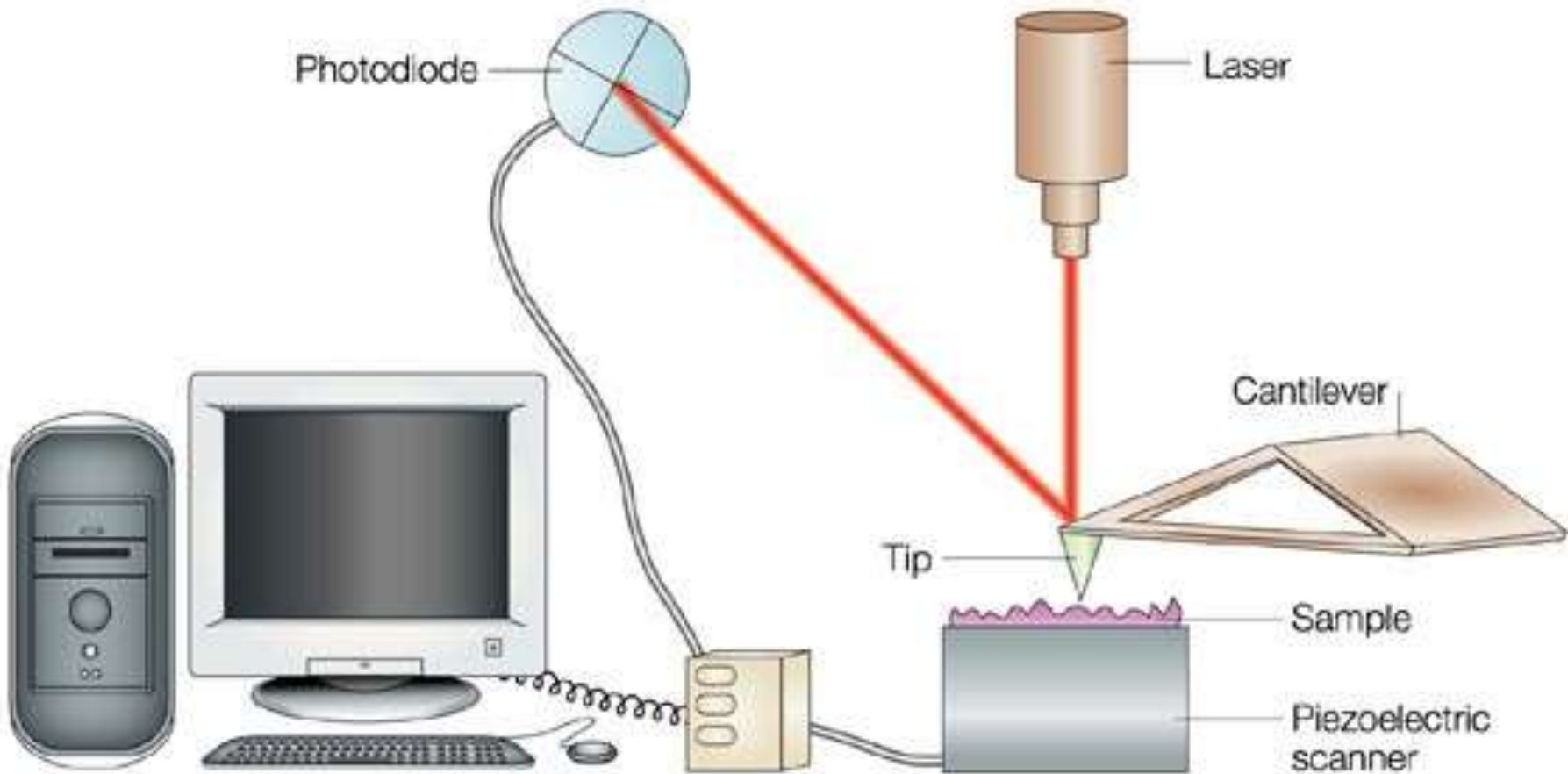
Liquid biopsy

Accurate ctDNA quantification is now made possible enabling a novel examination of ctDNA as cancer biomarker. Size profiling determination could appear as additional potential biomarker, especially during cancer patient monitoring.





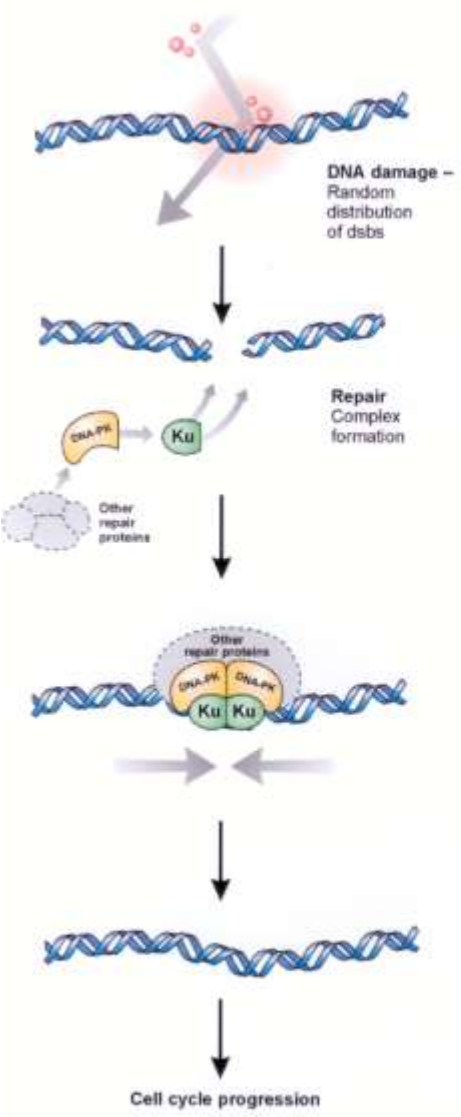
Atomic Force Microscopy



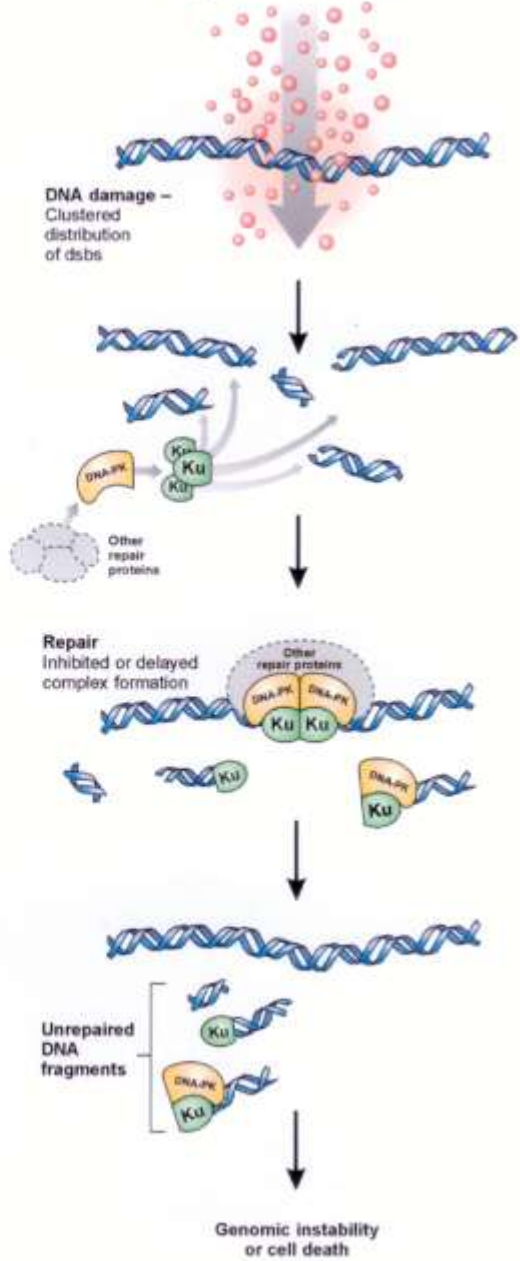
Nature

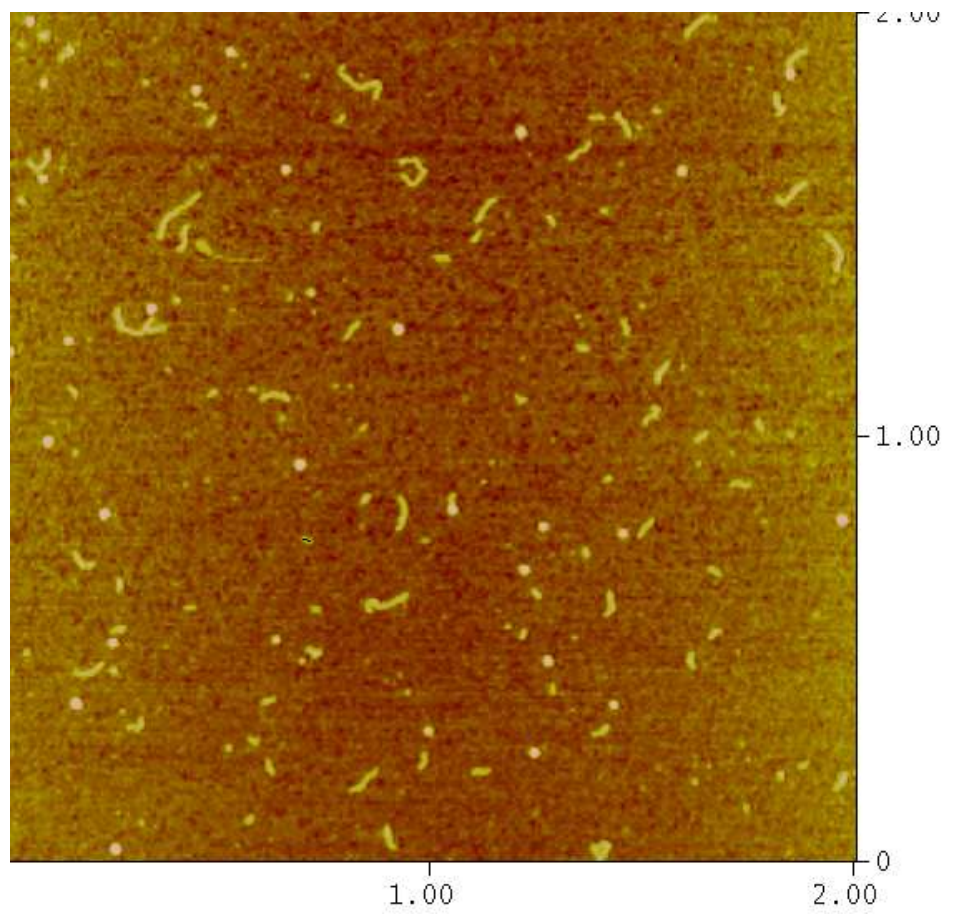
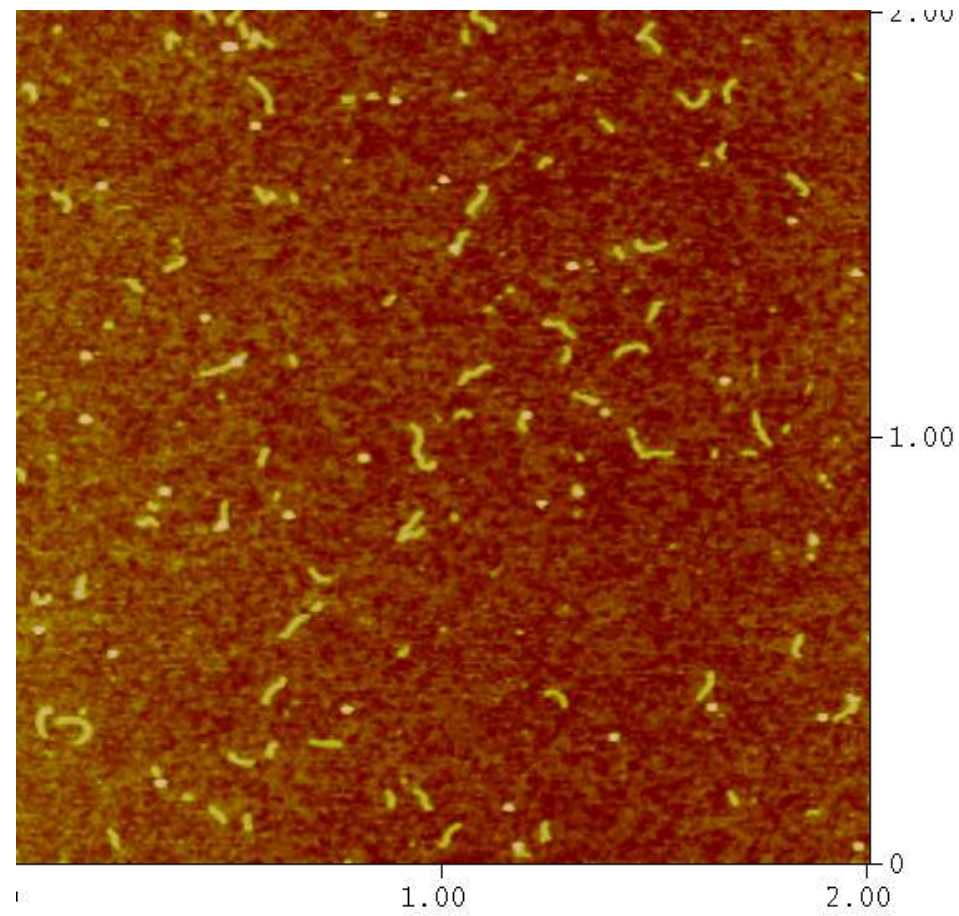
Monitoring of the Cancer Radiotherapy

Low-LET Radiations



High-LET Radiations





Cell-free DNA and cardiovascular diseased

Stroke

Trauma

Acute Coronary Syndrome

При остром инфаркте миокарда концентрация внеклеточной ДНК в плазме крови больного возрастает в среднем в 5 раз по сравнению с концентрацией в крови здоровых доноров, а концентрация одного из фрагментов ДНК – транскрибируемой области рибосомного повтора (ТОрДНК), возрастает в 12 раз.

При хронической ишемической болезни сердца содержание внеклеточной ДНК существенно не отличается от нормы, но содержание ТОрДНК в ней в 4,8 раз выше нормы, а в сыворотке - в 7 раз выше. Эта последовательность ДНК накапливается в сыворотке из-за того, что богата гуанином и цитозином, благодаря чему более устойчива к действию ферментов, разрушающих ДНК.

Разные фрагменты ДНК человека по-разному влияют на работу клеток миокарда. Эксперименты, показали, что фрагменты, богатые аденином и тимидином, увеличивают частоту сокращений клеток сердечной мышцы в 2-2,5 раза, а фрагменты, богатые гуанином и цитозином, такие, как ТОрДНК, уменьшают частоту сокращений в 1,5-2 раза.

Накопление ТОрДНК в сыворотке крови больных острым инфарктом миокарда может влиять на сократительную функцию клеток и, следовательно, работу сердца.

В гидравлике известен так называемый эффект Томса: если в вязкую жидкость добавить линейный высокомолекулярный полимер в очень низкой концентрации, это приведет к снижению гидродинамического сопротивления в струе.

Когда поток жидкости становится турбулентным, малые дозы полимера уменьшают вторичное вихреобразование. В опытах на атероматозных сосудах у животных внутриартериальное введение синтетического полимера в малой дозе приводило к увеличению диаметра церебральных артерий и восстановлению мозгового кровотока до 80-90% от исходного, эффект сохранялся в течение недели.

В плазме крови здоровых людей были обнаружены длинные фрагменты ДНК, сопоставимые по молекулярной массе с полимерами Томса. Оказалось, что у больных с ишемическими инсультами содержание ДНК в плазме возрастало семикратно, а в тяжелых случаях - двадцатикратно, причем она была представлена короткими фрагментами.

Такие низкомолекулярные фрагменты ДНК повышали вязкость крови и способствовали тромбообразованию.

Actively Released DNA from cells -

Intracellular and Intraorgan Messenger?

