

Предварительная версия статьи, поступившей в редакцию журнала.  
Дата поступления: 05.02.2024

### НА ЗАМЕТКУ

Данная статья поступила в редакцию журнала и будет опубликована после прохождения рецензирования, корректуры, редактуры и вёрстки. После этого будет назначен том и номер выпуска журнала, в котором статья будет опубликована в окончательной редакции. После публикации в окончательной редакции статья будет удалена из данного раздела.

Следует обратить внимание на то, что статьи в данном разделе не содержат всех библиографических данных. Они будут присвоены только после включения статьи в тот или иной номер журнала.

Кроме того, в процессе подготовки статьи к публикации, после снятия вопросов с авторами могут произойти изменения в её содержании, текст статьи может измениться перед окончательной публикацией.

## Влияние мутаций в генах *KRAS* и *NRAS*, выявленных в дебюте множественной миеломы, на эффективность бортезомиб-содержащих схем индукционной терапии.

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

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

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

### Реферат

**Обоснование.** Наиболее распространенными точечными мутациями при множественной миеломе (ММ) являются мутации в генах *KRAS* и *NRAS*. Прогностическая значимость мутаций в этих генах при ММ оценивалась в серии работ, однако, результаты носят противоречивый характер.

**Цель.** Определить онкогенность мутаций в генах *KRAS* и *NRAS* у первичных больных ММ и классифицировать их по влиянию на глубину противоопухолевого ответа на бортезомиб-содержащие схемы индукционной терапии.

**Методы.** В исследование включено 89 больных с установленным диагнозом ММ до начала лечения. Плазматические клетки КМ пациентов выделяли с помощью градиентного метода с последующей иммуномагнитной селекцией по маркеру CD138. Мутации в генах *KRAS* и *NRAS* в CD138+ клетках определяли методом секвенирования по Сэнгеру. Для установления уровня онкогенности мутаций использовали протеомные программы Mutation Taster, Polyphen2, FATHMM-XF. Глубину ответа оценивали после проведения 6 курсов бортезомиб-содержащих схем терапии. Статистический анализ проводили с помощью процедур пакета SAS.

**Результаты.** Частота встречаемости мутаций в генах *RAS* составила 42% (37 из 89

пациентов). Было показано, что наличие мутации в генах *RAS* отрицательно влияет на эффективность индукционной терапии бортезомиб-содержащими схемами ( $p=0.008$ , ОШ = 3.5 (ДИ95% 1,32-9,08)). Анализ мутаций в программах Mutation Taster, Polyphen2, FATHMM-XF показал, что найденные мутации имеют различный уровень онкогенности. Мутации из группы мутаций “высокого риска”, сформированной согласно протеомным программам, не оказывали влияние на эффективность ответа на терапию. На основании клинических данных сформирована группа неблагоприятных мутаций (*NRAS* Gly13Asp, Gln61His, *KRAS* Gly12Ala, Gly12Asp, Gly12Val, Gly13Asp, Gln61Arg, Gln61His, Ala146Val), носители которых не достигли глубокого ответа на терапию (меньше, чем очень хорошая частичная ремиссия) бортезомиб-содержащими схемами лечения. Частота глубокого ответа на бортезомиб-содержащие курсы в группе пациентов с неблагоприятными мутациями оказалась достоверно ниже чем в стандартной группе ( $p < 0.0023$ , ОШ 14,9 (ДИ 95% 3,11-71,12)).

**Заключение.** Мутации в генах *KRAS* и *NRAS* отрицательно влияли на эффективность индукционной терапии бортезомиб-содержащими схемами. Варианты мутаций в генах *RAS* различались по уровню онкогенности. По результатам проведенного анализа выделены наиболее значимые варианты мутаций: *NRAS* Gly13Asp, Gln61His, *KRAS* Gly12Ala, Gly12Asp, Gly12Val, Gly13Asp, Gln61Arg, Gln61His, Ala146Val.

**Ключевые слова:** множественная миелома, мутации в генах *KRAS* и *NRAS*, бортезомиб-содержащая терапия, CD138+ плазматические клетки.

## Effect of mutations in the *KRAS* and *NRAS* genes identified at the onset of multiple myeloma on the efficacy of bortezomib-containing induction regimens.

A.M. Sergeeva, V.L. Surin, Y.A. Chabaeva, A.A. Kraizman, M.V. Solovyev, S.M. Kulikov, L.P. Mendeleeva.

National Research Center for Hematology, 125167, Moscow, Russian Federation.

For correspondence: Anna Mikhailovna Sergeeva, biologist, Novy Zykovsky pr-d, 4, Moscow, Russian Federation, 125167; tel: +7(916 443-33-04); e-mail: 4, Moscow, Russian Federation, 125167; tel: +7(916) 443-33-04; e-mail: [curlww@gmail.com](mailto:curlww@gmail.com).

### Abstract

**Rationale.** The most common point mutations in multiple myeloma (MM) are mutations in the *KRAS* and *NRAS* genes. The prognostic significance of mutations in these genes in MM has been investigated in a series of studies, but the results are contradictory.

**Aim.** To determine the oncogenicity of mutations in the *KRAS* and *NRAS* genes in new diagnosed MM patients and to classify them according to their influence on the depth of response to bortezomib-containing induction regimens.

**Methods.** Eighty-nine patients with new diagnosed MM were included in this study. Bone marrow (BM) plasma cells were isolated from BM aspirates by Ficoll gradient centrifugation with subsequent immunomagnetic positive selection for the CD138 marker. Mutations in the *KRAS* and *NRAS* genes in CD138+ cells were detected by Sanger sequencing. Mutation Taster, Polyphen2, FATHMM-XF proteomics programmes were used to evaluate the oncogenicity of the mutations. Depth of response was assessed after 6 courses of bortezomib-containing regimens. Statistical analysis was performed using SAS package procedures.

**Results.** The *RAS* genes harbored mutations in 42% (37/89 patients). We found that the mutations in *RAS* genes negatively affected the efficacy of induction therapy with bortezomib-containing regimens ( $p=0.008$ , OR = 3.5 (CI95% 1.32-9.08)). Analysis of mutations in

Mutation Taster, Polyphen2, FATHMM-XF showed different levels of oncogenicity, but there was no statistically significant difference in response to therapy between patients with "high-risk" mutations and patients with other mutations. Based on clinical data, we created a group of adverse mutations (NRAS Gly13Asp, Gln61His, KRAS Gly12Ala, Gly12Asp, Gly12Val, Gly13Asp, Gln61Arg, Gln61His, Ala146Val), from those patients who did not achieve a deep response to therapy (less than a very good partial response). The frequency of deep responses to bortezomib-containing regimens was significantly lower in the adverse mutation group than in the standard group ( $p < 0.0023$ , OR 14.9 (CI 95% 3.11-71.12)).

**Conclusion.** Mutations in *KRAS* and *NRAS* genes negatively affected the efficacy of induction therapy with bortezomib-containing regimens. According to our analysis, the adverse mutation variants were *NRAS* Gly13Asp, Gln61His, *KRAS* Gly12Ala, Gly12Asp, Gly12Val, Gly13Asp, Gln61Arg, Gln61His, Ala146Val.

**Keywords:** multiple myeloma, mutations in *KRAS* and *NRAS* genes, bortezomib-containing therapy, CD138+ plasma cells.

## Введение

Множественная миелома (ММ) - это лимфопролиферативное заболевание, субстрат которого составляют терминально дифференцированные плазматические клетки (ПК) клонального происхождения, имеющие aberrantный фенотип [1]. В патологическом состоянии при множественной миеломе 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 том числе при лимфопролиферативных заболеваниях [3–6]. Гены *KRAS* и *NRAS* относятся к одному семейству генов *RAS*, расположены на 12 и 1 хромосомах соответственно, схожесть последовательностей ДНК этих генов достигает 84,7 %, основной белок-кодирующий регион представлен экзонами 2–4 (рис.1А). Белки Ras (*NRAS* и *KRAS*) имеют структурное и функциональное сходство, являются ГТФ-азами (гидролизуют гуанозинтрифосфат до гуанозиндифосфата). В активированной форме данные белки осуществляют передачу сигналов пролиферации и дифференцировки от тирозин-киназных рецепторов на мембране клетки в ядро в составе митоген-активируемого протеинкиназного (mitogen-activated protein kinase, MAPK) сигнального каскада [7]. Активация и инактивация белков *RAS* осуществляется двумя специфическими белками GEF (guanine exchange factor) и GAP (GTPase activating protein). GEF подходит к мембране после активации тирозин-киназного рецептора, катализирует обмен ГДФ (гуанозиндифосфат) на ГТФ (гуанозинтрифосфат) 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. Белок GAP взаимодействует с белком *RAS*, повышая его ГТФ-азную активность. Инактивация белка *RAS* происходит в результате гидролиза нуклеотида ГТФ до ГДФ [8] (рис.1Б).

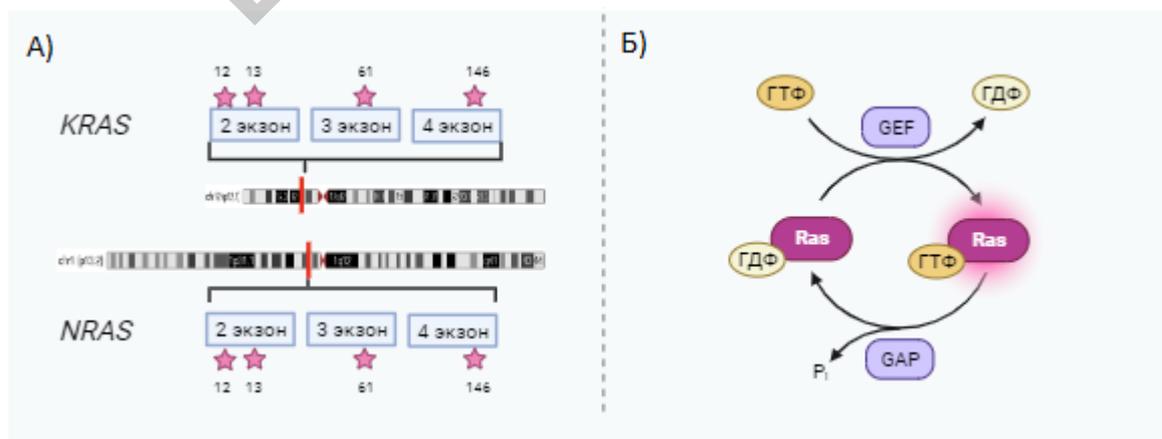


Рисунок 1. А) Структура генов *KRAS* и *NRAS*. Показано положение генов на хромосомах (красные линии), прямоугольниками обозначены 2-4 экзоны в кодирующей последовательности гена. 12,13,61,146 – кодоны, в которых наиболее часто встречаются мутации. Б) Схема активации и инактивации белков *Ras*. *Pi* – фосфат, образующийся в результате гидролиза ГТФ до ГДФ.

Figure 1. A) Structure of the *KRAS* and *NRAS* genes. The position of the genes on the chromosomes is shown (red lines), rectangles indicate 2-4 exons in the coding sequence of the gene. 12,13,61,146 are codons in which mutations occur most frequently. B) Scheme of activation and inactivation of *Ras* proteins. *Pi* - phosphate formed as a result of hydrolysis of GTP to GDP.

Несмотря на высокую степень сходства между *NRAS* и *KRAS*, обнаружена значительная корреляция между изоформой, в которой детектируется мутация, и нозологией [9,10]. Из литературы известно, что при раке поджелудочной железы мутации детектируются только в гене *KRAS* и встречаются с частотой 98%, при колоректальной аденокарциноме мутации в гене *KRAS* встречаются в 52% случаев. В клетках меланомы обнаруживаются мутации только гена *NRAS* с частотой 29% случаев, при аденокарциноме легких - в гене *KRAS* в 38% случаев [11,12]. Для ММ характерно наличие мутаций как в гене *KRAS*, так и в гене *NRAS*, которые встречаются с частотой 38,5 – 47%, если для детекции мутаций используется метод секвенирования по Сэнгеру или секвенирование нового поколения [13–19]. Таким образом можно сказать, что почти в половине случаев заболевания ММ, в патогенезе задействованы механизмы, ведущие 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 говорит об их значимости в патогенезе ММ.

Известно более 130 миссенс-мутаций в генах *RAS* [11]. Ранее было показано, что любая мутация в гене *KRAS* в опухолевых клетках колоректального рака – признак плохого прогноза ответа опухоли на таргетную терапию [20–22]. При немелкоклеточном раке легкого мутации Gly12Cys или Gly12Val в гене *KRAS* отрицательно влияли на выживаемость без прогрессии (ВБП) этих больных по сравнению с группой пациентов, у которых были найдены другие типы мутаций в этом гене или без мутаций в гене *KRAS* [22]. 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* [23,24].

В экспериментах на мышах мутация *KRAS* Gly12Asp приводила к усиленной пролиферации клеток эпителия толстой кишки, в то время как мутация *NRAS* Gly12Asp имела другое фенотипическое проявление – клетки эпителия были резистентны к апоптозу [25]. В серии работ исследовалось влияние отдельных вариантов мутаций генов *KRAS* и *NRAS*. Так, наличие мутаций в кодонах 12,13 (2 экзон) и кодоне 61 (3 экзон) генов *RAS* ведут к потере ГТФ-азной активности, регулируемой белком GAP. В опубликованных исследованиях было показано, что замена аминокислоты глицина на валин в 12-ом кодоне приводила к потере взаимодействия с белком GAP [26]. Мутация в кодоне 13, в результате которой аминокислота глицин заменялась 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 белком GAP и уменьшению скорости гидролиза ГТФ в активном центре белка *RAS* [2,27,28].

Было 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 [29]. Из литературных данных известно, что в результате появления

мутации *NRAS* Gln61Arg в клеточной линии ANBL6 увеличилась пролиферативная способность клеток одновременно с супрессией апоптоза [30].

Однако, исследования на клеточных линиях не вполне объясняют картину, наблюдаемую в опухоли у человека, так как их свойства на молекулярном уровне отличаются. Эксперименты на клеточных линиях могут только частично моделировать состояние миеломных клеток у пациента [31]. В исследованиях на мышах, которым вводили генно-инженерными методами ДНК-вектор, содержащий мутацию *KRAS* Gly12Asp, было показано, что мыши с мутацией в гене *KRAS* умирают в возрасте 4 месяцев от тяжелых миелолипролиферативных расстройств. У мышей с мутацией *NRAS* Gly12Asp к 6 месяцам наблюдается лимфолипролиферация, выражающаяся в повышенном количестве лимфоцитов в крови, периваскулярной инфильтрации лимфоцитами печени и легких, и только к возрасту 15 месяцев развиваются различные фатальные гематологические заболевания как лимфолипролиферативной, так и миелолипролиферативной природы [32,33]. Одновременная экспрессия белков *NRAS* с мутацией Gln61Arg и *MYC* приводила к развитию агрессивной множественной миеломы у мышей, которая сопровождалась инфильтрацией костного мозга плазматическими клетками, наличием клональных иммуноглобулинов в сыворотке, анемии и тромбоцитопении [32]. Важно отметить, что функции онкогенного белка *RAS* у мышей и человека не полностью совпадают, поэтому результаты, полученные на экспериментальных животных, не всегда можно экстраполировать на знания о патогенезе заболевания у человека [31]. В связи с этим, актуальным является вопрос о выявлении наиболее значимых мутаций у пациентов.

Прогностическая значимость мутаций в генах *KRAS* и *NRAS* при ММ оценивалась в серии работ, однако, окончательного решения по этому вопросу не существует на сегодня [18,34–41]. Мутации генов *RAS* ассоциированы с повышенным содержанием ПК в костном мозге,  $\beta 2$  микроглобулина в крови, остеолитическими повреждениями [38]. ММ почти всегда предшествует бессимптомная стадия, моноклональная гаммапатия неясного генеза (МГНГ). Опубликованные данные указывают на увеличение частоты соматических мутаций в генах *RAS* у пациентов с ММ по сравнению с пациентами с МГНГ [39,42–46]. Плазмочелочный лейкоз, который относят к более поздней стадии патогенеза, характеризуется повышенной частотой *KRAS* и *NRAS* мутаций по сравнению с ММ [11,14,19]. В работе Kim и соавторов 2020 года было выявлено, что наличие мутаций коррелирует с комплексным кариотипом опухоли и более коротким периодом времени до прогрессии заболевания [41,43]. В группе больных с впервые диагностированной ММ с мутацией в генах *RAS* наблюдались низкие значения выживаемости без прогрессии (ВБП) и общей выживаемости (ОВ) по сравнению с группой больных без мутаций [38]. В то же время, есть работы показывающие, что эффект от наличия мутаций *RAS* может быть благоприятным [47]. На образцах КМ, взятых у пациентов в рецидиве ММ, было показано, что мутация в гене *NRAS*, но не *KRAS* понижает чувствительность опухолевых клеток к бортезомибу [35]. В другой работе было продемонстрировано, что различия в ОВ и ВБП обусловлены в основном мутациями в гене *KRAS* [38].

Применение таргетной терапии у пациентов с ММ, нацеленной на белки *RAS*, не сопровождалось высокой эффективностью [24,48]. Из анализа литературы можно предположить, что разные типы мутаций генов *RAS* отличаются по степени влияния на изменение структуры белка, функции белка и изменение биохимических каскадов в клетке. Мы полагаем, что классификация мутаций генов *RAS* на основании их влияния на прогноз заболевания позволит найти более эффективные схемы лечения. Для оценки влияния аминокислотных замен на функцию белка и биологию клетки используют прогностический метод *in silico*. Программы, работающие на основании метода *in silico*, предсказывают патогенность выявленной генетической поломки, исходя из имеющихся данных о функции той же мутации в другой ткани (клеточной линии) и физико-химических свойств белка при изменении аминокислоты. Высокоточными выверенными алгоритмами зарекомендовали себя программы Mutation Taster [49], Polyphen2 [50], FATHMM-XF [51], в основе которых лежат различные алгоритмы выявления уровня онкогенности мутаций (Таблица 1). В алгоритм предсказательных программ Mutation Taster и Polyphen2 также включены данные о пространственной структуре белка.

В качестве вычислительного инструмента в Mutation Taster и PolyPhen2 используется наивный байесовский классификатор. Согласно байесовскому классификатору рассчитывается вероятность выявленной замены нуклеотида быть мутацией, ассоциированной с заболеванием, или безвредным полиморфизмом. В качестве обучающей выборки программа использует информацию медицинских баз. В программе Mutation Taster для каждой мутации также подсчитывается «рейтинг мутации» - число, выражающее уровень значимости замены исходной аминокислоты на новую аминокислоту на основании различий в физико-химических свойствах [49].

Программа PolyPhen2 использует метод статистического взвешивания и профилирования последовательностей множественного выравнивания. PolyPhen2 оценивает консервативность аминокислоты и выводит заключение о функциональной значимости аллеля. Для обучения программы используется база данных UniProt [52]. Программа использует алгоритм, основанный на информации о эволюционной консервативности гена. FATHMM-XF также имеет выборку для обучения, как и предыдущие программы. Выборка составлена из базы данных мутаций, ассоциированных с раком CanProVar, и базы данных UniProt. Было показано, что FATHMM-XF обладает высокой точностью в вычислении драйверных онкогенных мутаций [51].

*Таблица 1. Характеристика программ, предсказывающих патогенность мутаций in silico.*

*Table 1. Characteristics of programmes predicting pathogenicity of mutations in silico.*

Название биоинформатической программы	Исследуемые характеристики
Mutation Taster	Биохимические свойства аминокислот, пространственная структура/функция белка
PolyPhen-2	Выравнивание и оценка сходства между последовательностью варианта мутации и последовательностью гомологичного белка, пространственная структура белка
FATHMM-XF	Эволюционная консервативность последовательности аминокислот в белке

Целью данного исследования было определение онкогенности мутаций в генах *KRAS* и *NRAS* у первичных больных ММ и классификация их по влиянию на глубину противоопухолевого ответа на бортезомиб-содержащие схемы индукционной терапии.

## Материалы и методы

### Пациенты

В исследование включено 89 больных с впервые установленным диагнозом ММ, из них 45 женщин и 44 мужчины, в возрасте от 30 до 82 лет (медиана 58,5 лет). Диагноз ММ устанавливали в соответствии с критериями IMWG (2014), оценку противоопухолевого ответа – согласно критериям IMWG (2016) [53]. У всех больных первая линия противоопухолевой терапии включала трехкомпонентные бортезомиб-содержащие курсы.

### Выделение мононуклеаров из пунктата КМ и обогащение образца CD138+ клетками

Материалом для данного исследования служили плазматические клетки (ПК) с поверхностным маркером CD138+, выделенные из пунктата костного мозга (КМ) больных ММ. Для получения фракции ПК CD138+ из пунктата КМ выделяли мононуклеарные клетки по стандартному протоколу центрифугирования в градиенте плотности с

последующей магнитной сепарацией клеток, экспрессирующих на поверхности маркер CD138, как было опубликовано нами ранее [54]. После сепарации доля клеток с фенотипом CD138+ составляла от 45,1 до 96% (среднее значение  $83,8 \pm 14\%$ , медиана – 89%). После сепарации клеток CD138+ фракция мононуклеаров была разделена на 2 части: обогащенная ПК CD138+ и остаточная, CD138-, которая также сохранялась. Для анализа мутаций у 87 больных использовали ПК CD138+, у двух больных использовали тотальную фракцию мононуклеаров в связи с тем, что количество клеток с фенотипом CD138+ было недостаточным для анализа.

### *Выделение ДНК*

Геномную ДНК выделяли из клеток стандартным методом, описанным ранее [54]. Полученный осадок разводили в 20–120 мкл буфера TE, в зависимости от количества ДНК. Образцы ДНК хранились в TE буфере при температуре  $-20^\circ\text{C}$ .

### *Подготовка образцов материала для секвенирования*

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

### *Секвенирование и анализ результатов секвенирования*

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 программе 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 патогенности мутаций in silico*

Для выбора группы мутаций высокого риска онкогенности, был проведен анализ с помощью высокоточных протеомных программ Mutation Taster [51], Polyphen2 [52], FATHMM-XF [53]. В программе PolyPhen2 анализ онкогенности мутации проводили с использованием набора HumDiv. Для каждой мутации в программе Polyphen2 высчитывали численное значение «рейтинг мутации» и соотносили со шкалой категории риска. В зависимости от диапазона, в котором оказывалась данная мутация, определялась категория риска: «неопасная», «возможно опасная», «вероятно опасная». В программе FATHMM-XF категория риска определялась двумя градациями: «онкогенная» и «онкогенная (высокий риск)».

### *Статистическая обработка данных*

Для статистической проверки гипотез о различиях распределений категориальных признаков в группах сравнения использовался анализ таблиц сопряженности. Для оценки значимости использовался двусторонний критерий Фишера с указанием в качестве меры связи отношения шансов с соответствующим 95% доверительным интервалом. Отбор мутаций в группу высокого риска проводился методом многофакторной логистической регрессии с целевым признаком - ответом на бортезомиб-содержащие курсы и исходным признаком - набором мутаций. Статистический анализ проводили с помощью процедур пакета SAS 9.4.

## Результаты

### Количественные характеристики мутаций в генах NRAS и KRAS у пациентов с ММ

В представленной выборке из 89 больных у 37 (42%) были найдены мутации. Среди пациентов с мутациями у 34 (92%) пациентов обнаружено по одной мутации. Три пациента (8%) были носителями 2 мутаций одновременно. У одного больного мутации были выявлены в обоих генах, NRAS и KRAS. Два больных имели по 2 мутации в гене KRAS. В гене NRAS мутации выявлены у 20 обследуемых, в гене KRAS – у 17. Всего было детектировано 40 мутаций, 20 в генах NRAS и 20 мутаций в гене KRAS. Большинство мутаций (87,5%) локализованы в кодонах 12, 13 и 61.

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

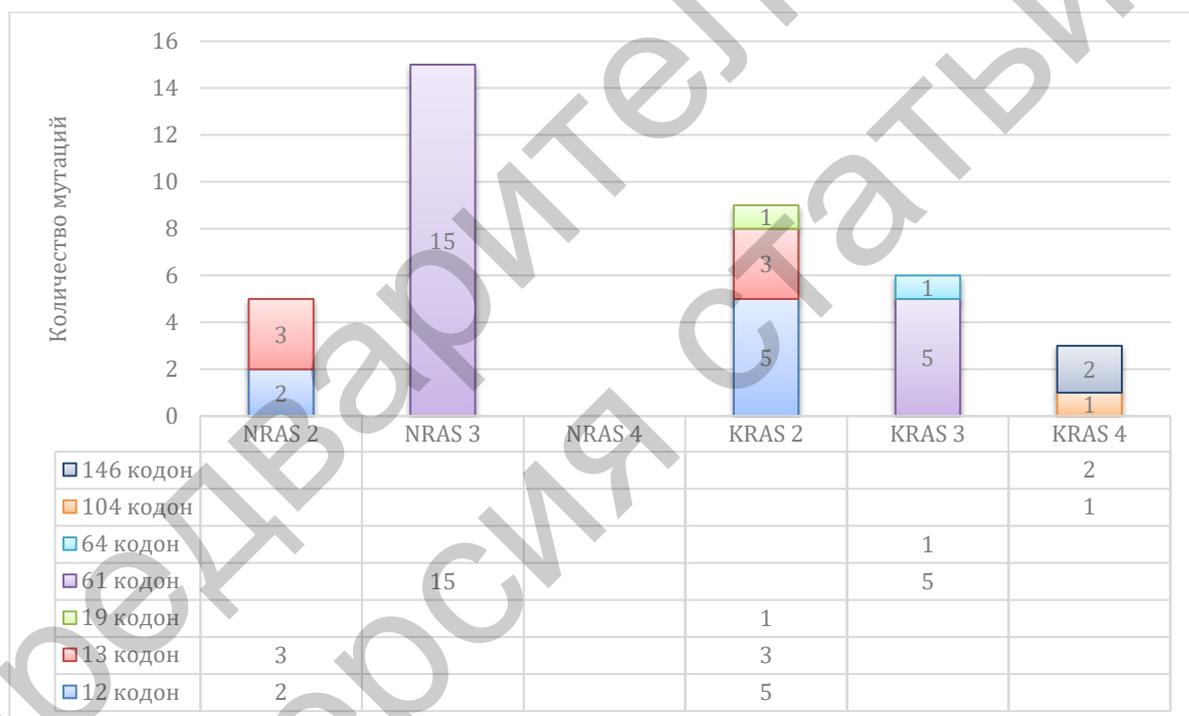


Рисунок 2. Количество найденных мутаций в кодонах генов NRAS и KRAS. Столбцы гистограммы - экзоны генов NRAS и KRAS: NRAS 2, NRAS 3, NRAS 4 – 2, 3 и 4 экзоны гена NRAS, соответственно; KRAS 2, KRAS 3, KRAS 4 - 2, 3 и 4 экзоны гена KRAS, соответственно. Столбцы гистограмм окрашены в различные цвета. Каждый цвет соответствует определенному кодону. Например, во 2 экзоне гена NRAS было выявлено 2 типа мутаций, в 12 кодоне – 2, в 13 кодоне – 3.

Figure 2: Number of mutations found in codons of NRAS and KRAS genes. Histogram columns - exons of NRAS and KRAS genes: NRAS 2, NRAS 3, NRAS 4 - 2, 3 and 4 exons of the NRAS gene respectively; KRAS 2, KRAS 3, KRAS 4 - 2, 3 and 4 exons of the KRAS gene respectively. The columns of the histograms are coloured. Each colour corresponds to a specific codon. For example, 2 types of mutations were detected in exon 2 of the NRAS gene, 2 in codon 12 and 3 in codon 13.

## Зависимость противоопухолевого ответа на индукционную терапию от наличия мутации в генах RAS

Чувствительность опухолевых клеток с мутацией в генах RAS к индукционной терапии бортезомиб-содержащими курсами оценивали у 75 пациентов, из которых у 42 пациентов не было выявлено мутаций в генах RAS и 33 пациента с мутациями. Эффективность терапии определяли по частоте достижения глубокого ответа. Глубоким считали ответ в том случае, если пациент достигал полной ремиссии (ПР) или очень хорошей частичной ремиссии (ОХЧР) к моменту окончания 6 курсов индукционной терапии. В результате проведенного анализа выяснили, что 27 (61% от общего числа больных без мутаций) больных без мутаций и только 11 (33,3% от общего числа больных с мутациями) пациентов с мутациями достигли ПР+ОХЧР (рис. 3). Таким образом мы получили достоверные данные ( $p=0.008$ , ОШ = 3.5 (ДИ95% 1,32-9,08)), доказывающие влияние наличия мутации в генах RAS на эффективность индукционной терапии бортезомиб-содержащими схемами.

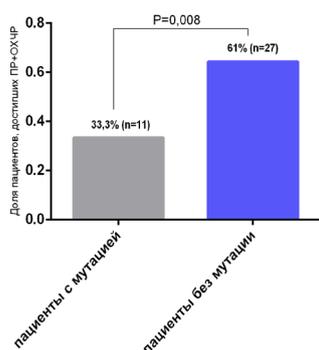


Рисунок 3. Частота достижения глубокого (ПР+ОХЧР) противоопухолевого ответа у пациентов после 6 бортезомиб-содержащих индукционных курсов в зависимости от наличия мутации в генах RAS.

Figure 3: Frequency of achieving a deep (complete response and very good partial response) response in patients after 6 bortezomib-containing induction courses depending on the presence of a mutation in RAS genes.

**Функциональное исследование мутаций методом анализа белковых структур.**

Мы использовали 3 компьютерные (*in silico*) предсказательные программы для определения степени патогенности вариантов мутаций, детектированных в генах NRAS и KRAS в опухолевых клетках пациентов с ММ (табл. 2).

Таблица 2. Оценка уровня патогенности мутаций в генах NRAS и KRAS с помощью программ MutationTaster, PolyPhen2 и FATHMM-XF.

Table 2. Assessment of the pathogenicity level of mutations in NRAS and KRAS genes using MutationTaster, PolyPhen2 and FATHMM-XF.

Ген	Мутация	Вероятность по PolyPhen2	Заключение PolyPhen2	Вероятность по FATHMM-XF	Заключение FATHMM-XF	Вероятность по Mutation Taster	Заключение Mutation Taster
NRAS	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
KRAS	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	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	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	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

По результатам анализа в программе Mutation Taster оказалось, детектированные мутации с вероятностью 0,99 и более несут вклад в развитие заболевания. Предсказательный анализ в программах Polyphen2 и FATHMM-XF установил различия в патогенности обнаруженных мутаций. Вероятности, вычисленные программами, и заключения о патогенности у различных типов мутаций представлены в таблице 2. На основании проведенного анализа тремя программами мы сформировали группу «высокого риска *in silico*», которая состояла из 12 мутаций, имеющих наибольшую суммарную оценку уровня патогенности. В соответствии с этими критериями группа «высокого риска *in silico*» состояла из 4 мутаций в гене NRAS: Gly12Ala, Gly13Arg, Gln61Leu, Gln61Lys; 8 мутаций в гене KRAS: Gly12Val, Gly12Ala, Gly13Asp, Leu19Phe, Tyr64Asn, Lys104Arg, Ala146Pro, Ala146Val (табл. 2, красный шрифт). Анализ связи между наличием мутаций, выделенных в группу «высокого риска *in silico*», и эффективностью индукционной терапии пациентов с помощью таблиц сопряженности с применением точного критерия Фишера не выявил взаимосвязи между патогенностью мутаций и глубиной ответа.

### **Классификация вариантов мутаций на основании эффективности ответа на индукционную терапию бортезомиб-содержащими схемами лечения у пациентов с ММ**

Для выявления статистически наиболее значимых мутаций, был проведен многофакторный анализ с полным перебором исходных признаков – вариантов мутаций, и целевым признаком в виде ответа на бортезомиб-содержащие курсы на индукционном этапе. В анализ включены 33 пациента, у которых была детектирована мутация и известен ответ на терапию первых 6 курсов. 22 пациента не достигли глубокого ответа, в то время

как у 11 пациентов была документирована ПР+ОХЧР. Основываясь на результатах данных оценок, мы выбрали 7 вариантов мутаций, которые встречались у пациентов, не достигших ОХЧР+ПР: NRAS Gly13Asp, Gln61His, KRAS Gly12Ala, Gly12Val, Gln61Arg, Gln61His, Ala146Val. В эту группу включили также 2 мутации, KRAS Gly12Asp и KRAS Gly13Asp наличие которых, по литературным данным, достаточно для неопластической трансформации клеток и их наличие ассоциировано с низкой выживаемостью пациентов с онкологическими заболеваниями [29,55]. Данный набор мутаций определил новую группу высокого риска для пациентов. Число носителей мутаций из группы высокого риска в нашей выборке составило 19 (57,6 %), других мутаций – 14 (42,4 %). Частота глубокого ответа на бортезомиб-содержащие курсы в группе пациентов с неблагоприятными мутациями – 10,5 % (2 из 19 больных), в стандартной группе 64,3 % (9 больных) ( $p < 0.0023$ , ОШ 14,9 (ДИ 95% 3,11-71,12)). Следовательно, удалось достоверно доказать, что среди мутаций генов RAS есть варианты, ассоциированные с резистентностью к схемам лечения, содержащим бортезомиб (рис. 4).

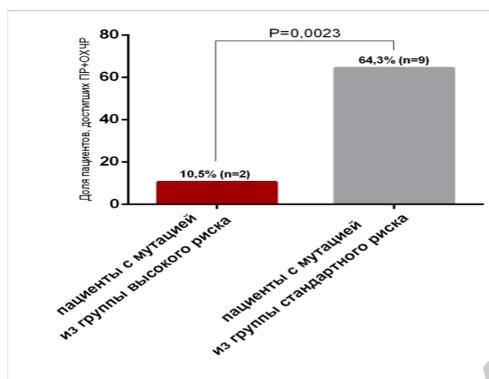


Рисунок 4. Частота достижения глубокого (ПР+ОХЧР) противоопухолевого ответа у пациентов после 6 бортезомиб-содержащих индукционных курсов в зависимости от наличия неблагоприятных мутаций в генах RAS.

Figure 4: Frequency of achieving a deep (complete response and very good partial response) response in patients after 6 bortezomib-containing induction courses depending on the presence of adverse mutations in RAS genes.

## Обсуждение и выводы

В результате проведенного исследования установлено, что частота встречаемости мутаций в опухолевых клетках больных ММ в дебюте заболевания составляет 42%. Наши данные совпадают с результатами исследования Национального Института Рака США, в соответствии с которыми частота встречаемости 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%. Эта варибельность, возможно, связана одновременно с несколькими факторами, такими как малый объем выборки, различный биоматериал для исследования (моноклеарные клетки или отсортированные плазматические клетки), чувствительность методов детекции мутаций [57]. Нужно обратить внимание, что минимальная частота мутаций была выявлена методами с низким разрешением, такими как саузерн-блоттинг и анализ полиморфизма длин рестриктивных фрагментов. В дополнение, в исследовании, где мутации не были детектированы, для анализа были использованы моноклеарные клетки, которые представлены лимфоцитами, в том числе ПК, и моноцитами. По нашим данным чувствительность детекции мутаций ниже, если используются моноклеарные клетки, а не плазматические CD138+ клетки костного мозга [58]. В большинстве исследований частота мутаций варьировала между 20 и 55%. Например, методом анализа конформационного полиморфизма ДНК мутации в генах 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 у

пациентов с ММ составила 55% [18]. В нашем исследовании для изучения мутаций в генах *KRAS* и *NRAS* у пациентов с ММ использованы тест-системы, позволяющие выявить замены нуклеотидов всей кодирующей области гена целиком. Полученные данные мы сопоставили с двумя исследованиями, выполненными на ПК больных ММ, методом полноэкзонного секвенирования [15,17]. В гене *KRAS* частота встречаемости мутаций была сопоставима и составила 50% по нашим данным и 43–50 % по литературным данным [15,17]. Мутации чаще всего были детектированы в кодонах 12, 13 и 61. Надо отметить, что в нашем исследовании найдены единичные мутации в других кодонах: 19, 64, 104. В других исследованиях были выявлены редко встречающиеся варианты мутаций в кодонах 7, 18, 22, 59, 60 в гене *KRAS* [15,17]. Интересно отметить, что были обнаружены мутации в 117 и 146 кодонах гена *KRAS* (наше исследование и Bolli, 2014, Bolli, 2018), которые являются прогностическими при колоректальном раке [59]. Наиболее распространенными по нашим и литературным данным были мутации в 61 кодоне гена *NRAS*: Gln61Lys, Gln 61His, Gln 61Arg – во всех исследованиях мутация в данной позиции встречалась чаще других (наше исследование и Bolli, 2014, Bolli, 2018).

В предыдущих исследованиях, выполнявшихся в НМИЦ гематологии [54,58], было показано на меньшей выборке, что мутации в генах *RAS* могут быть признаком плохого прогноза. В частности, было выявлено, что мутации в генах *RAS* влияют на такие показатели, как ВБП, особенно в случае сочетанной гиперэкспрессии гена *c-myc* [57]. Интересно отметить, что наличие мутации в генах *RAS* не влияет на ВБП и ОБ у больных с ММ, принимающих в качестве первой линии терапии иммуномодуляторы (леналидомид или талидомид) [60]. В нашем исследовании пациенты получали трехкомпонентные схемы лечения PAD или VCD. Мы получили результаты, доказывающие, что наличие любой мутации *RAS* приводит к снижению глубины ответа на комбинированную терапию, включающую бортезомиб. Попытки оценить влияние мутаций в генах *RAS* на течение ММ неоднократно предпринимались в исследованиях. В некоторых исследованиях продемонстрировано, что мутации только в гене *NRAS*, но не в *KRAS*, влияют на эффективность лечения. В этом исследовании пациенты принимали монотерапию бортезомибом. В тех случаях, когда в схему к бортезомибу добавляли дексаметазон, мутации в гене *NRAS* не влияли на эффективность терапии [35]. В другом исследовании мутации в генах как *KRAS*, так и *NRAS* ассоциировались с более агрессивным течением заболевания. При этом, мутация в гене *KRAS* в отличие от *NRAS* оказывала влияние на эффективность терапии [57].

Мы провели классификацию вариантов мутаций в генах *KRAS* и *NRAS* у пациентов с ММ с учетом их степени влияния на терапию с бортезомибом. На основании клинических данных, нам удалось выявить группу мутаций, которая ассоциировалась с низкой эффективностью индукционных курсов: *NRAS* Gly13Asp, Gln61His, *KRAS* Gly12Ala, Gly12Asp, Gly12Val, Gly13Asp, Gln61Arg, Gln61His, Ala146Val. Отмечено, что преимущественно это были мутации в гене *KRAS*. Ранее было опубликовано, что мутации *KRAS* в кодонах 12,13 и 61 были ассоциированы с большей опухолевой нагрузкой, более высоким содержанием  $\beta$ 2М, большим вовлечением костного мозга и более продвинутой стадией миеломы по ISS [57]. В нашем исследовании мы показали, что наличие мутации *KRAS* Ala146Val коррелировало с меньшей эффективностью лечения пациентов с ММ бортезомиб-содержащими схемами. Ранее было показано, что мутации в 117 и 146 кодонах коррелируют с пониженной эффективностью терапии таргетными препаратами при колоректальном раке и других солидных опухолях [59,61].

В результате проведенного анализа было выяснено, что предсказательные программы, работающие на основе оценки консервативности последовательности ДНК, аминокислотной последовательности и пространственной природы белка не обладают достаточной чувствительностью для выявления мутаций высокого риска у больных ММ.

## Заключение

В нашем исследовании мы провели классификацию мутаций в генах *RAS*, детектированных в плазматических клетках ММ, у больных ММ до начала лечения. Выявлена группа мутаций высокого риска, отрицательно влияющих на эффективность терапии трехкомпонентными схемами лечения, содержащими бортезомиб. Негативный эффект мутации в большинстве случаев приурочен к изоформе *KRAS*. По результатам проведенного анализа наиболее значимыми вариантами мутации являются *NRAS* Gly13Asp, Gln61His, *KRAS* Gly12Ala, Gly12Asp, Gly12Val, Gly13Asp, Gln61Arg, Gln61His, Ala146Val.

Накопленные данные позволяют предположить, что влияние мутаций в генах *KRAS* и *NRAS* у больных ММ на течение заболевания зависит от назначенной схемы лечения. Группа мутаций высокого риска, сформированная на основании клинических данных, может быть использована во врачебной практике для прогноза ответа на терапию трехкомпонентными бортезомиб-содержащими курсами лечения на этапе индукции. Хотелось бы отметить, что данная группа, сформированная на основании статистического анализа, может быть проверена на расширенной независимой выборке для оценки валидности выделенной группы.

Исследование механизмов появления мутаций в клетках опухоли ММ позволит увидеть более четкую картину эволюции опухоли и сформировать оптимальные алгоритмы лечения такой гетерогенной опухоли, как ММ.

*Конфликты интересов:* авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

*Источники финансирования:* исследование не имело спонсорской поддержки.

*Вклад авторов:* 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. Чабаева, С.М. Куликов. Подготовка рукописи: А.М. Сергеева. Окончательное одобрение рукописи: Л.П. Менделеева.

*Благодарности:* Чернецкой Д.М. за консультацию по использованию протеомных программ.

*ORCID авторов:*

<i>ФИО автора</i>	<i>ORCID автора</i>
А.М. Сергеева	0000-0003-4863-4902
В.Л. Сурин	0000-0002-1890-4492
Ю.А. Чабаева	0000-0001-8044-598X
А.А. Крайзман	0000-0003-1934-8800
М.В. Соловьев	0000-0002-7944-6202
С.М. Куликов	0000-0002-6288-7570
Л.П. Менделеева	0000-0002-4966-8146

## Список литературы

1. Swerdlow, S.H.; Campo, E.; Harris, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues; Revised 4<sup>th</sup> edition. Lyon: IARC Press; 2017.
2. Prior, I.; Lewis, P.; research, Mattos C. A Comprehensive Survey of Ras Mutations in Cancer. *Cancer Res.* 2012; 72 (10): 2457–2467. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2612.
3. Cooper GM. *Oncogenes*. 2<sup>nd</sup> edition. Massachusetts: Jones and Bartlett Publishers; 1995.
4. Barbacid M. Ras g. *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;14;118(2):368-79. doi: 10.1182/blood-2010-12-326058.
6. Neri, A.; Knowlton, D.M.; Greco, A.; et al. Analysis of RAS Oncogene Mutations in Human Lymphoid Malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(23):9268-72. doi: 10.1073/pnas.85.23.9268.
7. Hancock, J.F. Ras Proteins: Different Signals from Different Locations. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 May;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, B.A.; Dogrusoz, U.; et al. Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the cBioPortal. *Sci. Signal*. 2013; 6(269): p11. 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):1287-1292. 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):1304-1314. doi:10.1182/blood-2008-01-134262.
13. Bos, J.L.; Bezieau, S.; Devilder, M.; et al. Analysis of RAS Oncogene Mutations in Human Lymphoid Malignancies. *Annu Rev Biochem*. 2015; 85: 9268–9272. doi:10.1146/annurev.bi.56.070187.004023.
14. Neri, A.; Murphy, J.P.; Cro, L.; et al. Ras Oncogene Mutation in Multiple Myeloma. *The Journal of experimental medicine*. 1989; 170: 1715–1725. doi:10.1084/jem.170.5.1715.
15. Bolli, N.; Avet-Loiseau, H.; Wedge, D.C.; et al. Heterogeneity of Genomic Evolution and Mutational Profiles in Multiple Myeloma. *Nature Communications*. 2014; 5: 2997. doi:10.1038/ncomms3997.
16. Walker, B.A.; Boyle, E.M.; Wardell, C.P.; 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): 3911–3920. doi:10.1200/JCO.2014.59.1503.17.
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):2604-2616. doi:10.1038/s41375-018-0037-9.
18. 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):212-224. doi:10.1002/humu.1177.
19. Johnson C, Burkhart DL, Haigis KM. Classification of KRAS-Activating Mutations and the Implications for Therapeutic Intervention. *Cancer Discov*. 2022;12(4):913-923. doi:10.1158/2159-8290.CD-22-0035.
20. Raponi M, Winkler H, Dracopoli NC. KRAS mutations predict response to EGFR inhibitors. *Curr Opin Pharmacol*. 2008;8(4):413-418. doi:10.1016/j.coph.2008.06.006.
21. 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):228-239. doi:10.1093/jnci/djr523.
22. Ke N, Albers A, Claassen G, et al. One-week 96-well soft agar growth assay for cancer target validation. *Biotechniques*. 2004;36(5):826-833. doi:10.2144/04365ST07.
23. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(1):11-22. doi:10.1038/nrc969.
24. Parikh C, Subrahmanyam R, Ren R. Oncogenic NRAS, KRAS, and HRAS exhibit different leukemogenic potentials in mice. *Cancer Res*. 2007;67(15):7139-7146. 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 U S A*. 2013;110(12):4574-4579. 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):771-785. 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):8769-8775. 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):3640-3646.
31. Hamad NM, Elconin JH, Karnoub AE, et al. Distinct requirements for Ras oncogenesis in human versus mouse cells. *Genes Dev*. 2002;16(16):2045-2057. 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):2022-2032. 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):632-639. 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):226-229. doi:10.3109/10428194.2015.1046863.
37. Steinbrunn T, Stühmer T, Gattenlöhner 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):2280-2284. doi:10.1038/leu.2008.142.
39. Rasmussen T, Kuehl M, Lodahl M, Johnsen HE, Dahl IM. 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):317-323. 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):159-168. doi:10.5045/br.2020.2020137.
42. Weiss BM, Abadie J, Verma P, Howard RS, Kuehl WM. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood*. 2009;113(22):5418-5422. 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):571-596. 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):2380-2389. 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):5359-5366. 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):1617-1625. 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):1802-1809. 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. Published 2021 Apr 1. doi:10.3390/cancers13071668.
49. Schwarz JM, Rödelsperger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods*. 2010;7(8):575-576. 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):248-249. doi:10.1038/nmeth0410-248
51. Shihab HA, Gough J, Cooper DN, Day IN, Gaunt TR. Predicting the functional consequences of cancer-associated amino acid substitutions. *Bioinformatics*. 2013;29(12):1504-1510. 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. Sergeeva, A.M.; Abramova, T.V.; Surin, V.L.; Obukhova, T.N.; Dovydenko, M.V.; Suntsova, M.V.; Buzdin, A.A.; Mendeleeva, L.P. Molecular Genetic Structure of Multiple Myeloma Tumour Cells Prior to Treatment and at the Time of Relapse: Short Review and Case Report. *Gematologiya i Transfusiologiya*. 2019; 64 (3): 362–374. doi:10.35754/0234-5730-2019-64-3-362-374.
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):375-387. 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):2280-2284. doi:10.1038/leu.2008.142.
58. Нарейко, М.В. Особенности Экспрессии Генов C-MYC, CCND1, MMSET и Мутационный Статус Генов Семейства RAS При Множественной Миеломе: Дис. канд. мед.наук. М., 2017, 128 с.
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):5901-5911. 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):1440-1450. 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):4753-4760. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-0400.