

ЛИМФОИДНЫЕ ОПУХОЛИ

LYMPHOID TUMORS

<https://doi.org/10.21320/2500-2139-2024-17-3-256-265>

<https://doi.org/10.21320/2500-2139-2024-17-3-256-265>

Мутации в генах *KRAS/NRAS* и эффективность индукционной терапии по трехкомпонентным схемам на основе бортезомиба у пациентов с впервые диагностированной множественной миеломой

KRAS/NRAS Gene Mutations and the Efficacy of Bortezomib-Based Triplet Induction Therapy in Patients with Newly Diagnosed Multiple Myeloma

А.М. Сергеева^{ORCID}, В.Л. Сурин^{ORCID}, Ю.А. Чабаева^{ORCID},
А.А. Крайзман^{ORCID}, М.В. Соловьев^{ORCID}, С.М. Куликов^{ORCID},
Л.П. Менделеева^{ORCID}

A.M. Sergeeva^{ORCID}, V.L. Surin^{ORCID}, Yu.A. Chabaeva^{ORCID},
A.A. Kraizman^{ORCID}, M.V. Solovlev^{ORCID}, S.M. Kulikov^{ORCID},
L.P. Mendeleeva^{ORCID}

ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России,
Новый Зыковский пр-д, д. 4, Москва, Российская Федерация, 125167

National Research Center for Hematology, 4 Novyi Zykovskii pr-d,
Moscow, Russian Federation, 125167

РЕФЕРАТ

ABSTRACT

ЦЕЛЬ. Определить мутации в генах *KRAS* и *NRAS* у пациентов с впервые диагностированной множественной миеломой (ММ) и классифицировать их в соответствии с глубиной противоопухолевого ответа на индукционную терапию по трехкомпонентным схемам, включающим бортезомиб.

AIM. To identify the *KRAS* and *NRAS* gene mutations in patients with newly diagnosed multiple myeloma (MM) and to classify them according to the depth of antitumor response to bortezomib-based triplet induction therapy.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В исследование включено 89 больных с впервые диагностированной ММ до начала противоопухолевого лечения. Среди них было 45 женщин и 44 мужчины в возрасте 30–82 года (медиана 58,5 года). Диагноз ММ поставлен в соответствии с критериями IMWG (2014). Плазматические клетки костного мозга (КМ) выделяли из аспирата с помощью градиентного метода с последующей иммуномагнитной селекцией по маркеру CD138. Мутации в генах *KRAS* и *NRAS* в клетках КМ CD138+ определяли методом секвенирования по Сэнгеру. Для анализа мутаций в генах *KRAS* и *NRAS* использовали протеомные программы MutationTaster, Polyphen2, FATHMM-XF. У всех больных в первой линии назначалась противоопухолевая терапия по трехкомпонентным схемам, включающим бортезомиб. Глубину ответа оценивали после проведения 6 циклов лечения по схемам PAD и VCD. Противоопухолевый ответ оценивался согласно критериям IMWG (2016).

MATERIALS & METHODS. The trial enrolled 89 patients with newly diagnosed MM prior to chemotherapy. Among them, there were 45 women and 44 men aged 30–82 years (median 58.5 years). MM was diagnosed according to IMWG criteria (2014). Bone marrow (BM) plasma cells were isolated from the aspirate using gradient method with subsequent immunomagnetic CD138 marker selection. The *KRAS* and *NRAS* gene mutations in BM CD138+ cells were identified with Sanger sequencing method. The proteomic programs MutationTaster, Polyphen2, and FATHMM-XF were used for mutation analysis in the *KRAS* and *NRAS* genes. All patients received bortezomib-based triplet chemotherapy as first-line treatment. The response depth was assessed after completing 6 cycles of PAD and VCD regimens. Antitumor response was evaluated according to IMWG (2016) criteria.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Частота мутаций в генах семейства *RAS* составила 42 % (37/89). Анализу подвергнуты данные

RESULTS. The mutation rate in the gene family *RAS* was 42 % (37/89). The analysis focused on the data from 33 patients with mutations detected and response identified after 6 cycles of treatment. In 22 out of 33 patients, deep response was not achieved, whereas 11 patients showed complete remission (CR) + very good partial remission (VGPR). In the group of patients without mutations in the

33 пациентов, у которых обнаружены мутации и известен ответ после 6 циклов лечения. У 22 из 33 пациентов глубокий ответ не достигнут, в то время как у 11 — была документирована полная ремиссия (ПР) + очень хорошая частичная ремиссия (охЧР). В группе пациентов без мутаций в генах семейства *RAS* ответ на терапию, соответствующий критериям ПР + охЧР, составил 64 % (27/42). Различия оказались статистически значимыми ($p = 0,008$). На основании клинических данных с оценкой результатов первичного лечения сформирована группа из 9 прогностически неблагоприятных мутаций: *NRAS* Gly13Asp, Gln61His; *KRAS* Gly12Ala, Gly12Asp, Gly12Val, Gly13Asp, Gln61Arg, Gln61His, Ala146Val.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Мутации в генах *KRAS* и *NRAS* семейства генов *RAS* отрицательно влияли на эффективность индукционной терапии по трехкомпонентным бортезомиб-содержащим схемам. Варианты мутаций в генах семейства *RAS* различались по уровню прогностической значимости. По результатам проведенного анализа выделены варианты мутаций, связанные с худшим ответом на терапию: *NRAS* Gly13Asp, Gln61His; *KRAS* Gly12Ala, Gly12Asp, Gly12Val, Gly13Asp, Gln61Arg, Gln61His, Ala146Val.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: множественная миелома, мутации в генах *KRAS* и *NRAS*, трехкомпонентные схемы лечения на основе бортезомиба, плазматические клетки CD138+.

Получено: 5 февраля 2024 г.

Принято в печать: 3 июня 2024 г.

Для переписки: Анна Михайловна Сергеева, Новый Зыковский пр-д, д. 4, Москва, Российская Федерация, 125167; тел.: +7(916)443-33-04; e-mail: curleww@gmail.com

Для цитирования: Сергеева А.М., Сурин В.Л., Чабаяева Ю.А. и др. Мутации в генах *KRAS/NRAS* и эффективность индукционной терапии по трехкомпонентным схемам на основе бортезомиба у пациентов с впервые диагностированной множественной миеломой. Клиническая онкогематология. 2024;17(3):256–65. doi: 10.21320/2500-2139-2024-17-3-256-265.

gene family *RAS*, the response to therapy meeting the CR + VGPR criteria was 64 % (27/42). The differences appeared to be significant ($p = 0.008$). The clinical data and the evaluation of primary treatment outcomes provided the basis for distinguishing a group of 9 prognostically unfavorable mutations: *NRAS* Gly13Asp, Gln61His; *KRAS* Gly12Ala, Gly12Asp, Gly12Val, Gly13Asp, Gln61Arg, Gln61His, and Ala146Val.

CONCLUSION. The mutations in *KRAS* and *NRAS* belonging to the gene family *RAS* had a negative effect on the efficacy of the bortezomib-based triplet induction therapy. Mutation variants in the *RAS* family genes differed in prognostic significance. The analysis results helped to identify the mutation variants associated with the worse response to therapy: *NRAS* Gly13Asp, Gln61His; *KRAS* Gly12Ala, Gly12Asp, Gly12Val, Gly13Asp, Gln61Arg, Gln61His, and Ala146Val.

KEYWORDS: multiple myeloma, *KRAS* and *NRAS* gene mutations, bortezomib-based triplet therapy, CD138+ plasma cells.

Received: February 5, 2024

Accepted: June 3, 2024

For correspondence: Anna Mikhailovna Sergeeva, 4 Novyi Zykovskii pr-d, Moscow, Russian Federation, 125167; Tel.: +7(916)443-33-04; e-mail: curleww@gmail.com

For citation: Sergeeva A.M., Surin V.L., Chabaeva Yu.A., et al. *KRAS/NRAS* Gene Mutations and the Efficacy of Bortezomib-Based Triplet Induction Therapy in Patients with Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *Clinical oncohematology*. 2024;17(3):256–65. doi: 10.21320/2500-2139-2024-17-3-256-265. (In Russ).

ВВЕДЕНИЕ

Множественная миелома (ММ) — это злокачественное лимфопролиферативное заболевание, субстрат которого составляют терминально дифференцированные плазматические клетки (ПК) клонального происхождения, имеющие aberrантный фенотип [1]. При ММ ПК приобретают способность к пролиферации, а также к секреции парапротеина.

Мутации в генах *KRAS* и *NRAS* найдены в образцах целого ряда злокачественных опухолей [2, 3], в т. ч. при лимфопролиферативных заболеваниях [3–6]. Гены *KRAS* и *NRAS* относятся к одному семейству генов *RAS*, локализованных в хромосомах 12 и 1 соответственно. Схожесть последовательностей ДНК этих генов достигает 84,7 %, основной белок-кодирующий регион представлен экзонами 2–4 (рис. 1, А). Белки Ras (*Nras* и *Kras*) имеют структурное и функциональное сходство, являются ГТФазами

(гидролизуют гуанозинтрифосфат [ГТФ] до гуанозиндифосфата [ГДФ]). В активированной форме данные белки осуществляют передачу сигналов пролиферации и дифференцировки от тирозинкиназных рецепторов на мембране клетки в ядро в составе митоген-активируемого протеинкиназного (mitogen-activated protein kinase, MAPK) сигнального каскада [7]. Активация и инактивация белков Ras осуществляются двумя специфическими белками: GEF (фактор обмена гуаниновых нуклеотидов) и GAP (белок, активирующий ГТФазу). GEF подходит к мембране клетки после активации тирозинкиназного рецептора, катализирует обмен ГДФ на ГТФ в активном центре белка Ras. В результате белок Ras переходит в активированное состояние и связывается с киназой Raf, передающей сигнал далее по MAPK-каскаду в ядро. GAP взаимодействует с белком Ras, повышая его ГТФазную активность. Инактивация белка Ras происходит в результате гидролиза нуклеотида ГТФ до ГДФ (рис. 1, Б) [8].

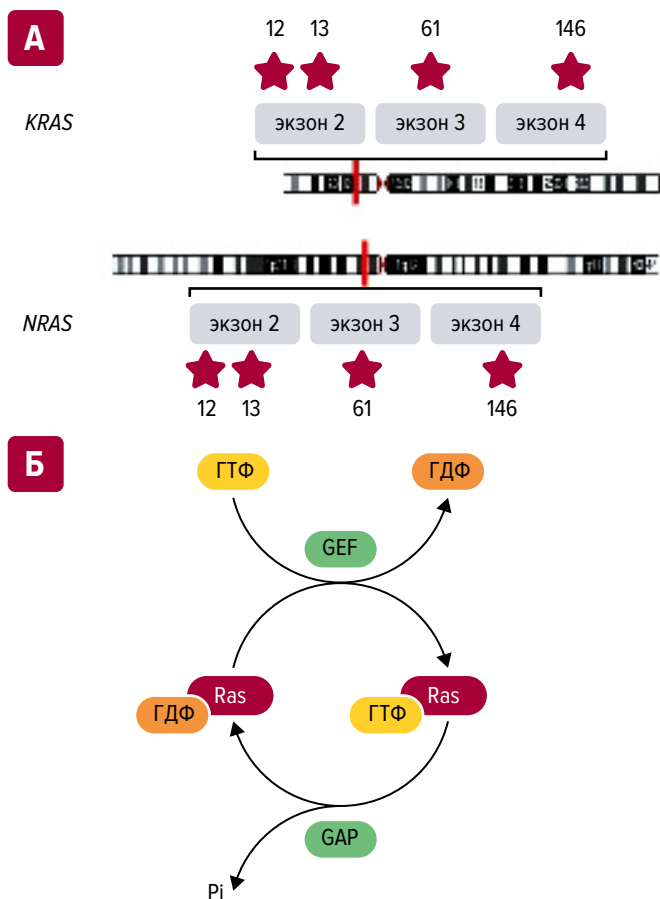


Рис. 1. (А) Структура генов *KRAS* и *NRAS*. Показано положение генов в хромосомах (красные линии), прямоугольниками обозначены экзоны 2–4 в кодирующей последовательности гена. 12, 13, 61, 146 — кодоны, в которых наиболее часто встречаются мутации. (Б) Схема активации и инактивации белков Ras

GAP — белок, активирующий ГТФазу; GEF — фактор обмена гуаниновых нуклеотидов; Pi — фосфат, образующийся в результате гидролиза ГТФ до ГДФ; ГДФ — гуанозиндифосфат; ГТФ — гуанозинтрифосфат.

Fig. 1. (A) Structure of the *KRAS* and *NRAS* genes. The position of genes in chromosomes is shown (red lines), the rectangles indicate exons 2–4 in the coding sequence of the gene. 12, 13, 61, 146 are the codons in which mutations most frequently occur. (B) Diagram of the Ras protein activation/inactivation

GAP — GTPase activating protein; GEF — guanine nucleotide exchange factor; Pi — phosphate released upon the hydrolysis of GTP to GDP; ГДФ — guanosine diphosphate; ГТФ — guanosine triphosphate.

Несмотря на высокое сходство между белками *Nras* и *Kras*, обнаружена значительная корреляция между изоформой, в которой определяется мутация, и вариантом злокачественной опухоли [9, 10]. Из литературы известно, что при раке поджелудочной железы мутации выявляются только в гене *KRAS* и встречаются с частотой 98 %, при колоректальной аденокарциноме мутации в гене *KRAS* наблюдаются в 52 % случаев. В клетках меланомы обнаруживаются мутации только в гене *NRAS* с частотой 29 %, а при аденокарциноме легкого — в гене *KRAS* в 38 % случаев [11, 12]. Для ММ характерно наличие мутаций как в гене *KRAS*, так и в гене *NRAS*. Встречаются они с частотой 38,5–47,0 % при условии использования для определения мутаций метода секвенирования по Сэнгеру или секвенирования нового поколения (NGS) [13–17]. Таким образом, можно

заключить, что в патогенезе почти половины случаев ММ задействованы механизмы, приводящие к появлению мутаций в генах *KRAS* и *NRAS*. В исследованиях спектра генетических нарушений, характерных для ММ, методом полноэкзомного секвенирования было показано, что мутации в генах *KRAS* и *NRAS* встречаются наиболее часто [16, 17]. Это может свидетельствовать об их значимости в патогенезе ММ.

Известно более 130 миссенс-мутаций в генах семейства *RAS* [11]. Ранее было показано, что любая мутация в гене *KRAS* в опухолевых клетках колоректального рака — признак неблагоприятного прогноза в отношении ответа опухоли на таргетную терапию [18–20]. При немелкоклеточном раке легкого мутации Gly12Cys, Gly12Val в гене *KRAS* отрицательно влияли на показатели выживаемости без прогрессирования у этих больных по сравнению с группой пациентов, у которых были найдены другие типы мутаций в этом гене или не было мутаций в нем [20]. В клеточной линии CAPAN-1 ген *KRAS* несет мутацию в кодоне 12. Введение короткой siРНК, ингибирующей синтез белка *Kras*, приводило к торможению бесконтрольного деления клеток. Такой же эффект наблюдался при введении комплементарной ингибиторной siРНК к клеткам — носителям мутации в кодоне 13 гена *KRAS* [21, 22].

В экспериментах на мышах мутация Gly12Asp в гене *KRAS* приводила к усиленной пролиферации клеток эпителия толстой кишки, в то время как мутация Gly12Asp в гене *NRAS* имела другое фенотипическое проявление: клетки эпителия были резистентны к апоптозу [23]. В серии работ исследовалось влияние отдельных вариантов мутаций генов *KRAS* и *NRAS*. Так, наличие мутаций в кодонах 12, 13 (экзон 2) и кодоне 61 (экзон 3) генов семейства *RAS* ведет к потере ГТФазной активности, регулируемой белком GAP. В опубликованных исследованиях было показано, что замена аминокислоты глицина на валин в кодоне 12 приводила к потере взаимодействия с GAP [24]. Мутация в кодоне 13, в результате которой глицин заменялся на аспарагиновую кислоту, коррелировала с уменьшением эффективности GAP-опосредованного гидролиза и значительным увеличением скорости обмена ГДФ на ГТФ. Замена глутамина на лейцин в результате мутации в кодоне 61 приводила к ослаблению взаимодействия Ras с GAP и уменьшению скорости гидролиза ГТФ в активном центре белка Ras [2, 25, 26].

Показано, что миеломные клеточные линии, содержащие мутации в кодоне 12 генов *KRAS* или *NRAS*, характеризуются стабильно высоким уровнем экспрессии соответствующего белка *Kras* или *Nras* и устойчивы к апоптозу, индуцированному доксорубицином [27]. Из литературных данных известно, что в результате появления мутации Gln61Arg в гене *NRAS* в клеточной линии ANBL6 повышается пролиферативная активность клеток одновременно с супрессией апоптоза [28].

Однако исследования на клеточных линиях не вполне отражают картину, наблюдаемую в опухоли у человека, т. к. их свойства на молекулярном уровне отличаются. Эксперименты на клеточных линиях могут только частично моделировать состояние миеломных клеток у пациента [29]. В исследованиях на мышах, которым вводили генно-инженерными методами ДНК-

вектор, содержащий мутацию Gly12Asp в гене *KRAS*, показано, что животные умирали в возрасте 4 мес. от тяжелых миелолипролиферативных расстройств. У мышей с мутацией Gly12Asp в гене *NRAS* к 6 мес. отмечается лимфолипролиферация, выражающаяся в повышенном числе лимфоцитов в крови, периваскулярной инфильтрации лимфоцитами печени и легких, и только к возрасту 15 мес. развиваются различные фатальные гематологические опухоли как лимфоидной, так и миелоидной природы [30, 31]. Одновременная экспрессия белка *Nras* с мутацией Gln61Arg и белка *Myc* приводила к развитию агрессивной ММ у мышей, которая характеризовалась инфильтрацией костного мозга ПК, наличием моноклонального иммуноглобулина в сыворотке, анемии и тромбоцитопении [30]. Важно отметить, что функции белка *Ras* у мышей и человека не полностью совпадают, поэтому результаты, полученные на экспериментальных моделях, не всегда можно экстраполировать на знания о патогенезе заболевания у человека [29]. В связи с этим актуальным остается вопрос о выявлении наиболее значимых мутаций у пациентов с опухолевыми заболеваниями, включая ММ.

Прогностическая значимость мутаций в генах *KRAS* и *NRAS* при ММ оценивалась в серии работ, однако окончательных решений по этому вопросу к настоящему времени не существует [32–40]. Мутации в генах семейства *RAS* связаны с повышенным содержанием ПК в костном мозге, β 2-микроглобулина в крови, остеолитическими повреждениями [37]. ММ почти всегда предшествует бессимптомная стадия в виде моноклональной гаммапатии неясного генеза (МГНГ). Опубликованные данные указывают на увеличение частоты соматических мутаций в генах семейства *RAS* у пациентов с ММ по сравнению с больными МГНГ [38, 41–45]. Плазмноклеточный лейкоз характеризуется повышенной частотой мутаций в генах *KRAS* и *NRAS* по сравнению с ММ [11, 14, 46]. В работе Y. Kim и соавт. выявлено, что наличие мутаций в указанных генах коррелирует с комплексным кариотипом и более коротким периодом времени до прогрессирования заболевания [40]. В группе больных с впервые диагностированной ММ с мутациями в генах семейства *RAS* отмечались худшие показатели выживаемости без прогрессирования (ВБП) и общей выживаемости (ОВ) по сравнению с группой без мутаций [37]. В то же время есть работы, в которых продемонстрировано, что наличие мутаций в генах *RAS* может иметь благоприятное прогностическое значение [47]. На образцах аспириатов костного мозга пациентов с рецидивами ММ было показано, что мутация в гене *NRAS*, но не *KRAS* понижает чувствительность опухолевых клеток к бортезомибу [34]. В другой работе продемонстрировано, что различия в ОВ и ВБП обусловлены в основном мутациями в гене *KRAS* [37].

Таргетная терапия у пациентов с ММ, нацеленная на белки *Ras*, не сопровождалась высокой эффективностью [22, 48]. Из анализа литературных данных можно предположить, что разные типы мутаций в генах семейства *RAS* отличаются по степени влияния на изменение структуры белка, его функции и изменение биохимических каскадов в клетке. Мы полагаем, что классификация мутаций в генах семейства *RAS* на основании их влияния на прогноз у пациентов с ММ позволит

найти более эффективные схемы противоопухолевого лечения. Для оценки влияния аминокислотных замен на функцию белка и биологию опухолевой клетки используют прогностический метод *in silico*. Программы, работающие на основании метода *in silico*, позволяют предсказывать прогностическую роль выявленной генетической поломки, исходя из имеющихся данных о функции той же мутации в другой ткани (клеточной линии) и физико-химических свойств белка при замене аминокислоты в нем. Высокоточными и выверенными зарекомендовали себя статистические программы MutationTaster [49], Polyphen2 [50], FATHMM-XF [51], в основе которых лежат различные алгоритмы по выявлению уровня онкогенного риска мутаций. В алгоритм программ MutationTaster и Polyphen2 также включены данные о пространственной структуре белка.

В качестве вычислительного инструмента в MutationTaster и PolyPhen2 используется наивный байесовский классификатор, согласно которому рассчитывается вероятность выявленной замены нуклеотида стать мутацией, ассоциированной с заболеванием, или безвредным полиморфизмом. В качестве обучающей выборки программа использует информацию из медицинских баз. В программе MutationTaster для каждой мутации также подсчитывается рейтинг мутации — число, выражающее уровень значимости замены исходной аминокислоты на другую аминокислоту на основании различий в физико-химических свойствах [49].

Программа PolyPhen2 использует метод статистического взвешивания и профилирования последовательностей множественного выравнивания. Она позволяет оценивать консервативность аминокислоты и давать заключение о функциональной значимости аллеля. Для обучения программы используется база данных UniProt [52]. Программа применяет алгоритм, основанный на информации об эволюционной консервативности гена. FATHMM-XF также имеет выборку для обучения, как и предыдущие программы. Выборка составлена из базы данных мутаций, связанных с раком, CanProVar и базы данных UniProt. Показано, что FATHMM-XF отличается высокой достоверностью в вычислении драйверных онкогенных мутаций [51].

Цель данного исследования заключается в определении мутаций в генах *KRAS* и *NRAS* у пациентов с впервые диагностированной ММ и классификации их в соответствии с глубиной противоопухолевого ответа на бортезомиб-содержащие схемы индукционной терапии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты

В исследование включено 89 больных с впервые диагностированной ММ, среди них было 45 женщин и 44 мужчины в возрасте 30–82 года (медиана 58,5 года). ММ устанавливали в соответствии с критериями IMWG (2014), оценка противоопухолевого ответа выполнялась согласно критериям IMWG (2016) [53]. У всех больных в первой линии назначалась противоопухолевая терапия по трехкомпонентным схемам, содержащим бортезомиб.

Выделение мононуклеаров из аспирата костного мозга и обогащение образца клетками CD138+

Материалом для данного исследования служили ПК с поверхностным маркером CD138+, выделенные из аспирата костного мозга больных ММ. Для получения фракции ПК CD138+ из аспирата костного мозга выделяли мононуклеарные клетки по стандартному протоколу центрифугирования в градиенте плотности с последующей магнитной сепарацией клеток, экспрессирующих на поверхности маркер CD138, как было описано нами ранее [54]. После сепарации доля клеток с фенотипом CD138+ составляла 45,1–96,0 % (среднее значение $83,8 \pm 14,0$ %, медиана 89 %). Для определения мутаций у 87 больных использовали ПК CD138+. У 2 больных использовали тотальную фракцию мононуклеаров в связи с тем, что количество клеток с фенотипом CD138+ в аспириате костного мозга было недостаточным для анализа.

Выделение ДНК

Геномную ДНК выделяли из ПК CD138+ стандартным методом, описанным нами ранее [54]. Полученный осадок разводили в 20–120 мкл буфера TE в зависимости от количества выделенной ДНК. Образцы ДНК хранились в буфере TE при температуре -20 °С.

Подготовка образцов материала для секвенирования по Сэнгеру

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) для амплификации кодирующей последовательности генов *NRAS* и *KRAS* проводили с использованием реагентов, тест-систем и температурных программ, описанных нами ранее [54]. Полученную реакционную смесь наносили в 6% полиакриламидный (ПААГ) или в 1% агарозный гель и проводили электрофорез. Визуализацию ампликонов выполняли в УФ-свете после окрашивания гелей бромистым этидием. Очистку ПЦР-продуктов для секвенирования осуществляли с использованием колонок Wizard (Promega, США). Эффективность очистки проверяли визуализацией фрагментов в 6% ПААГ или в 1% агарозном геле после электрофореза с последующим окрашиванием.

Секвенирование по Сэнгеру и анализ его результатов

Секвенирование по Сэнгеру проводили в центре коллективного пользования «Геном» ИМБ РАН с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, США) на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, США). Хроматограммы анализировали в программах Ugene и BioEdit, в качестве референсных последовательностей использовали RefSeq NG_007524 для гена *KRAS* и EU332857 для гена *NRAS* из базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Анализ прогностического значения мутаций методом *in silico*

Для выбора группы мутаций высокого риска в генах *KRAS* и *NRAS* проведен анализ с помощью высокоточных протеомных программ MutationTaster [51], Polyphen2 [52], FATHMM-XF [53]. В программе PolyPhen2 анализ прогностической роли мутаций

выполняли с использованием набора HumDiv. Для каждой мутации в программе Polyphen2 высчитывали численное значение рейтинга мутации и соотносили его со шкалой категорий риска. В зависимости от диапазона, в котором оказывалась данная мутация, определялась категория риска: «неопасная», «возможно опасная», «вероятно опасная». В программе FATHMM-XF категория риска имела две градации: «онкогенная» и «онкогенная (высокий риск)». В программе MutationTaster для определения категории риска использовались следующие градации: «вызывающая заболевание», «полиморфизм».

Статистический анализ

Для статистической проверки гипотез о различиях распределений категориальных признаков в группах сравнения применяли таблицы сопряженности. Для оценки значимости использовался двусторонний критерий Фишера с указанием в качестве меры связи отношения шансов (ОШ) с соответствующим 95%-м доверительным интервалом (95% ДИ). Отбор мутаций в группу высокого риска проводился методом многофакторной логистической регрессии с целевым признаком — ответ на бортезомиб-содержащие циклы противоопухолевого лечения и исходным признаком — набор мутаций. Статистический анализ проводили с помощью программного пакета SAS 9.4.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Количественные характеристики мутаций в генах *NRAS* и *KRAS* у пациентов с впервые диагностированной ММ до лечения

В представленной выборке из 89 больных у 37 (42 %) были найдены мутации. Среди пациентов с мутациями у 34 (92 %) обнаружено по одной мутации, 2 (5 %) пациента были носителями 2 мутаций только в гене *KRAS*. У 1 больного мутации имели место в обоих генах: *NRAS* и *KRAS*. В гене *NRAS* мутации выявлены у 20 обследуемых, в гене *KRAS* — у 17. Всего обнаружено 40 мутаций: 20 в гене *NRAS* и 20 в гене *KRAS*. Большинство мутаций (87,5 %) локализовано в кодонах 12, 13 и 61.

По результатам секвенирования по Сэнгеру последовательности ДНК гена *NRAS* наибольшая частота мутаций ($n = 15$) была выявлена в кодоне 61, что составило 75 % от общего числа мутаций в гене *NRAS*. Локализация и количество аминокислотных замен подробно отражены на рис. 2. При исследовании гена *KRAS* обнаружена большая плотность мутаций в кодонах 12, 13 и 61, но распределение оказалось более равномерным, чем в гене *NRAS*. Мутационный процесс в гене *KRAS* затронул экзон 4 в отличие от гена *NRAS* (см. рис. 2). Всего было выявлено 19 вариантов мутаций в генах семейства *RAS*.

Противоопухолевый ответ на индукционную терапию у пациентов с впервые диагностированной ММ до лечения в группах с наличием или отсутствием мутаций в генах семейства *RAS*

Чувствительность опухолевых клеток с мутациями в генах семейства *RAS* к индукционной терапии по

трехкомпонентным бортезомиб-содержащим схемам оценена у 75 пациентов. У 42 из них мутаций в генах *RAS* не выявлено, а у 33 пациентов они обнаружены. Эффективность терапии определяли по частоте достижения глубокого ответа. Глубоким считали ответ при достижении полной ремиссии (ПР) или очень хорошей частичной ремиссии (охЧР) ко времени окончания 6 циклов индукционной терапии. В результате проведенного анализа выяснилось, что у 27 (64 %) из 42 больных без мутаций и только у 11 (33 %) из 33 — с мутациями достигнут глубокий ответ (ПР + охЧР) (рис. 3). Различия оказались статистически значимыми (ОШ 3,5; 95% ДИ 1,32–9,08; $p = 0,008$). Таким образом, у пациентов с впервые диагностированной ММ частота глубокого ответа (ПР + охЧР) в группе без мутаций в генах *RAS* в 2 раза превышала этот показатель в группе с наличием указанных генетических нарушений.

Функциональное исследование мутаций методом анализа белковых структур

В работе использовались три компьютерные (*in silico*) предсказательные программы для определения прогностического значения различных вариантов мутаций, выявленных в генах *NRAS* и *KRAS* опухолевых ПК у пациентов с ММ (табл. 1).

По результатам анализа с использованием программы MutationTaster оказалось, что выявленные мутации с вероятностью 0,99 и более вносят вклад в развитие заболевания. По результатам предсказательного анализа в программах Polyphen2 и FATHMM-XF установлены различия в оценке роли обнаруженных мутаций. Вероятности, вычисленные с помощью программ, и заключения о прогностической роли различных типов мутаций представлены в табл. 1. На основании проведенного анализа с использованием трех биоинформатических программы сформировали группу высокого риска *in silico*, в которую включили 12 мутаций, имевших наиболее высокую суммарную оценку уровня прогностической значимости. В соответствии с этими критериями группа высокого риска *in silico* состояла из 4 мутаций в гене *NRAS* (Gly12Ala, Gly13Arg, Gln61Leu, Gln61Lys) и 8 мутаций в гене *KRAS* (Gly12Val, Gly12Ala, Gly13Asp, Leu19Phe, Tyr64Asn, Lys104Arg, Ala146Pro, Ala146Val) (см. табл. 1, красный шрифт). Взаимосвязи между наличием мутаций, выделенных в группу высокого риска *in silico*, и эффективностью индукционной терапии у больных ММ не выявлено. Не исключено, что такой результат объясняется недостаточной чувствительностью программ, использованных в настоящем исследовании.

Классификация вариантов мутаций в генах семейства *RAS* с учетом эффективности ответа на индукционную терапию по трехкомпонентным бортезомиб-содержащим схемам у пациентов с впервые диагностированной ММ до начала лечения

Для выявления статистически значимых мутаций в генах семейства *RAS* был проведен многофакторный анализ с полным перебором исходных признаков — вариантов мутаций и целевым признаком в виде от-

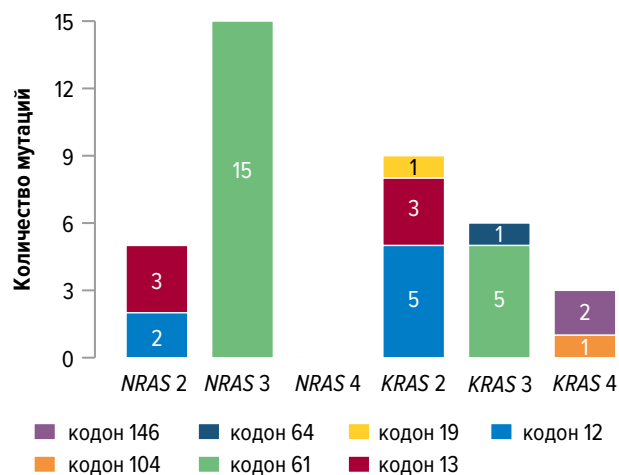


Рис. 2. Количество мутаций в кодонах генов *NRAS* и *KRAS*. Столбцы обозначают экзоны генов *NRAS* и *KRAS*: *NRAS* 2/3/4 — экзоны 2, 3 и 4; *KRAS* 2/3/4 — экзоны 2, 3 и 4. Столбцы окрашены в различные цвета. Каждый цвет соответствует определенному кодону. Например, в экзоне 2 гена *NRAS* выявлено 2 мутации в кодоне 12 и 3 — в кодоне 13

Fig. 2. The number of mutations in the codons of the *NRAS* and *KRAS* genes. Columns denote the exons of the *NRAS* and *KRAS* genes: *NRAS* 2/3/4 — exons 2, 3, and 4; *KRAS* 2/3/4 — exons 2, 3, and 4. Columns have different colors. Each color corresponds to a specific codon. For example, in exon 2 of the *NRAS* gene, there are 2 mutations in codon 12 and 3 mutations in codon 13

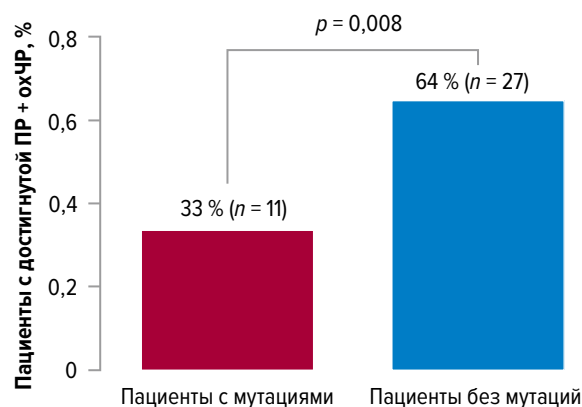


Рис. 3. Частота достижения глубокого противоопухолевого ответа (ПР + охЧР) у пациентов после 6 циклов индукционной терапии по трехкомпонентным схемам, включающим бортезомиб, в группах с наличием или отсутствием мутаций в генах семейства *RAS*

охЧР — очень хорошая частичная ремиссия; ПР — полная ремиссия.

Fig. 3. The rate of deep antitumor response (CR + VGPR) in recipients of 6 cycles of bortezomib-based triplet induction therapy depending on mutations in the *RAS* family genes

охЧР — very good partial remission; ПР — complete remission.

вета на лечение по бортезомиб-содержащим схемам. В анализ включено 33 пациента, у которых выявлена мутация и известен ответ на терапию после 6 циклов. У 22 пациентов глубокий ответ не достигнут, в то время как у 11 — документирована ПР + охЧР. Основываясь на этих результатах, мы выбрали 7 вариантов мутаций, которые встречались у пациентов без достигнутой ПР + охЧР: *NRAS* Gly13Asp, Gln61His; *KRAS* Gly12Ala, Gly12Val, Gln61Arg, Gln61His, Ala146Val. В эту же группу включены также две мутации, *KRAS* Gly12Asp и *KRAS* Gly13Asp, наличие которых, по

Таблица 1. Оценка прогностического значения мутаций в генах *NRAS* и *KRAS* с помощью биоинформатических программ MutationTaster, PolyPhen2 и FATHMM-XF

Ген	Мутация	Вероятность по PolyPhen2	Заключение по PolyPhen2*	Вероятность по FATHMM-XF	Заключение по FATHMM-XF*	Вероятность по MutationTaster	Заключение по MutationTaster*
<i>NRAS</i>	Gly12Ala	0,848	Возможно опасная	0,84	Онкогенная	1	Вызывающая заболевание
	Gly12Asp	0,488	Возможно опасная	0,86	Онкогенная	1	Вызывающая заболевание
	Gly13Asp	0,434	Неопасная	0,86	Онкогенная	1	Вызывающая заболевание
	Gly13Arg	0,999	Вероятно опасная	0,84	Онкогенная	1	Вызывающая заболевание
	Gln61Leu	0,925	Возможно опасная	0,87	Онкогенная	1	Вызывающая заболевание
	Gln61Lys	0,861	Возможно опасная	0,93	Онкогенная (высокий риск)	0,99	Вызывающая заболевание
	Gln61His	0,124	Неопасная	0,75	Онкогенная	1	Вызывающая заболевание
	Gln61Arg	0,085	Неопасная	0,88	Онкогенная	0,99	Вызывающая заболевание
<i>KRAS</i>	Gly12Val	0,999	Вероятно опасная	0,92	Онкогенная (высокий риск)	1	Вызывающая заболевание
	Gly12Asp	0,517	Возможно опасная	0,91	Онкогенная (высокий риск)	1	Вызывающая заболевание
	Gly12Ala	0,956	Возможно опасная	0,92	Онкогенная (высокий риск)	1	Вызывающая заболевание
	Gly13Asp	0,803	Возможно опасная	0,91	Онкогенная (высокий риск)	1	Вызывающая заболевание
	Leu19Phe	1,000	Вероятно опасная	0,78	Онкогенная	1	Вызывающая заболевание
	Gln61Arg	0,009	Неопасная	0,91	Онкогенная (высокий риск)	1	Вызывающая заболевание
	Gln61His	0,033	Неопасная	0,81	Онкогенная	0,99	Вызывающая заболевание
	Tyr64Asn	1,000	Вероятно опасная	0,91	Онкогенная (высокий риск)	1	Вызывающая заболевание
	Lys104Arg	0,999	Вероятно опасная	0,91	Онкогенная (высокий риск)	0,99	Вызывающая заболевание
	Ala146Pro	1,000	Вероятно опасная	0,97	Онкогенная (высокий риск)	0,99	Вызывающая заболевание
	Ala146Val	0,998	Вероятно опасная	0,94	Онкогенная (высокий риск)	0,99	Вызывающая заболевание

ПРИМЕЧАНИЕ. Красным шрифтом выделены мутации, относящиеся к группе высокого риска *in silico*.

* Во всех трех программах для каждой мутации определяли численное значение рейтинга мутации и соотносили его со шкалой категорий риска. В зависимости от диапазона, в котором оказывалась данная мутация, устанавливалась категория риска по определенным градациям. Программа Polyphen2 — «неопасная», «возможно опасная», «вероятно опасная»; программа FATHMM-XF — «онкогенная» и «онкогенная (высокий риск)»; программа MutationTaster — «вызывающая заболевание», «полиморфизм».

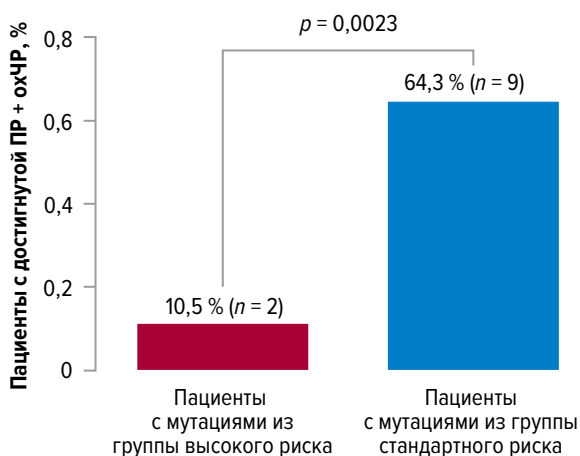


Рис. 4. Частота достижения глубокого противоопухолевого ответа (ПР + охЧР) у пациентов после 6 бортезомиб-содержащих индукционных циклов с учетом наличия или отсутствия мутаций из группы высокого риска в генах семейства *RAS*
охЧР — очень хорошая частичная ремиссия; ПР — полная ремиссия.

Fig. 4. The rate of deep antitumor response (CR + VGPR) in recipients of 6 bortezomib-based induction cycles depending on high-risk mutations in the *RAS* family genes
охЧР — very good partial remission; ПР — complete remission.

литературным данным, достаточно для неопластической трансформации клеток. Кроме того, их наличие ассоциировалось с худшей выживаемостью пациентов с опухолевыми заболеваниями [27, 55]. Данный набор мутаций определил новую группу высокого риска для пациентов. Число носителей мутаций из группы высокого риска в нашей выборке составило 19 (57,6 %) из

33, других мутаций — 14 (42,4 %). Частота глубокого ответа на лечение по бортезомиб-содержащим схемам в группе пациентов с неблагоприятными мутациями составила 10,5 % (2 из 19 больных), в стандартной группе — 64,3 % (9 из 14) (ОШ 14,9; 95% ДИ 3,11–71,12; $p = 0,0023$). Следовательно, удалось статистически значимо доказать, что среди мутаций в генах семейства *RAS* имеются варианты, связанные с худшим ответом на терапию по схемам, содержащим бортезомиб (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования установлено, что частота мутаций в опухолевых ПК у пациентов с ММ в дебюте заболевания составляет 42 %. Наши данные совпадают с результатами исследования Национального института рака США, в соответствии с которыми частота мутаций в генах *NRAS* и *KRAS* у пациентов с ММ составляет 43 % (The Cancer Genome Atlas, TCGA) [56]. По литературным данным, частота мутаций у пациентов с ММ варьирует от 0 до 100 %. Широкая вариабельность, возможно, связана одновременно с несколькими факторами, такими как малый объем выборки, различный биоматериал для исследования (моноклеарные клетки или отсортированные ПК), чувствительность методов определения мутаций [57]. Необходимо обратить внимание на то, что минимальная частота мутаций была выявлена методами с низким разрешением, такими как саузерн-блоттинг и анализ полиморфизма длин

рестрикционных фрагментов. Кроме того, в исследовании, где мутации не были обнаружены, для анализа использовались мононуклеарные клетки, которые представлены лимфоцитами, в т. ч. ПК, и моноцитами. По нашим данным, возможности выявления мутаций ниже, если для этой цели используются мононуклеарные клетки, а не ПК костного мозга CD138+ [58]. В большинстве исследований частота мутаций варьировала от 20 и до 55 %. Например, методом анализа конформационного полиморфизма ДНК мутации в генах семейства *RAS* были выявлены с частотой 23 % при объеме выборки 102 пациента [57]. По данным, полученным высокочувствительным методом полноэкзомного секвенирования костномозговых клеток у 67 пациентов, частота мутаций при ММ составила 55 % [32].

В настоящем исследовании для изучения мутаций в генах *KRAS* и *NRAS* у пациентов с ММ использовались тест-системы, позволяющие выявить замены нуклеотидов во всей кодирующей области гена целиком. Полученные данные мы сопоставили с результатами 2 исследований, выполненных с применением метода полноэкзомного секвенирования [15, 17]. В гене *KRAS* частота мутаций была сопоставимой и составила 50 % по нашим данным и 43–50 % — по литературным [15, 17]. Мутации чаще всего обнаруживались в кодонах 12, 13 и 61. Следует отметить, что в нашем исследовании найдены единичные мутации в других кодонах: 19, 64, 104. В некоторых исследованиях были выявлены редко встречающиеся варианты мутаций в кодонах 7, 18, 22, 59, 60 гена *KRAS* [15, 17]. Интересно отметить, что были обнаружены мутации в кодонах 117 и 146 гена *KRAS* [15, 17], которые имеют прогностическое значение при колоректальном раке [59]. Наиболее распространенными, по нашим и литературным данным, были мутации в кодоне 61 гена *NRAS*: Gln61Lys, Gln61His, Gln61Arg.

Ранее в исследованиях, выполнявшихся в ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ [54, 58], при меньшей выборке было показано, что мутации в генах семейства *RAS* могут быть признаком неблагоприятного прогноза. В частности, выявлено, что мутации в генах *RAS* при ММ ухудшают показатели ВБП, особенно в случае сочетанной гиперэкспрессии гена *c-MYC* [57]. Интересно отметить, что наличие мутации в генах *RAS* не влияет на показатели ВБП и ОВ у больных с ММ, принимающих в первой линии терапии иммуномодулирующие препараты (леналидомид или талидомид) [60]. В настоящем исследовании пациенты получали лечение по трехкомпонентной схеме PAD или VCD. Результаты нашей работы доказывают, что наличие любых мутаций в генах семейства *RAS* при ММ приводит к снижению частоты ответа, соответствующего критериям ПР и охЧР, на комбинированную противоопухолевую терапию, включающую бортезомиб. Попытки оценить влияние мутаций в генах *RAS* на течение ММ неоднократно предпринимались в различных исследованиях. В некоторых из них продемонстрировано, что мутации только в гене *NRAS*, но не в *KRAS* влияют на эффективность лечения, причем бортезомиб пациенты получали в монорежиме [34]. В тех случаях, когда бортезомиб применялся в комбинации с дексаметазоном, мутации в гене *NRAS*

не влияли на эффективность терапии [34]. В другом исследовании показано, что мутации в генах *KRAS* и *NRAS* ассоциировались с более агрессивным течением ММ. При этом мутация в гене *KRAS* в отличие от *NRAS* оказывала влияние на эффективность терапии [57].

Нами предпринята попытка систематизировать варианты мутаций в генах *KRAS* и *NRAS* у больных ММ с учетом результатов терапии по трехкомпонентным схемам, включавшим бортезомиб. На основании клинических данных нам удалось определить группу из 9 мутаций, наличие которых коррелировало с недостаточной эффективностью индукционной терапии: *NRAS* Gly13Asp, Gln61His; *KRAS* Gly12Ala, Gly12Asp, Gly12Val, Gly13Asp, Gln61Arg, Gln61His, Ala146Val. Преимущественно это были мутации в гене *KRAS*. Ранее сообщалось, что мутации в кодонах 12, 13, 61 гена *KRAS* были связаны с большей опухолевой нагрузкой, более высоким уровнем $\beta 2$ -микроглобулина, большим числом ПК в костном мозге и более поздней стадией ММ по шкале ISS [57]. В настоящей работе продемонстрировано, что наличие мутации Ala146Val в гене *KRAS* коррелировало с меньшей эффективностью лечения ММ по трехкомпонентным бортезомиб-содержащим схемам. Ранее было показано, что мутации в кодонах 117 и 146 гена *KRAS* коррелируют с недостаточной эффективностью терапии таргетными препаратами при колоректальном раке и других солидных опухолях [59, 61]. К сожалению, наши ожидания, связанные с использованием статистических предсказательных протеомных программ MutationTaster, Polyphen2 и FATHMM-XF, не оправдались.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании предпринята попытка систематизации (классификации) мутаций в генах семейства *RAS*, выявленных в ПК больных с впервые диагностированной ММ до начала противоопухолевого лечения. Определена группа мутаций высокого риска, отрицательно влияющих на эффективность терапии по трехкомпонентным схемам, включающим бортезомиб. По результатам проведенного исследования наиболее значимыми оказались 9 вариантов мутаций: *NRAS* Gly13Asp, Gln61His; *KRAS* Gly12Ala, Gly12Asp, Gly12Val, Gly13Asp, Gln61Arg, Gln61His, Ala146Val. В обозначенной группе из 9 прогностически неблагоприятных мутаций, выделенных в настоящем исследовании, преобладали нарушения в гене *KRAS*. Накопленные клинические данные позволяют предположить, что влияние мутаций в генах *KRAS* и *NRAS* на течение ММ зависит от назначенной схемы противоопухолевого лечения. Группа из 9 мутаций, определяющих высокий риск, представленная выше, сформирована на основании клинических данных и вполне может использоваться гематологами для прогнозирования ответа на терапию по трехкомпонентным бортезомиб-содержащим схемам в первой линии. Хотелось бы особо подчеркнуть, что прогностическая роль представленной группы из 9 мутаций в генах семейства *RAS*, сформированная по результатам анализа клинических данных, может быть проверена на расширенной независимой вы-

борке для подтверждения валидности результатов исследования.

УВЕДОМЛЕНИЯ/ACKNOWLEDGMENT

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

DISCLOSURE. The authors declare no conflicts of interest.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ. Исследование не имело спонсорской поддержки.

FUNDING. This study received no external financial support.

ВКЛАД АВТОРОВ. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства, согласно международным критериям ICMJE. При этом наибольший вклад распределен следующим образом.

Концепция и дизайн: А.М. Сергеева, В.Л. Сурин, Л.П. Менделеева.

Сбор и обработка данных: все авторы.

Предоставление материалов исследования:

А.М. Сергеева, А.А. Крайзман, М.В. Соловьев.

Анализ и интерпретация данных: А.М. Сергеева, Ю.А. Чабаяева, С.М. Куликов.

Подготовка рукописи: А.М. Сергеева.

Окончательное одобрение рукописи: Л.П. Менделеева.

AUTHOR CONTRIBUTION. All authors meet the ICMJE criteria for authorship and declare their special contribution as follows:

Conception and design: A.M. Sergeeva, V.L. Surin, L.P. Mendeleeva.

Data collection and processing: all authors.

Research materials provision: A.M. Sergeeva,

A.A. Kraizman, M.V. Solovev.

Data analysis and interpretation: A.M. Sergeeva,

Yu.A. Chabaeva, S.M. Kulikov.

Manuscript writing: A.M. Sergeeva.

Final approval of manuscript: L.P. Mendeleeva.

СОГЛАСИЕ НА ПУБЛИКАЦИЮ. Не требуется.

CONSENT FOR PUBLICATION. Not required.

ЭТИЧЕСКОЕ ОДОБРЕНИЕ. Не требуется.

ETHICS APPROVAL. Not required.

БЛАГОДАРНОСТИ. Авторы выражают благодарность Д.М. Чернецкой за консультацию по использованию протеомных программ.

ACKNOWLEDGMENTS. The authors thank D.M. Chernetskaya for her advice on the use of proteomic programs.

ORCID

А.М. Сергеева — <https://orcid.org/0000-0003-4863-4902>

В.Л. Сурин — <https://orcid.org/0000-0002-1890-4492>

Ю.А. Чабаяева — <https://orcid.org/0000-0001-8044-598X>

А.А. Крайзман — <https://orcid.org/0000-0003-1934-8800>

М.В. Соловьев — <https://orcid.org/0000-0002-7944-6202>

С.М. Куликов — <https://orcid.org/0000-0002-6288-7570>

Л.П. Менделеева — <https://orcid.org/0000-0002-4966-8146>

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th edition. Lyon: IARC Press; 2017.
2. Prior I, Lewis P, Mattos C. A Comprehensive Survey of Ras Mutations in Cancer. *Cancer Res.* 2012;72(10):2457–67. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2612.
3. Cooper GM. *Oncogenes*. 2nd edition. Massachusetts: Jones and Bartlett Publishers; 1995.
4. Barbacid M. Ras genes. *Annu Rev Biochem.* 1987;56:779–827. doi: 10.1146/annurev.bi.56.070187.004023.
5. Wang J, Liu Y, Li Z, et al. Endogenous Oncogenic Nras Mutation Initiates Hematopoietic Malignancies in a Dose- and Cell Type-Dependent Manner. *Blood.* 2011;118(2):368–79. doi: 10.1182/blood-2010-12-326058.
6. Neri A, Knowlton DM, Greco A, et al. Analysis of RAS Oncogene Mutations in Human Lymphoid Malignancies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85(23):9268–72. doi: 10.1073/pnas.85.23.9268.
7. Hancock JF. Ras Proteins: Different Signals from Different Locations. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(5):373–84. doi: 10.1038/nrm1105.
8. Bos J, Rehmann H, Wittinghofer A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell.* 2007;129(5):865–77. doi: 10.1016/j.cell.2007.05.018.
9. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, et al. Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the cBioPortal. *Sci Signal.* 2013;6(269):11. doi: 10.1126/scisignal.2004088.
10. Forbes SA, Beare D, Gunasekaran P, et al. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(Database issue):D805–D811. doi: 10.1093/nar/gku1075.
11. Hobbs GA, Der CJ, Rossman KL. RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *J Cell Sci.* 2016;129(7):1287–92. doi: 10.1242/jcs.182873.
12. Zhang J, Wang J, Liu Y, et al. Oncogenic Kras-induced leukemogenesis: hematopoietic stem cells as the initial target and lineage-specific progenitors as the potential targets for final leukemic transformation. *Blood.* 2009;113(6):1304–14. doi: 10.1182/blood-2008-01-134262.
13. Manier S, Park J, Capelletti M, et al. Whole-exome sequencing of cell-free DNA and circulating tumor cells in multiple myeloma. *Nat Commun.* 2018;9(1):1691. doi: 10.1038/s41467-018-04001-5.
14. Neri A, Murphy JP, Cro L, et al. Ras Oncogene Mutation in Multiple Myeloma. *J Exp Med.* 1989;170(5):1715–25. doi: 10.1084/jem.170.5.1715.
15. Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, et al. Heterogeneity of Genomic Evolution and Mutational Profiles in Multiple Myeloma. *Nat Commun.* 2014;5:2997. doi: 10.1038/ncomms3997.
16. Walker BA, Boyle EM, Wardell CP, et al. Europe PMC Funders Group Mutational Spectrum, Copy Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma. *J Clin Oncol.* 2015;33(33):3911–20. doi: 10.1200/JCO.2014.59.1503.
17. Bolli N, Biancon G, Moarii M, et al. Analysis of the genomic landscape of multiple myeloma highlights novel prognostic markers and disease subgroups. *Leukemia.* 2018;32(12):2604–16. doi: 10.1038/s41375-018-0037-9.
18. Kumar A, Adhikari S, Kankainen M, Heckman CA. Comparison of Structural and Short Variants Detected by Linked-Read and Whole-Exome Sequencing in Multiple Myeloma. *Cancers (Basel).* 2021;13(6):1212. doi: 10.3390/cancers13061212.
19. Bezieau S, Devilder MC, Avet-Loiseau H, et al. High incidence of N and K-Ras activating mutations in multiple myeloma and primary plasma cell leukemia at diagnosis. *Hum Mutat.* 2001;18(3):212–24. doi: 10.1002/humu.1177.
20. Johnson JC, Burkhart DL, Haigis KM. Classification of KRAS-Activating Mutations and the Implications for Therapeutic Intervention. *Cancer Discov.* 2022;12(4):913–23. doi: 10.1158/2159-8290.CD-22-0035.
21. Raponi M, Winkler H, Dracopoli NC. KRAS mutations predict response to EGFR inhibitors. *Curr Opin Pharmacol.* 2008;8(4):413–8. doi: 10.1016/j.coph.2008.06.006.
22. Ihle NT, Byers LA, Kim ES, et al. Effect of KRAS oncogene substitutions on protein behavior: implications for signaling and clinical outcome. *J Natl Cancer Inst.* 2012;104(3):228–39. doi: 10.1093/jnci/djr523.
23. Ke N, Albers A, Claassen G, et al. One-week 96-well soft agar growth assay for cancer target validation. *Biotechniques.* 2004;36(5):826–33. doi: 10.2144/04365ST07.

24. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(1):11–22. doi: 10.1038/nrc969.
25. Parikh C, Subrahmanyam R, Ren R. Oncogenic NRAS, KRAS, and HRAS exhibit different leukemogenic potentials in mice. *Cancer Res*. 2007;67(15):7139–46. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0778.
26. Smith MJ, Neel BG, Ikura M. NMR-based functional profiling of RASopathies and oncogenic RAS mutations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(12):4574–9. doi: 10.1073/pnas.1218173110.
27. Clark GJ, Cox AD, Graham SM, Der CJ. Biological assays for Ras transformation. *Methods Enzymol*. 1995;255:395–412. doi: 10.1016/s0076-6879(95)55042-9.
28. Ostrem JM, Shokat KM. Direct small-molecule inhibitors of KRAS: from structural insights to mechanism-based design. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;15(11):771–85. doi: 10.1038/nrd.2016.139.
29. Rowley M, Van Ness B. Activation of N-ras and K-ras induced by interleukin-6 in a myeloma cell line: implications for disease progression and therapeutic response. *Oncogene*. 2002;21(57):8769–75. doi: 10.1038/sj.onc.1205387.
30. Billadeau D, Jelinek DF, Shah N, et al. Introduction of an activated N-ras oncogene alters the growth characteristics of the interleukin 6-dependent myeloma cell line ANBL6. *Cancer Res*. 1995;55(16):3640–6.
31. Hamad NM, Elconin JH, Karnoub AE, et al. Distinct requirements for Ras oncogenesis in human versus mouse cells. *Genes Dev*. 2002;16(16):2045–57. doi: 10.1101/gad.993902.
32. Wen Z, Rajagopalan A, Flietner ED, et al. Expression of NrasQ61R and MYC transgene in germinal center B cells induces a highly malignant multiple myeloma in mice. *Blood*. 2021;137(1):61–74. doi: 10.1182/blood.2020007156.
33. Li Q, Haigis KM, McDaniel A, et al. Hematopoiesis and leukemogenesis in mice expressing oncogenic NrasG12D from the endogenous locus. *Blood*. 2011;117(6):2022–32. doi: 10.1182/blood-2010-04-280750.
34. Prideaux SM, Conway O'Brien E, Chevassut TJ. The genetic architecture of multiple myeloma. *Adv Hematol*. 2014;2014:864058. doi: 10.1155/2014/864058.
35. Mulligan G, Lichter DI, Di Bacco A, et al. Mutation of NRAS but not KRAS significantly reduces myeloma sensitivity to single-agent bortezomib therapy. *Blood*. 2014;123(5):632–9. doi: 10.1182/blood-2013-05-504340.
36. Gebauer N, Biersack H, Czerwinska AC, et al. Favorable prognostic impact of RAS mutation status in multiple myeloma treated with high-dose melphalan and autologous stem cell support in the era of novel agents: a single center perspective. *Leuk Lymphoma*. 2016;57(1):226–9. doi: 10.3109/10428194.2015.1046863.
37. Steinbrunn T, Stuhmer T, Gattenlohner S, et al. Mutated RAS and constitutively activated Akt delineate distinct oncogenic pathways, which independently contribute to multiple myeloma cell survival. *Blood*. 2011;117(6):1998–2004. doi: 10.1182/blood-2010-05-284422.
38. Chng WJ, Gonzalez-Paz N, Price-Troska T, et al. Clinical and biological significance of RAS mutations in multiple myeloma. *Leukemia*. 2008;22(12):2280–4. doi: 10.1038/leu.2008.142.
39. Rasmussen T, Kuehl M, Lodahl M, et al. Possible roles for activating RAS mutations in the MGUS to MM transition and in the intramedullary to extramedullary transition in some plasma cell tumors. *Blood*. 2005;105(1):317–23. doi: 10.1182/blood-2004-03-0833.
40. Leich E, Steinbrunn T. RAS mutations – for better or for worse in multiple myeloma?. *Leuk Lymphoma*. 2016;57(1):8–9. doi: 10.3109/10428194.2015.1065984.
41. Kim Y, Park SS, Min CK, et al. KRAS, NRAS, and BRAF mutations in plasma cell myeloma at a single Korean institute. *Blood Res*. 2020;55(3):159–68. doi: 10.5045/br.2020.2020137.
42. Weiss BM, Abadie J, Verma P, et al. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood*. 2009;113(22):5418–22. doi: 10.1182/blood-2008-12-195008.
43. Chng WJ, Glebov O, Bergsagel PL, Kuehl WM. Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007;20(4):571–96. doi: 10.1016/j.beha.2007.08.004.
44. Bustoros M, Sklavenitis-Pistofidis R, Park J, et al. Genomic Profiling of Smoldering Multiple Myeloma Identifies Patients at a High Risk of Disease Progression. *J Clin Oncol*. 2020;38(21):2380–9. doi: 10.1200/JCO.20.00437.
45. Greenberg AJ, Rajkumar SV, Vachon CM. Familial monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma: epidemiology, risk factors, and biological characteristics. *Blood*. 2012;119(23):5359–66. doi: 10.1182/blood-2011-11-387324.
46. Mikulasova A, Wardell CP, Murison A, et al. The spectrum of somatic mutations in monoclonal gammopathy of undetermined significance indicates a less complex genomic landscape than that in multiple myeloma. *Haematologica*. 2017;102(9):1617–25. doi: 10.3324/haematol.2017.163766.
47. Downward J. RAS Synthetic Lethal Screens Revisited: Still Seeking the Elusive Prize?. *Clin Cancer Res*. 2015;21(8):1802–9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2180.
48. John L, Krauth MT, Podar K, Raab MS. Pathway-Directed Therapy in Multiple Myeloma. *Cancers (Basel)*. 2021;13(7):1668. doi: 10.3390/cancers13071668.
49. Schwarz JM, Rodelsperger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods*. 2010;7(8):575–6. doi: 10.1038/nmeth0810-575.
50. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7(4):248–9. doi: 10.1038/nmeth0410-248.
51. Shihab HA, Gough J, Cooper DN, et al. Predicting the functional consequences of cancer-associated amino acid substitutions. *Bioinformatics*. 2013;29(12):1504–10. doi: 10.1093/bioinformatics/btt182.
52. Kerr ID, Cox HC, Moyes K, et al. Assessment of in silico protein sequence analysis in the clinical classification of variants in cancer risk genes. *J Community Genet*. 2017;8(2):87–95. doi: 10.1007/s12687-016-0289-x.
53. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2016;17(8):e328–e346. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30206-6.
54. Сергеева А.М., Абрамова Т.В., Сурин В.Л. и др. Сравнение молекулярно-генетической структуры опухолевых клеток до лечения и после констатации рецидива множественной миеломы (краткий обзор и описание клинического случая). *Гематология и трансфузиология*. 2019;64(3):362–74. doi: 10.35754/0234-5730-2019-64-3-362-374. [Sergeeva A.M., Abramova T.V., Surin V.L., et al. Molecular Genetic Structure of Multiple Myeloma Tumour Cells Prior to Treatment and at the Time of Relapse: Short Review and Case Report. *Russian journal of hematology and transfusiology*. 2019;64(3):362–74. doi: 10.35754/0234-5730-2019-64-3-362-374. (In Russ)]
55. Tuveson DA, Shaw AT, Willis NA, et al. Endogenous oncogenic K-ras(G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects. *Cancer Cell*. 2004;5(4):375–87. doi: 10.1016/s1535-6108(04)00085-6.
56. Silva TC, Colaprico A, Olsen C, et al. TCGA Workflow: Analyze cancer genomics and epigenomics data using Bioconductor packages. *F1000Res*. 2016;5:1542. doi: 10.12688/f1000research.8923.2.
57. Chng WJ, Gonzalez-Paz N, Price-Troska T, et al. Clinical and biological significance of RAS mutations in multiple myeloma. *Leukemia*. 2008;22(12):2280–4. doi: 10.1038/leu.2008.142.
58. Нарейко М.В. Особенности экспрессии генов C-MYC, CCND1, MMSET и мутационный статус семейства RAS при множественной миеломе: Дис. ... канд. мед. наук. М., 2017. 128 с. [Nareiko M.V. Osobennosti ekspressii genov C-MYC, CCND1, MMSET i mutatsionnyi status genov semeistva RAS pri mnozhestvennoi mielome. (Characteristic features of the C-MYC, CCND1, and MMSET gene expression and mutation status in the gene family RAS in multiple myeloma.) [dissertation] Moscow, 2017. 128 p. (In Russ)]
59. Janakiraman M, Vakiani E, Zeng Z, et al. Genomic and biological characterization of exon 4 KRAS mutations in human cancer. *Cancer Res*. 2010;70(14):5901–11. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0192.
60. Jones JR, Weinhold N, Ashby C, et al. Clonal evolution in myeloma: the impact of maintenance lenalidomide and depth of response on the genetics and sub-clonal structure of relapsed disease in uniformly treated newly diagnosed patients. *Haematologica*. 2019;104(7):1440–50. doi: 10.3324/haematol.2018.202200.
61. Cercek A, Braghiroli MI, Chou JF, et al. Clinical Features and Outcomes of Patients with Colorectal Cancers Harboring NRAS Mutations. *Clin Cancer Res*. 2017;23(16):4753–60. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0400.