



To cite this article: Tokgün O, Karagenç N, Tokgün PE, İnci K, Akça H, Doğu GG, Demiray A. KRAS mutasyonlarının kolon ve akciğer kanseri eksozomlar aracılığıyla tayini ve primer dokuya kıyasla mutasyon durumlarının analizi . Turk J Clin Lab 2022; 2: 253-259.

## ■ Orjinal Makale

# KRAS mutasyonlarının kolon ve akciğer kanseri eksozomlar aracılığıyla tayini ve primer dokuya kıyasla mutasyon durumlarının analizi

## *Detection of KRAS mutations by colon and lung cancer exosomes and analysis of mutational statuses compared to primary tissue*

Onur TOKGÜN<sup>1\*</sup> , Nedim KARAGENÇ<sup>1</sup> , Pervin Elvan TOKGÜN<sup>1</sup> , Kubilay İNCİ<sup>2</sup> , Hakan AKÇA<sup>1</sup> , Gamze Gököz DOĞU<sup>3</sup> , Aydın DEMİRAY<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Denizli/TÜRKİYE

<sup>2</sup>Pamukkale Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kanser Moleküler Biyolojisi Programı, Denizli/TÜRKİYE

<sup>3</sup>Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Onkoloji Anabilim Dalı, Denizli/TÜRKİYE

### Öz

**Amaç:** Kolorektal kanser ve akciğer kanserleri olan hastalarda epidermal büyüme faktörü reseptör hedefli tedavinin etkinliği önemli ölçüde KRAS mutasyonu ile ilişkilidir. Bu çalışmanın amacı, Kolorektal kanser ve akciğer kanserli hastaların serum ekzozom ve primer tümör dokusunda ki KRAS mutasyon durumlarının karşılaştırmaktır.

**Gereç ve Yöntemler:** Histolojik olarak doğrulanmış 19 adet kolorektal kanser ve 28 adet akciğer kanserli toplam 47 hastanın tümör dokularından genomik DNA izole edildi ve iki kür tedavi sonrasında ilgili hastalardan alınan periferik kandan ekzomal RNA izole edildi. KRAS geninde üç bölgede gözlenen mutasyonlar (kodon 12, 13 ve 61) pyrosekanslama yöntemi ile analiz edildi. Elde edilen sekans verileri doğrultusunda tümör dokuları ile serum ekzozomlarında bulunan nükleik asitlere ait KRAS mutasyon durumları ortaya kondu.

**Bulgular:** Doku örneklerinden KRAS mutasyon profilleri belirlenen hastaların eksozomlarında gözlenen KRAS mutasyonları incelendiğinde 3 (%6,38) hastada dokuda belirlenen mutasyonun dışında yeni bir mutasyon saptanmış, 9 (%19,14) hastada doku örneğinde mutasyon var iken herhangi bir KRAS mutasyonu saptanamamış, 5 (%10,6) hastada doku örneğinde mutasyon yok iken herhangi bir KRAS mutasyonu saptanmıştır. 30 (%63,8) hastada ise mutasyon olup olmama durumu doku ve ekzozom analizleri doğrultusunda değişmemiştir.

**Sonuç:** Elde ettiğimiz sonuçlar, kolorektal kanser ve akciğer kanserli hastaların hızlı ve non-invaziv bir materyal ile genotiplenmesinde serum ekzomal mRNA'nın yeni ve güvenilir bir kaynak olarak kullanılabileceği ileri sürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Likit biyopsi; KRAS; ekzozom; DNA

Sorumlu Yazar\*: Onur TOKGÜN, Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Denizli/TÜRKİYE

E-posta: otokgun@pau.edu.tr

Gönderim: 27.10.2021 kabul: 21.12.2021

Doi: 10.18663/tjcl.1015438

ORCID: 0000-0003-0537-9032

## Abstract

**Aim:** The efficacy of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in colorectal cancer and lung cancers is significantly associated with the KRAS mutation. Therefore, this study aims to compare the KRAS mutation status in serum exosome and primary tumor tissue of colorectal and lung cancer patients.

**Material and Methods:** Genomic DNA was isolated from tumor tissues of 47 patients with histologically confirmed 19 colorectal cancers and 28 lung cancers, and exosomal RNA was isolated from peripheral blood from the respective patients after two treatment cycles. Mutations (codons 12, 13, and 61) observed in three regions of the KRAS gene were analyzed by pyrosequencing. The sequence data obtained revealed the KRAS mutation status of nucleic acids in tumor tissues and serum exosomes.

**Results:** When the KRAS mutations were observed in the exosomes of the cases whose KRAS mutation profiles were determined from the tissue samples, a new mutation other than the mutation determined in the tissue was detected in 3 (6.38%) cases. In comparison, there was a mutation in the tissue sample in 9 (19.14%) cases, and no KRAS mutation could be detected in 5 (10.6%) cases. While there was no mutation in the tissue sample, any KRAS mutation was detected. In 30 (63.8%) cases, the presence or absence of mutation did not change in line with tissue and exosome analysis.

**Conclusion:** Our results suggest that serum exosomal mRNA can be used as a new and reliable source for genotyping patients with colorectal and lung cancer with a rapid and non-invasive material.

**Keywords:** Liquid biopsy, KRAS, exosome, DNA

## Giriş

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) ve kolorektal kanser (KRK), batı dünyasında gözlenen en yaygın kanserler arasındadır. Akciğer kanseri, kansere nedenli ölümler arasında ilk sırada yer almaktadır. KRK, 40 ila 79 yaş arasındaki erkekler arasında kanser ölümlerinin ikinci en yaygın nedenidir. KHDAK ve KRK, önemli hasta alt gruplarında EGFR sinyal yolağının alt yolaklarına aracılık eden KRAS onkogen mutasyonlarının rolü de dahil olmak üzere birçok biyolojik benzerliğe sahiptirler. Bununla birlikte, bu belirgin benzerliklere rağmen iki malignite arasındaki farklılıklar EGFR ve KRAS sinyalinin spesifik rolü, ilişkili öngörücü biyobelirteçlerin değeri ve terapötik çıkarımlar ile ortaya konulmaktadır. Ek olarak, her iki hastalık için yeni terapötik gelişmelere rağmen, akciğer kanseri için 5 yıllık sağkalım oranı %20'nin altında kalırken, KRK için bu oran %60'ı aşmaktadır [1]. Bu bağlamda, KRAS mutasyonlarının iki malignitedeki farklı ve karmaşık rolünün daha iyi anlaşılması, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ve kişiselleştirilmiş kanser tedavisine yönelik gelişmelere katkı sağlayabilir. KRAS mutasyonları, çeşitli biyolojik fonksiyonlarla ilişkilendirilmiştir ve KRK ve KHDAK'de hem prognostik hem de prediktif etkiye sahiptir [2]. KRAS onkogenindeki mutasyonlar, KRK patogeneğinde erken ve merkezi bir olay olmakla birlikte hastalığın daha kötü bir prognoz ile ilerlemesine neden olmaktadır [3,4]. KRK'de, EGFR monoklonal antikor hedefli tedavilerin etkinliğini öngörmek için klinik uygulamada KRAS analizi gerçekleştirilmektedir ve KRAS mutasyonunun, setuksimab veya panitumumab gibi EGFR hedefli monoklonal antikorlarla tedavi edilen hastalarda sınırlı bir terapötik fayda öngördüğü literatürde gösterilmiştir [5-8]. KRK hastalarının %30

ila %40'ında KRAS mutasyonları görülmektedir [6]. KHDAK'de ise KRAS, çoğunlukla adenokarsinomlu hastalarda %15 ila %30 oranında mutasyona uğramaktadır ve sigara öyküsü olmayan hastaların tümörlerinde daha sık görülen EGFR mutasyonlarının aksine, bazı KRAS mutasyonları, özellikle transversiyon mutasyonları (G→T veya G→C), tütüne maruz kalma ile ilişkilidir. KRAS mutasyonlarının KHDAK kanserindeki prognostik rolü tartışmalıdır. Fakat, son yıllardaki çalışmalar KRAS mutasyonlarının kötü prognozla bir ilişkisi olduğunu göstermiştir [9-11].

Likit biyopsi, tedavi yanıtını, hastalığın ilerlemesini, prognozu ve erken kanser teşhisini öngörmeye altın standart olan doku biyopsisine destek olabilecek non-invaziv bir yaklaşım olarak literatürde yer almıştır [12,13]. Doku analizi uzamsal olarak sınırlıdır ve sadece tümörün incelenen parçasını tanımlamaktadır. Buna karşılık, likit biyopsi, tümörün heterojen yapısını anlamamıza daha fazla katkı sağlamaktadır [14]. Dolaşımdaki tümör hücreleri, dolaşımdaki DNA (cfDNA) ve hücre dışı vezikülleri (EV'ler) kapsayan likit biyopsi tanımı, çeşitli tümör tiplerinin moleküler özelliklerini araştırmak amacıyla son yıllarda pek çok çalışmada kapsamlı bir şekilde kullanılmaktadır.

Eksozomlar DNA, RNA ve proteinleri içeren 40-150 nm büyüklüğündeki hücre dışı veziküllerdir [15,16]. Kanser hücreleri de dahil tüm canlı hücreler eksozom üretmektedir. Fakat, normal hücrelere kıyasla kanser hücrelerinin daha yüksek seviyelerde eksozom ürettiği bilinmektedir. Son yıllarda, sağlıklı bireyler ve kanser hastalarından alınan periferik kan numunelerinden izole edilen eksozomlarda, kansere özgü mutasyonları tanımlamada faydalı olan nükleik asit molekülleri keşfedilmiştir. Bu önemli bilgi daha sonra farklı kanser türlerinde gerçekleştirilen

çalışmalar ile de araştırma grupları tarafından doğrulanmıştır. Eksozomların fragmente olmamış nükleik asit parçaları içermesi nedeniyle Cell free DNA (cfDNA)'ya kıyasla mutasyonların tespiti için daha uygun kaynaklar oldukları da bilinmektedir. Dolaşımdaki eksozomların kansere özgü mutasyonların saptanmasında kullanımını arttıran faktörlerden biri de kandan eksozom izolasyonunun kolaylığıdır. Bilindiği üzere tümör dokusu heterojen bir yapıya sahiptir ve tümör dokusu üzerinden yapılacak genetik analizlerin homojenliği dokunun iyi tespit edilmesine bağlıdır. Eksozomların kanser hücrelerinden köken alarak salınmasından dolayı, elde edilecek verilerin daha homojen olmasına olanak sağlamaktadır. cfDNA, dolaşımdaki ölü hücrelerden izole edilmekte iken eksozomal DNA'lar yaşayan hücrelerden izole edilmektedir ki bu durum kanser genetiğini belirlemek açısından daha net bir bilgi vermektedir.

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızın amacı, non-invaziv analiz için imkan sağlayan eksozomlar aracılığıyla akciğer ve kolon kanseri hastalarında önemli bir gen olan KRAS 'da gözlenen olası genetik değişimleri kısa sürede ve yüksek doğrulukta saptamaktır.

## Gereç ve Yöntemler

Çalışmaya Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Anabilim Dalı'na başvurmuş 28 akciğer ve 19 adet kolorektal karsinomlu hasta dahil edilmiştir. Çalışma için gerekli onam Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Etik kurulundan (60116787-020/32214) alınmıştır. Projede gerçekleştirilecek bütün aşamalar Helsinki Bildirgesi'ne uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

## Eksozom İzolasyonu

Çalışmaya alınan her bir hastadan EDTA'lı tüplere 4-5 ml kan alındı. Alınan kan numunelerden santrifüj edilerek elde edilen plazma örnekleri 0.8 µm çapındaki filtrelerden geçirildikten sonra -80°C'de saklanmıştır. Eksozom izolasyonu Qiagen Exor-neasy kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Özetle, filtre edilmiş plazma örnekleri üzerine eş hacimde XBP solüsyonu eklenip kolona aktarılan örnek 500g de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası yıkama işlemi için kolon üzerine 10 ml XWP solüsyonu eklendi ve 5000g de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldıktan sonra kolon üzerine 700 µl Qiazol solüsyonu eklendi ve 5000g de 5 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası lizat 2 mL endorf tüpe aktararak Qiagen exoRNeasy kiti protokolüne göre eksozomal RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen eksozomal RNA örnekleri Hi-Capacity cDNA Revers Transkripsiyon kiti (Applied Biosystems, Foster City CA, USA) kullanılarak cDNA'ya çevrildi.

## Pyro Sekans ile KRAS Mutasyon Analizi

Eksozomlardan izole edilip cDNA dönüştürülen örnekler KRAS mutasyonu analizi için aşağıdaki protokole göre pyrosekans işlemine tabi tutuldu:

Herbir örnek için toplamda 20 µl olacak şekilde Pyromark PCR (Qiagen, Almanya) karışımından 12,5 µl, PZR primerinden 1 µl, steril distile sudan 6,5 µl eklendi 30 ng kalıp DNA kullanılarak son hacim 25 µl'ye ayarlandı. PZR amplifikasyon protokolü şu şekildedir: 95°C'de 15 dakika 1 döngü (Başlangıç denatürasyonu), 42 döngü olacak şekilde 95°C'de 20 saniye (Denatürasyon) - 53°C'de 30 saniye (Annealing) -72°C'de 20 saniye (uzama) ve 72°C'de 5 dakika (son uzama). Kullanılan PCR primerleri biotin ile kaplı olduğundan dolayı post PCR işleminde streptavidin ile bağlanmıştır.

Sekans aşamasında 24 kuyucuklu pyromark plate'lere, 2 µl Streptavidin, 40 µl bağlanma tamponu ve 28 µl steril distile su ve 10 µl PCR ürünü içeren reaksiyon karışımı eklendi. Streptavidinin çökmesini engelleyerek kalıp DNA'ya bağlanmasını sağlamak için plate orbital çalkalayıcıda 10 dakika karıştırıldı. Sonraki aşamalar PyroMark vakum sisteminde gerçekleştirildi. Bu vakum sistemi, bir etanol, bir denatürasyon, bir yıkama ve iki de distile su olmak üzere toplam beş istasyondan oluşmaktadır. PZR ürünleri özel filtreli problemlara sahip bir aspirasyon başlığından geçirildikten sonra başlık sırasıyla bu 5 istasyondan geçirildi ve filtrede sadece streptavidine biyotinle tutunmuş PCR ürünlerinin kalması sağlanmış oldu. Bu özel problemler PZR amplikonlarının bağlı olduğu sefaroz boncukların filtrelerden geçişine izin vermemekte ve bu boncuklar problemlerde hapsolünmektedir. Problemlerde hapsolünmüş sefaroz boncuklara bağlı kalıp DNA denatüre edildikten ve yıkandıktan sonra aspirasyon başlığı aracılığı ile Q24 plate'de sekans primerleri ile muamele edildi, enzim karışımı, sübstrat karışımı ve nükleotidleri içeren Pyrosekans kartuşu hazırlandı ve pyrosekans cihazına konuldu.

Pyrosekans işlemi ardından elde edilen sekans verileri pyromark cihazının yazılım programında detaylı olarak okundu ve hastalarda olası KRAS mutasyon durumları analiz edildi.

## Verilerin Değerlendirilmesi

Pyrosekans yöntemi ile elde edilen veriler hastalardan daha önce doku örneklerinde elde edilen pyrosekans verileri ile kıyaslandı ve eksozomal cDNA örneklerinde mutasyonların yakalanıp yakalanmama durumları analiz edildi. Böylelikle tedavi almış hastalarda tedavi sonrası olası değişen genetik durumun da eksozomlar aracılığıyla ortaya konması mümkün hale gelmiştir.

## Bulgular

Çalışmamızda 28 (%60) adet akciğer kanseri, 19 (%40) adet kolon kanseri vakasına ait eksozom örneklerinden KRAS mutasyon analizi yapılmıştır. Çalışmaya katılan hastaların 8 (%17) adettini kadın 39 (%83) adettini ise erkek bireyler oluşturmaktadır. Çalışmamızda hastaların yaş ortalaması, 62.85± 8,59, medyan yaş değeri 62 olarak tespit edildi. Akciğer ve kolon kanseri hastaların başlıca klinik ve demografik özellikleri sırasıyla tablo 1 ve tablo 2 de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** Akciğer kanseri hastalarının klinik ve demografik özellikleri

KARAKTERİSTİK ÖZELLİKLERİ		HASTA SAYISI, n:28(%)
YAŞ	<62	9(33.3)
	>62	19(66.6)
CİNSİYET	Erkek	26(91.7)
	Kadın	2(8.3)
HİSTOLOJİK TİPLER	Adenokarsinom	10(58.3)
	Skumöz	14(33.3)
	Diğer	4(8.3)
EVRELERİ	Erken( I, II, IIIA)	13(46,42)
	İleri( IIIB, IV)	15(53,58)

**Tablo 2.** Kolon kanseri hastalarının klinik ve demografik özellikleri

KARAKTERİSTİK ÖZELLİKLERİ		HASTA SAYISI, n:19(%)
YAŞ	<62	7(37)
	>62	12(63)
CİNSİYET	Erkek	13(68)
	Kadın	6(32)
SİGARA ALIŞKANLIKLARI	İÇEN	14(74)
	İÇMEYEN	5(26)
EVRELERİ	Erken( I, II, IIIA)	7(37)
	İleri( IIIB, IV)	12(63)

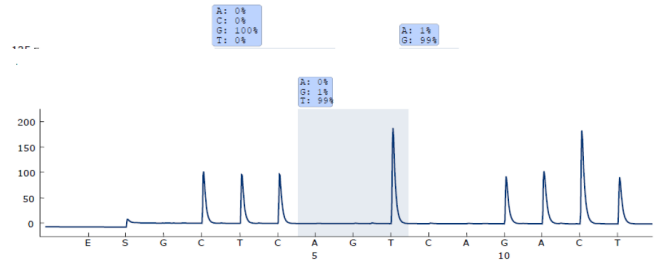
Pyrosekanslama ile analiz edilen KRAS mutasyonları hakkında detaylı bilgi ve analiz parametreleri Tablo 3 de gösterilmiştir.

**Tablo 3.** KRAS geninde gözlenen mutasyonların analiz parametreleri

Nükleik Asit Değişimi	Amino Asit Değişimi	LOB(%Ünite)	LOD (%Ünite)	COSMIC ID*(V42)
<b>KODON 12(GGT)</b>				
GAT	G12D	0.6	2.2	521
GTT	G12V	0.0	1.0(7)*	520
TGT	G12C	0.5	2.1	516
AGT	G12S	0.4	1.9	517
GCT	G12A	0.7	2.3	522
CGT	G12R	0.3	1.8	518
<b>KODON 13(GCC)</b>				
GAC	G13D	0.3	1.9	532
<b>KODON 61(CAA), Geri Yönde(TTG) Analiz Yapıldı.</b>				
GTG	Q61H	0.8	2.8	554
TAG	Q61L	1.2	3.1	553
TCG	Q61R	1.6	35	552
ATG	Q62H	0.7	2.6	555
TTC	Q61E	1.2	3.1	550

\*En düşük mutasyon seviyesi

Ayrıca, KRAS geninde gözlenen mutasyonlarının yorumlanması aşamasında kıyaslamaların gerçekleştirildiği yabancı tip kodon12/13 ve 61 bölgelerinin pyrosekans görüntüleri Şekil 1 ve 2'de verilmiştir.



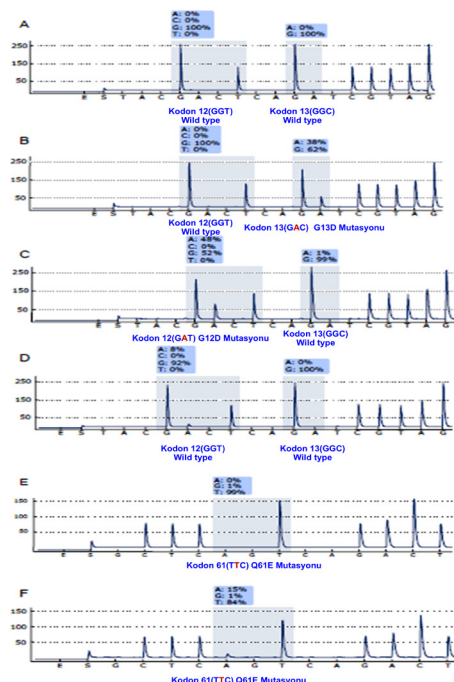
**Şekil 2** Yabancı Tip KRAS kodon 61 pyrosekans görüntüsü

Gerçekleştirilen analizler sonrasında eksozomlarda saptanan KRAS mutasyonları Tablo 4'teki özetlenmiştir.

**Tablo 4** Çalışmaya katılan hastaların eksozomlarında saptanan KRAS mutasyonlar hakkında sayısal ve yapısal bilgiler

Mutasyon tipi	Kodon	Nükleotit no ve sekans	Amino asit değişimi	Mutasyonlar arasında % oranı
Nokta mutasyonu	12	34 G>A	G12S	5 (%10.6)
Nokta mutasyonu	12	34 G>T	G12C	2 (%4.2)
Nokta mutasyonu	12	35 G>A	G12D	8 (%17.02)
Nokta mutasyonu	12	35 G>T	G12V	1 (%2.1)
Nokta mutasyonu	61	182 A>G	Q61R	5 (%10.6)

Çalışmaya katılan 47 hastaya ait eksozomların 21'nde (%44,7) KRAS mutasyonu saptanmıştır. Saptanmış olan mutasyonları pyrosekans analiz görüntüleri Şekil 3'te verilmektedir.



**Şekil 3** Pyrosekans ile saptanan mutasyonların analiz görüntüleri

Çalışmaya katılan hastaların ilk biyopsi doku örneklerinden yapılan KRAS mutasyon analizleri ile eksozomlarından gerçekleştirilen KRAS mutasyon analizlerinin kıyaslanması Tablo 5'te verilmiştir,

**Tablo 5** Çalışmaya katılan hastaların doku ve eksozomal cDNA örneklerinde gözlenen KRAS mutasyon durumlarının kıyaslamalı görüntüsü.

	Eksozom		Doku
	KRAS kodon12/13	KRAS kodon 61	
Hasta 1	WT	WT	G12V
Hasta 2	WT	WT	G12V
Hasta 3	WT	WT	WT
Hasta 4	WT	WT	WT
Hasta 5	G12D	WT	G12D
Hasta 6	WT	Q61R	Q61R
Hasta 7	WT	WT	WT
Hasta 8	G12C	WT	G12C
Hasta 9	WT	WT	WT
Hasta 10	WT	WT	WT
Hasta 11	G12S	WT	G12S
Hasta 12	WT	WT	WT
Hasta 13	G12S	WT	G12S
Hasta 14	WT	WT	G12D
Hasta 15	WT	Q61R	Q61R
Hasta 16	WT	WT	WT
Hasta 17	G12D	WT	WT
Hasta 18	WT	Q61R	WT
Hasta 19	WT	WT	G12D
Hasta 20	G12V	WT	G12D
Hasta 21	G12S	WT	G12S
Hasta 22	G12C	WT	G12C
Hasta 23	G12D	WT	G12D
Hasta 24	WT	WT	WT
Hasta 25	WT	WT	WT
Hasta 26	WT	WT	G13D
Hasta 27	WT	WT	G13D
Hasta 28	WT	WT	WT
Hasta 29	WT	WT	WT
Hasta 30	G12S	WT	WT
Hasta 31	WT	WT	G13D
Hasta 32	G12D	WT	G12V
Hasta 33	WT	WT	WT
Hasta 34	WT	Q61R	Q61R
Hasta 35	G12D	WT	WT
Hasta 36	G12S	WT	G12S
Hasta 37	G12D	WT	G12D
Hasta 38	WT	WT	WT
Hasta 39	WT	Q61R	Q61R
Hasta 40	WT	WT	G13D
Hasta 41	WT	WT	WT
Hasta 42	WT	WT	WT
Hasta 43	WT	WT	G13D
Hasta 44	G12D	WT	G12D
Hasta 45	WT	WT	WT
Hasta 46	G12D	WT	WT
Hasta 47	WT	WT	WT

Doku örneklerinden KRAS mutasyon profilleri belirlenen hastaların eksozomlarında gözlenen KRAS mutasyonları incelendiğinde 3 (%6,38) hastada dokuda belirlenen mutasyonun dışında yeni bir mutasyon saptanmış, 9 (%19,14) hastada doku örneğinde mutasyon var iken herhangi bir KRAS mutasyonu saptanamamış, 5 (%10,6) hastada doku örneğinde mutasyon yok iken herhangi bir KRAS mutasyonu saptanmıştır. 30 (%63,8) hastada ise mutasyon olup olmama durumu doku ve eksozom analizleri doğrultusunda değişmemiştir.

Hastaların yaklaşık olarak %64'ünün eksozom ve biyopsi örneklerinde mutasyon profili aynı çıkmıştır. Hastaların %6,38'inde ise dokuda belirlenen mutasyondan farklı bir mutasyon ortaya çıkmıştır. Hastaların %19,14'ünde hastanın doku örneğinde mutasyon var iken eksozomda herhangi bir KRAS mutasyonu saptanamamış iken %10,6'nda ise biyopsi materyalinde herhangi bir mutasyon saptanamamış iken eksozomda gerçekleştirilen genetik analizde KRAS mutasyonu saptanmıştır.

### Tartışma

KRAS geninde gözlenen mutasyonların pankreas, akciğer ve kolon gibi çeşitli kanserler ile ilişkili olduğu bilinmektedir [17,18]. Bu durum, kanser tedavisi için RAS onkogeninin araştırmacılar tarafından hedeflenmesine olanak sağlamıştır. RAS onkogenini hedefleyen tedavi stratejileri tam anlamıyla başarıya ulaşamamıştır. Fakat, kolon, akciğer ve pankreas gibi kanser türlerinde KRAS mutasyonlarının tanımlanması tanı, tedavi ve prognozun yorumlanması açısından oldukça öneme sahiptir. KRAS mutasyonlarının tümör profilini yansıtmaya açısından daha doğru ve hızlı bir şekilde ortaya konması araştırmacılar için önemli bir araştırma konusu olmuştur.

Nükleik asitleri barındırdığı gösterilen eksozomlar, spesifik biyogenez sürecinin ürünü olup on milyonlarca canlı hücre tarafından dolaşıma salınmaktadır [19]. Eksozomların aksine, cfDNA'lar ileri evre hastalık sürecinde apoptoz ve nekroza uğramış tümör hücrelerinin materyalleridir [18]. Bu da cfDNA'ların doğru genetik analizler için uygun materyal olma durumlarını sorgulatmaktadır. Tümör dokusunun genetik açıdan değerlendirmesi, mutasyon durumunu analiz etme açısından altın standarttır. Bununla birlikte, hastalık ilerledikçe primer ve metastatik tümör dokularında genomik değişiklikler farklılık gösterebilir ve tekrarlayan genetik analiz süreçleri gerekliliği ortaya çıkar. Ayrıca, biyopsi materyallerinin hem invaziv ve maliyetli olması hem de bazı hastalarda erişilememesi nedeniyle genetik analizler için alternatif materyallerin gereksinimi ortaya çıkmıştır [20,21]. Bu zorluklar göz önüne alındığında, hedef mutasyonu hastalığın daha erken bir aşamasında

tespit etme şansını en üst düzeye çıkarmak için dolaşımdaki farklı nükleik asit kaynaklarını incelemek çok önemlidir. Birçok likit biyopsi yalnızca cfDNA fraksiyonunu sorgularken, RNA'da da mutasyonların mevcut olduğu iyi bilinmektedir [22,23].

Bu bilgiler doğrultusunda planladığımız araştırma projesinde biyopsi materyalinde gözlenen KRAS mutasyon profili ile eksozomal cDNA örneklerinde gözlenen KRAS mutasyon profillerinin kıyaslanması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda hastaların yaklaşık olarak %64'nde mutasyon profili eksozom ve biyopsi örneklerinde aynı çıkmıştır. Hastaların %6,38'nde ise dokudan belirlenen mutasyondan farklı bir mutasyon ortaya çıkmıştır. Hastaların %19,14'da hastada doku örneğinde mutasyon var iken herhangi bir KRAS mutasyonu saptanamamış iken %10,6'nda ise herhangi bir mutasyon yok iken eksozomda gerçekleştirilen genetik analizde KRAS mutasyonu saptanmıştır. Hastalarda, doku materyali ile eksozomlarda gerçekleştirilen genetik analizlerde gözlenen farklılıklar bilimsel temellerle açıklanabilecek gerçeklerdir. Hastalar tedavi gördükten sonra çevresel ve genetik faktörler ışığında tedaviye yanıt verebilmekte ya da verememektedir. Bu durumun da sonucu olarak kanser hücreleri tedaviye direnç kazanarak agresif profil kazanmakta ya da tedavi süreci sonrasında agresif nitelikteki hücreler ölmektedir. Sonuç olarak primer kanserden köken alan hücrelerin genetik yapısı değişebilmektedir. Değişen genetik yapı ise eksozomlarda gerçekleştirilen genetik analizler ile daha net gösterilmektedir. Literatürde kanser hücrelerinin tedavi aldıktan sonra genetik yapılarındaki olası değişimlerini gösteren yayınlar bulunmaktadır.

Bu çalışma, serum eksozomal cDNA materyalinin, özellikle tedavi seçiminin önce biyopsi fırsatı olmayan hastalarda tekrarlayan ve invaziv olmayan genotiplendirmesi için etkili ve faydalı olabileceğini göstermiştir. Eksozomal nükleik asit analizleri, erken teşhis ve kanseri önlemeyi göz önünde bulundurarak kişiselleştirilmiş bakımı uyarlamak için hassas tıp tekniklerini daha da geliştirmemize izin verebilir. Çalışmamızın birkaç potansiyel sınırlaması vardı. Bunlardan ilki, çalışmada nispeten az sayıda hasta analiz edilmiştir. İkincisi, KRAS geninde seçilmiş nokta mutasyonları analiz edilmiştir. Bu mutasyonlar dışında eksozomal cDNA örneklerinde ortaya konabilecek yeni KRAS mutasyonlarının daha detaylı taramalar ile ortaya konabileceği unutulmamalıdır.

## Sonuç

Sonuç olarak, eksozomal RNA, tanı, prognoz takibi ve kişiselleştirilmiş etkinliği için bilgi sağlamak açısından kanser biyopsi dokusu ve geleneksel kan biyobelirteçlerinin yerini alma potansiyeline sahiptir.

## Maddi Destek ve Çıkar İlişkisi

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje No: 2018HZDP052) tarafından desteklenmiştir.

## Kaynaklar

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 225-49.
2. Langer CJ. Roles of EGFR and KRAS Mutations in the Treatment Of Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer. *PT* 2011; 36: 263-79.
3. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Eng J Med* 1988; 319: 525-32.
4. Arrington AK, Heinrich EL, Lee W et al. Prognostic and Predictive Roles of KRAS Mutation in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 12153-68.
5. Lièvre A, Bachet JB, Boige V et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2008; 26: 374-9.
6. Qiu LX, Mao C, Zhang J et al. Predictive and prognostic value of KRAS mutations in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab: a meta-analysis of 22 studies. *Eur J Cancer* 2010; 46: 2781-7.
7. Linardou H, Dahabreh IJ, Kanaklopiti D et al. Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol* 2008; 9: 962-72.
8. Garassino MC, Borgonovo K, Rossi A et al. Biological and clinical features in predicting efficacy of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *Anticancer Res* 2009; 29: 2691-701.
9. Mascoux C, Iannino N, Martin B et al. The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer : asystematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer* 2005; 92: 131-9.
10. Schiller JH, Adak S, Feins RH et al. Lack of prognostic significance of p53 and KRAS mutations I primary resected non-small-cell lung cancer on E4592: A laboratory ancillary study on an eastern cooperative oncology group prospective randomized trial of postoperative adjuvant therapy. *J Clin Oncol* 2001; 19: 448-57.
11. Shepherd FA, Domerg C, Hainaut P et al. Pooled analysis of the prognostic and predictive effects of KRAS mutation status and KRAS mutation subtype in early-stage resected non-small-cell lung cancer in four trials of adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 2013; 31: 2173-81.

12. Pantel K, Alix-Panabières C. Liquid biopsy and minimal residual disease - latest advances and implications for cure. *Nat Rev Clin Oncol* 2019; 16: 409-24.
13. Babayan A, Pantel K. Advances in liquid biopsy approaches for early detection and monitoring of cancer. *Genome Med.* 2018;10(1):21. 3. Alix-Panabières C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem* 2013; 59: 110-8.
14. Mader S, Pantel K. Liquid Biopsy: Current Status and Future Perspectives. *Oncol Res Treat.* 2017; 40: 404-8.
15. Sluijter JP, Verhage V, Deddens JC et al. Microvesicles and exosomes for intracardiac communication. *Cardiovasc Res* 2014; 102: 302–11.
16. Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer. *J Clin Invest.* 2016; 126: 1208-15.
17. Kahlert C, Melo SA, Protopopov A, et al. Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. *J Biol Chem* 2014; 289: 3869-75.
18. 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.
19. Milane L, Singh A, Mattheolabakis G, Suresh M, Amiji MM. Exosome mediated communication within the tumor microenvironment. *J Control Release* 2015; 219: 278-94.
20. Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med* 2014; 20: 430-435.
21. Perrone F, Lampis A, Bertan C et al. Circulating free DNA in a screening program for early colorectal cancer detection. *Tumori* 2014; 100: 115-21.
22. Skog J, Würdinger T, van Rijn S et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 1470-6.
23. Castellanos-Rizaldos E, Grimm DG, Tadigotla V et al. Exosome-Based Detection of EGFR T790M in Plasma from Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Clin Cancer Res.* 2018; 24: 2944-50.