



# **Funktionelle Charakterisierung des Ras family small GTP binding protein RAL im Multiplen Myelom**

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Marcel Seibold  
aus Tübingen

Stuttgart, 2020



Eingereicht am: .....

**Mitglieder der Promotionskommission:**

Vorsitzende: Prof. Dr. Dagmar Beier

Gutachter: Prof. Dr. Ralf C. Bargou

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Dandekar

Tag des Promotionskolloquiums: 10. Juni 2020

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

## **Eidesstattliche Erklärungen nach §7 Abs. 2 Satz 3, 5, 8 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie**

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „**Funktionelle Charakterisierung des Ras family small GTP binding protein RAL im Multiplen Myelom**“, eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Weiterhin erkläre ich, dass bei allen Abbildungen und Texten bei denen die Verwertungsrechte (Copyright) nicht bei mir liegen, diese von den Rechtsinhabern eingeholt wurden und die Textstellen bzw. Abbildungen entsprechend den rechtlichen Vorgaben gekennzeichnet sind sowie bei Abbildungen, die dem Internet entnommen wurden, der entsprechende Hypertextlink angegeben wurde.

Stuttgart, den 15. Juni 2020



---

Marcel Seibold

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>Summary</b>	<b>3</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>4</b>
1.1 Das Multiple Myelom . . . . .	4
1.1.1 Symptome und Diagnostik . . . . .	4
1.1.2 Therapie . . . . .	5
1.1.3 Pathogenese . . . . .	6
1.1.3.1 Physiologische B-Zell-Entwicklung . . . . .	6
1.1.3.2 Entwicklung maligner Plasmazellen . . . . .	8
1.1.4 Onkogene Signalnetzwerke im Multiplen Myelom . . . . .	9
1.2 Das RAS-like proto-oncogene RAL . . . . .	11
1.2.1 Regulation der RAL-Aktivierung . . . . .	12
1.2.2 Funktionen von RAL . . . . .	13
1.2.3 Rolle der RAL-Isoformen in soliden Tumoren . . . . .	15
1.2.4 Rolle der RAL-Isoformen in hämatologischen Krebserkrankungen . . . . .	16
1.3 Zielsetzung der Arbeit . . . . .	17
<b>2 Material &amp; Methoden</b>	<b>19</b>
2.1 Zellkultur . . . . .	19
2.1.1 Kultivierung humaner Myelomzelllinien . . . . .	19
2.1.2 Isolierung primärer Myelomzellen . . . . .	19
2.2 Immunhistochemie . . . . .	20
2.3 Klonierung von Vektoren . . . . .	20
2.4 Transfektion von Myelomzellen durch Elektroporation . . . . .	22
2.5 Aufreinigung transient transfizierter Myelomzellen . . . . .	23
2.6 Selektion stabil transfizierter Myelomzellen . . . . .	23
2.7 Durchflusszytometrie und Apoptose-Assay . . . . .	23
2.8 Pulldown-Assay . . . . .	24
2.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot-Analyse . . . . .	24
2.10 Behandlung von MM-Zellen mit pharmakologischen Inhibitoren . . . . .	26
2.11 RNA-Isolation und Genexpressionsanalyse mittels Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung . . . . .	26
2.12 HA-RALA-Immunopräzipitation und massenspektrometrische Analyse von RAL-Interaktionspartnern . . . . .	27
2.13 Statistische Analyse . . . . .	28
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>29</b>
3.1 Expression der RAL-Isoformen im Multiplen Myelom . . . . .	29
3.2 Einfluss von shRNA-vermitteltem RAL-Knockdown auf das Zellüberleben von Myelomzellen . . . . .	31
3.3 Einfluss von shRNA-vermitteltem RAL-Knockdown auf die Aktivierung des MAPK oder PI3K-Signalwegs . . . . .	33
3.4 Behandlung von MM-Zellen mit dem RAL-Inhibitor RBC8 . . . . .	36

3.5	Abhängigkeit der RAL-Aktivierung von onkogenem RAS . . . . .	38
3.6	Genexpressionsanalyse nach RAS und RAL-Knockdown . . . . .	39
3.7	Stabile Expression von HA-markiertem RALA in Myelomzellen . . . . .	44
3.8	Massenspektrometrische Analyse von RAL-Interaktionspartnern . . . . .	45
3.9	Kombination von RAL-Knockdown mit klinisch relevanten Wirksubstanzen .	46
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>49</b>
<b>5</b>	<b>Literatur</b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>65</b>
6.1	Abkürzungsverzeichnis . . . . .	65
6.2	Vektorkarten . . . . .	68
6.3	Puffer- und Reaktionslösungen für Western Blot Analysen . . . . .	73
6.4	Abbildungsverzeichnis . . . . .	75
6.5	Tabellenverzeichnis . . . . .	76
6.6	Publikationsliste . . . . .	77
	<b>Danksagung</b>	<b>78</b>

## Zusammenfassung

Die monoklonale Proliferation maligner Plasmazellen im Knochenmark ist charakteristisch für das multiple Myelom (MM) und kann bei Erkrankten zu Störungen in der Hämatopoese sowie zu Knochenläsionen und Niereninsuffizienz führen. Die Weiterentwicklung und der Einsatz neuer Therapieoptionen konnten das Überleben von MM-Patienten zwar erheblich verbessern, jedoch gilt diese Krankheit weiterhin als unheilbar. Onkogene Mutationen und das Knochenmarkmikromilieu führen in MM-Zellen zur Entstehung eines onkogenen Signalnetzwerks, das das Wachstum und Überleben der Zellen aufrechterhält. Mutationen der GTPase RAS treten bei bis zu 50 % der MM-Patienten auf und tragen zum Überleben von MM-Zellen bei. Trotz der Häufigkeit und Bedeutsamkeit von onkogenem RAS, auch in anderen Tumorentitäten, ist die GTPase nach wie vor therapeutisch nicht angreifbar. Die GTPase RAL aus der Familie der RAS-GTPasen wird als Downstream-Effektor von RAS angesehen, der damit ebenfalls zur Aufrechterhaltung des Tumorzellüberlebens beitragen könnte. In einigen Tumorentitäten konnte bisher gezeigt werden, dass eine Überexpression von RAL in den Tumorzellen vorliegt und die Proliferation und Apoptose von Tumorzellen durch RAL beeinflusst wird. Daher stellte sich die Frage, ob RAL im MM ebenfalls das Überleben von Tumorzellen beeinflusst und ob eine direkte Verbindung zwischen onkogenem RAS und RAL besteht.

In dieser Arbeit wurde die funktionelle Rolle von RAL sowie dessen Zusammenhang mit onkogenem RAS im MM untersucht. Hierbei konnte eine Überexpression von RAL in MM-Zellen im Vergleich zu MGUS oder normalen Plasmazellen beobachtet werden. In Knockdown-Analysen wurde gezeigt, dass RAL überlebensnotwendig für MM-Zellen ist. Dabei wurde in Western Blot-Analysen festgestellt, dass diese Überlebenseffekte unabhängig von MAPK/ERK-Signaling vermittelt werden. Es konnte teilweise jedoch eine Abhängigkeit von der AKT-Aktivität beobachtet werden. Da RAL-Knockdown Einfluss auf das Überleben von MM-Zellen hat, wurde eine pharmakologische Inhibition von RAL durch den Inhibitor RBC8 untersucht. RBC8 zeigte in höheren Dosen nur bei einem Teil der MM-Zelllinien eine Wirkung auf das Zellüberleben sowie auf die RAL-Aktivierung. Die Weiterentwicklung potenter RAL-Inhibitoren ist daher für eine klinische Translation einer RAL-Inhibition von großer Bedeutung. Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen onkogenem RAS und der RAL-Aktivierung wurden RAL-Pulldown-Analysen nach Knockdown von onkogenem RAS durchgeführt. In diesen Experimenten wurde keine Abhängigkeit der RAL-Aktivierung von onkogenem RAS festgestellt. Darüber hinaus zeigten Genexpressionsanalysen nach RAS- bzw. RAL-Knockdown unterschiedliche Genexpressionsprofile. In Massenspektrometrie-Analysen wurden mögliche Effektoren, die mit RAL an der Beeinflussung des Zellüberlebens beteiligt sein könnten, untersucht. Hierbei wurden die Komponenten des Exozyst-Komplexes EXO84 und SEC5 als Interaktionspartner von

RAL identifiziert. Nachdem gezeigt wurde, dass RAL ausschlaggebend für das Überleben von MM-Zellen ist, wurde eine Kombination von RAL-Knockdown mit klinisch relevanten Wirkstoffen analysiert. Diese zeigte bei der Kombination mit PI3K oder AKT-Inhibitoren verstärkte Effekte auf das Zellüberleben der MM-Zellen.

Zusammenfassend wurde die Bedeutung von RAL für das Überleben von Tumorzellen im MM gezeigt und RAL als potentielles therapeutisches Target im MM beschrieben, welches unabhängig von onkogenem RAS reguliert wird.

## Summary

Multiple myeloma (MM) is a hematologic neoplasia which is characterized by monoclonal proliferation of malignant plasma cells in the bone marrow leading to hematopoietic failure, bone lesions and renal failure. Although continuous development of existing therapeutics and new therapeutic options vastly improved MM patient survival, MM still remains an incurable disease. Oncogenic mutations and the bone marrow microenvironment contribute to a signaling network which sustains MM cell proliferation and survival. Within this network mutations of the RAS oncogene account for up to 50 % of MM patients. Despite its prevalence and importance not only in MM, RAS still remains undruggable. The GTPase-family Member RAL is considered as a RAS effector which might also influence maintenance of tumor cell survival. In several tumor entities RAL is overexpressed in tumor cells and influences proliferation and apoptosis. Therefore, in MM RAL might also be controlled by oncogenic RAS and mediate cell survival of tumor cells.

In this work, RAL's functional role as well as the potential interconnection with oncogenic RAS was investigated. In MM cells RAL is overexpressed compared to non-malignant MGUS or plasma cells. Knockdown analyses showed that RAL is essential for MM cell survival. These survival effects are transferred independently of MAPK/ERK signaling as shown by Western Blot analysis. However, to some extent RAL influenced MM cell survival dependently of AKT activity. Because RAL knockdown had a significant effect on MM cell survival a pharmacological inhibition was tested using the inhibitor RBC8. In a portion of MM cell lines RBC8 exerts effects on cell survival. But the effects of RBC8 on RAL activation were only visible at higher concentrations as shown by pulldown assays. Thus, subsequent development of potent RAL inhibitors is of major importance for clinical translation. To investigate whether RAL is directly activated by oncogenic RAS, RAL pulldown assays were performed after knockdown of oncogenic RAS. Strikingly, there was no direct connection between the presence of oncogenic RAS and RAL activation. Furthermore, gene expression profiles after RAS or RAL knockdown showed differing expression signatures. Potential effectors of RAL which might also influence MM cell survival were investigated in mass spectrometric analyses where the exocyst complex components EXO84 and SEC5 were identified as RAL interaction partners. Since RAL is of importance for MM cell survival, RAL knockdown was combined with clinically relevant agents. There was an enhanced induction of apoptosis upon combination of PI3K or AKT inhibitors with RAL knockdown.

Taken together, the influence of RAL as a crucial mediator of MM cell survival was shown in this work. Therefore, RAL represents a potential therapeutic target which is regulated independently of oncogenic RAS.



# 1 Einleitung

## 1.1 Das Multiple Myelom

Das Multiple Myelom (MM) ist eine maligne neoplastische Erkrankung, die sich durch klonale Proliferation von neoplastischen Plasmazellen im Knochenmark und Sekretion monoklonaler Immunglobuline (Ig), welche im Serum und/oder Urin nachweisbar sind, auszeichnet [1–3]. Mit einer Inzidenz in westlichen Ländern von jährlich ca. sechs bis sieben Fällen pro 100 000 Personen stellt das MM die zweithäufigste hämatologische Neoplasie dar [3, 4]. Diese entwickelt sich aus einem prä-malignen Stadium, welches als monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) bezeichnet wird. Eine MGUS kann zu einem asymptomatischen schwelenden („smoldering“) Myelom und schließlich zum klinisch manifestierten Myelom fortschreiten [1, 5]. Im weiteren Krankheitsverlauf können Tumorzellen an extramedullären Stellen (z.B. Weichteilgewebe, Pleuralfüssigkeiten, Haut) auftreten, was als extramedulläres Myelom bezeichnet wird. Bei Auftreten von MM-Zellen im Blut spricht man von einer Plasmazelleukämie [6]. Das mediane Erkrankungsalter beim MM liegt bei 69 Jahren und tritt bei Männern und Personen afroamerikanischer Abstammung häufiger auf [4, 7].

### 1.1.1 Symptome und Diagnostik

Zu den häufigsten Symptomen des MM zählen Erschöpfungserscheinungen (Fatigue) und Knochenschmerzen. Durch die Proliferation der malignen Plasmazellen im Knochenmark wird die Hämatopoese beeinträchtigt, wodurch es zu einer Anämie kommt. Diese kann ursächlich für die Fatigue sein bzw. ebenfalls dazu beitragen [8]. Als Folge der gestörten Hämatopoese führt eine Leukozytopenie zu erhöhter Infektanfälligkeit [9]. Zusätzlich bewirken die malignen Plasmazellen im Knochenmark eine Hemmung von Osteoblasten und eine Aktivierung von Osteoklasten [2]. Diese Beeinträchtigung des Knochenstoffwechsels führt zu Osteolysen, die wiederum durch das freigesetzte Kalzium zu einer Hyperkalzämie führen können [10]. Erhöhte Serumproteinkonzentrationen treten aufgrund der übermäßigen Produktion von Paraproteinen (monoklonale Immunglobuline) auf. Bei diesen handelt es sich in den meisten Fällen um IgG (50 %) oder IgA (20 %), seltener um IgD (2 %) oder IgM (0,5 %). Etwa 2 % der MM Patienten produzieren keine Immunglobuline, was als asekretorisches Myelom bezeichnet wird [11]. Die freien Leichtketten (FLC) der Immunglobuline werden in den Glomeruli der Niere gefiltert und können zu Beeinträchtigungen und Schäden der Nierentubuli und somit zu einer Niereninsuffizienz führen [12]. Der Nachweis dieser Paraproteine im Blut oder Urin ist ein Hauptkriterium zur Diagnose des MM. Dazu gehören ebenfalls der Nachweis von  $\geq 10\%$  monoklonalen Plasmazellen im Knochenmark und Zeichen von Endorganschäden, die von der International Myelo-

ma Working Group (IMWG) als CRAB-Kriterien benannt wurden (hypercalcemia, renal insufficiency, anemia, bone lesions) [13]. Diese Kriterien wurden 2014 um drei Biomarker erweitert (klonale Plasmazellen im Knochenmark  $\geq 60\%$ , FLC-Ratio  $\geq 100$ , mehr als eine fokale Läsionen bei der Magnetresonanztomografie (MRT)) [14]. Somit zählen zu den Routine-Labortests zur Diagnose des MM Blut- und Urinuntersuchungen, Messung des Serumkreatininspiegels, Serumkalzium-Konzentrations-Messung, Serum-FLC Assay, Knochenmarkbiopsie und PET/CT bzw. MRT-Untersuchungen [1, 3, 15].

### 1.1.2 Therapie

Durch den Einsatz neuer Therapien haben sich die Überlebensraten von Patienten erheblich verbessert, dennoch bleibt das MM eine unheilbare Krankheit [16]. Das mediane Überleben liegt, abhängig vom Risiko-Typ, zwischen 3 und 7 Jahren. Jedoch besteht zwischen Patienten eine große Variabilität, was gezielte, personalisierte Therapien erfordert [17, 18]. Die wichtigsten Phasen der Therapie sind die Induktionstherapie, Stammzelltransplantation (sofern der Patient geeignet ist), Konsolidierungs oder Erhaltungs-Therapie und Rezidivtherapie. Bei Patienten ohne relevante Komorbiditäten besteht die Induktionstherapie aus einer Hochdosis-Chemotherapie gefolgt von autologer Stammzelltransplantation. Die konventionelle Chemotherapie beinhaltet Alkylanzien (z.B. Melphalan, Cyclophosphamid, Bendamustin), Anthracycline (z.B. Doxorubicin) sowie Corticosteroide (z.B. Dexamethason, Prednison) [18, 19]. Die Chemotherapie wird durch neuere Substanzen wie Proteasom-Inhibitoren (z.B. Bortezomib, Carfilzomib, Ixazomib) und Immunmodulierende Substanzen (IMiDs; z.B. Thalidomid, Lenalidomid, Pomalidomid) erweitert.

Die Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren führt zu einer Blockade der katalytischen Untereinheit des Proteasom-Komplexes [20]. Dieser ist für die Degradation missgefalteter Proteine in der Zelle verantwortlich [21, 22]. Da MM-Zellen mit einer hohen Sekretion von monoklonalen Immunglobulinen ständig ungefaltete und fehlgefaltete Proteine produzieren, sind sie auf den Abbau der überflüssigen Proteine durch das Proteasom angewiesen [23, 24]. Durch die Inhibition der katalytischen Untereinheit kommt es zur Akkumulation von Proteinen in der Zelle, was die Einleitung des Zelltods zur Folge hat [24, 25].

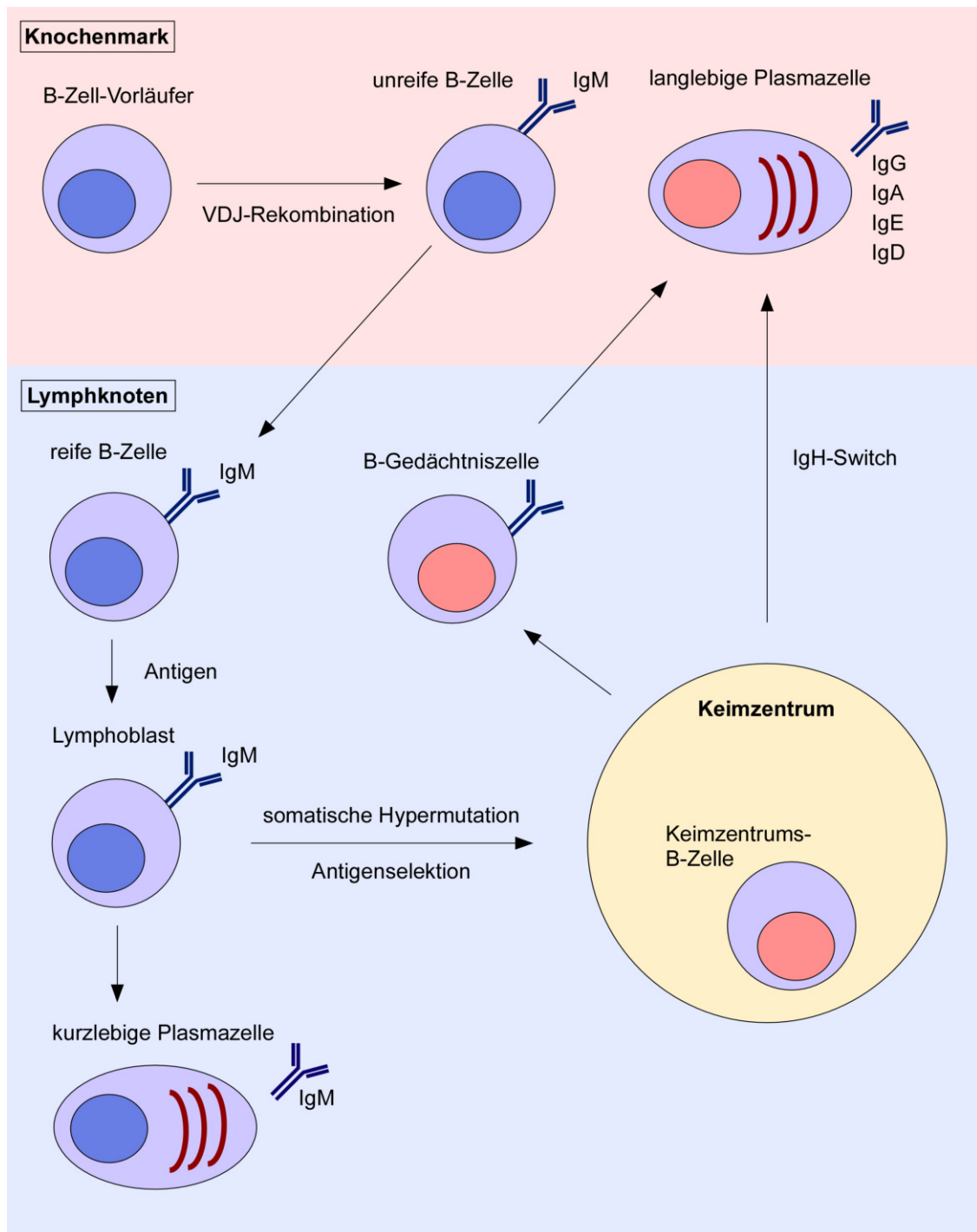
Der Wirkmechanismus der IMiDs beruht unter anderem auf der Bindung an das Protein Cereblon (CRBN), welches Teil eines E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes ist. Dadurch wird die Auto-ubiquitinierung des Komplexes verhindert und die Substrate IKAROS family zinc finger 1 „Ikaros“ (IKZF1) und IKAROS family zinc finger 3 „Aiolos“ (IKZF3) ubiquitiniert und degradiert [26–29]. Ikaros und Aiolos sind Zink-Finger Transkriptionsfaktoren, die eine Rolle in der B-Zell Entwicklung spielen und deren Abbau durch IMiD-Behandlung zu einer Verringerung der Proliferation von MM-Zellen führt [29]. Weiterhin beeinflussen IMiDs die Interaktion von MM-Zellen mit dem Knochenmark-Mikromilieu z.B. durch Hemmung der Angiogenese und Verringerung der Cytokinsekretion [30].

Die Konsolidierungs- bzw. Erhaltungs-Therapie und Rezidivtherapie beinhaltet ebenfalls Proteasom-Inhibitoren und IMiDs. Außerdem wurden kürzlich Histon-Deacetylase (HDAC)-Inhibitoren (z.B. Panobinostat) zur Behandlung des rezidierten oder refraktären MM zugelassen. Ebenso wurde zur Behandlung des rezidierten bzw. refraktären MM die Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern (z.B. Daratumumab, Elotuzumab) zugelassen. Bei der supportiven Therapie wird zur Vermeidung und Reduktion von Knochenläsionen neben Bisphosphonaten ebenfalls Denosumab eingesetzt. Bei klinischer Symptomatik wie z.B. Rückenmarkskompressionen können lokale Bestrahlungen erfolgen [18, 31].

### **1.1.3 Pathogenese**

#### **1.1.3.1 Physiologische B-Zell-Entwicklung**

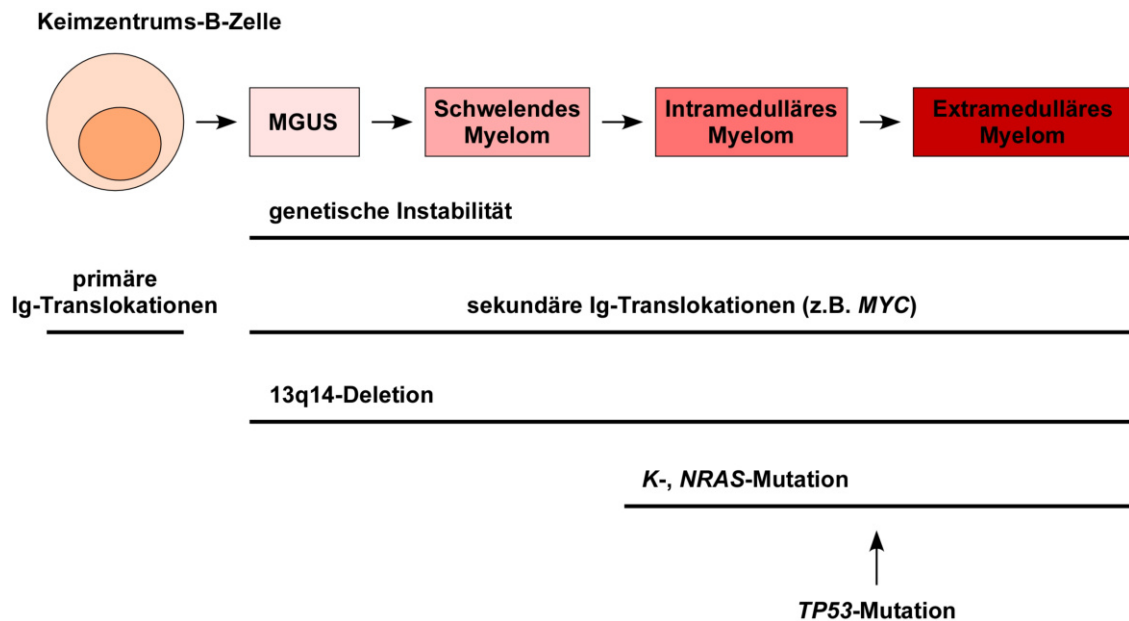
Die Bildung von B-Zellen erfolgt im Knochenmark aus pluripotenten Stammzellen (siehe Abb. 1). Während der frühen Entwicklungsphase findet in Pro-B-Zellen eine VDJ-Rekombination statt, bei der es zur Umordnung der V, D, und J Gensegmente der Ig Schwer und Leichtketten-Loci kommt. Durch diese Umordnung entstehen zunächst Prä-B-Zellen und schließlich unreife B-Zellen, die in der Lage sind, funktionelle B-Zell-Rezeptoren (IgM) zu exprimieren. Die unreifen B-Zellen können das Knochenmark verlassen und wandern in die Milz und Lymphknoten ein, in denen die weitere Differenzierung durch die Bindung eines Antigens eingeleitet wird [6, 32–34]. Nach Kontakt der B-Zellen mit Antigen-präsentierenden T-Zellen wird das Antigen internalisiert und anschließend auf der B-Zelloberfläche präsentiert. Durch erneute Bindung von T-Zellen können die B-Zellen aktiviert werden, woraufhin es zur klonalen Expansion kommt. Ein Teil der B-Zellen wird zu kurzlebigen Plasmazellen, während der andere Teil in den Keimzentren der Lymphfollikel eine Affinitätsreifung durchläuft. Dabei finden somatische Hypermutationen in den Antigenbindungsstellen der Ig-Gene statt, welche die Affinität der Antikörper gegenüber ihren Antigenen verändert. Daraufhin erfolgt eine positive Selektion von B-Zellklonen mit hoher Antigenaffinität. Diese Keimzentrums-B-Zellen differenzieren sich weiter zu B-Gedächtniszellen oder Post-Keimzentrums-B-Zellen. Anschließend stellen die Post-Keimzentrums-B-Zellen die Synthese des Ig-Isotyps von IgM auf IgG, IgD, IgA oder IgE um („Ig class switching“) und wandern ins Knochenmark zurück, wo sie sich zu langlebigen Antikörper-produzierenden Plasmazellen entwickeln [6, 33–36].



**Abbildung 1: B-Zell-Entwicklung.** Im Knochenmark entwickeln sich aus pluripotenten Stammzellen B-Zell-Vorläufer, die sich durch VDJ-Umordnung zu unreifen B-Zellen weiterentwickeln. Nach Migration und Reifung in Lymphknoten entstehen reife B-Zellen, die nach Antigen-Kontakt zu Plasmablasten differenzieren. Diese entwickeln sich entweder zu kurzlebigen Plasmazellen oder durchlaufen im Keimzentrum eine somatische Hypermutation der Ig-Gene. Die Keimzentrums-B-Zellen entwickeln sich entweder zu B-Gedächtniszellen oder zu Post-Keimzentrums-B-Zellen. Nach IgH-Switch wandern diese ins Knochenmark zurück und entwickeln sich zu langlebigen Plasmazellen (Abb. nach Kuehl & Bergsagel, 2002 [6]).

### 1.1.3.2 Entwicklung maligner Plasmazellen

Bei der onkogenen Transformation von der Post-Keimzentrums-B-Zelle bis zur malignen Plasmazelle handelt es sich um einen Mehrstufen-Prozess (vgl. Abb. 2). Das MM entwickelt sich aus einer asymptomatischen Vorstufe, der MGUS, die sich zum smouldering („schwelenden“) Myelom und schließlich zu einem symptomatischen intramedullären und extramedullären MM oder einer Plasmazelleukämie entwickeln kann [6, 37]. MM-Zellen zeichnen sich durch eine starke Abhängigkeit vom Knochenmark, umfassende somatische Hypermutationen der Ig-Gene und in den meisten Fällen eine Abwesenheit der IgM-Expression aus [2, 6]. Bei der Transformation kommt es (vor allem in nicht-hyperdiploiden MM-Fällen) zur schrittweisen Akkumulation von genetischen Läsionen, die sich in primäre und sekundäre Ereignisse einteilen lassen. Bei primären genetischen Veränderungen treten chromosomale Translokationen auf, meist im Genlocus der Isotypen der Ig-Schwerketten (IgH) auf Chromosom 14q32.33. Die häufigsten Translokationspartner sind Chromosom 4 (4p16.3; *FGFR3/MMSET*), 6 (6p21; *CCND3*), 11 (11q13; *CCND1*), 16 (16q23; *MAF*) und 20 (20p11.1; *MAFB*). Dabei wird ein Onkogen unter die Kontrolle eines IgH Enhancers positioniert [2, 38–41]. In hyperdiploiden MM-Fällen sind daneben die Chromosomen 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 und 21 betroffen [2, 40, 42]. Zu sekundären genetischen Veränderungen zählen weitere Translokationen (v.a. des *MYC* Onkogens), aktivierende Mutationen von Onkogenen (z.B. *K-* und *NRAS*, *FGFR3*), Mutationen oder Deletionen von Tumorsuppressorgenen (z.B. *TP53*, *RB1*, *PTEN*) und inaktivierende Mutationen der Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitoren *CDKN2A* und *CDKN2C* [1, 43]. Weitere sekundäre Ereignisse umfassen epigenetische Veränderungen (DNA Hypo-/Hypermethylierungen und Änderungen der miRNA-Expression) und partielle oder komplette Deletion des Chromosoms 13 [38, 44].



**Abbildung 2: Molekulare Pathogenese des Multiplen Myeloms.** Primäre Translokationen in Ig-Genen führen zur Entstehung einer MGUS. Weitere genetische Veränderungen, die die Entstehung eines schwelenden, intramedullären oder extramedullären Myeloms fördern sind sekundäre Translokationen und Deletionen auf Chromosom 13. Bei weiterer Progression treten zusätzliche Veränderungen wie aktivierende *RAS*-Mutationen oder *TP53*-Mutation auf (Abb. modifiziert nach Hallek *et al.*, 1998 [37]).

#### 1.1.4 Onkogene Signalnetzwerke im Multiplen Myelom

Zellen im Knochenmark-Mikromilieu produzieren und sezernieren Cytokine und Wachstumsfaktoren, wie IL-6, VEGF, IGF1, TNF, TGF- $\beta$ 1, SDF-1 $\alpha$  und IL-10, die durch autokrine und parakrine Feedbackschleifen kontrolliert werden. Interaktionen von MM-Zellen mit dem Knochenmark-Mikromilieu über Integrine, Cadherine, Selektine und Zelladhäsionsmoleküle fördern das Tumorstadium, -zellüberleben, Migration und Resistenzentwicklung gegen Pharmaka. Zunächst besteht eine Abhängigkeit der MM-Zellen vom Knochenmark-Mikromilieu. Mit fortschreitender Erkrankung entstehen genetische Läsionen, die es den Tumorzellen ermöglichen, auch außerhalb des Knochenmark-Mikromilieus zu proliferieren [1, 37]. Neben Mutationen in Rezeptor-Tyrosinkinasen, die zur Aktivierung onkogener Signalwege führen können, treten auch aktivierende Mutationen innerhalb der Signalwege auf, was ein komplexes onkogenes Signalnetzwerk ergibt (siehe Abb. 3) [45].

Zu den häufigsten Mutationen in Tumorzellen von MM-Patienten zählen Mutationen von *K*- und *NRAS* (30-50%), die zur dauerhaften Aktivierung der RAS-Proteine führen. Dadurch werden nachgeschaltete Signalwege aktiviert, was ein verstärktes Überleben der MM-Zellen zur Folge hat. Somit trägt mutiertes RAS zum Tumorzellüberleben bei und aktiviert dadurch die bekannteste RAS-abhängige Signalkaskade, den „RAS/MAPK (mitogen-

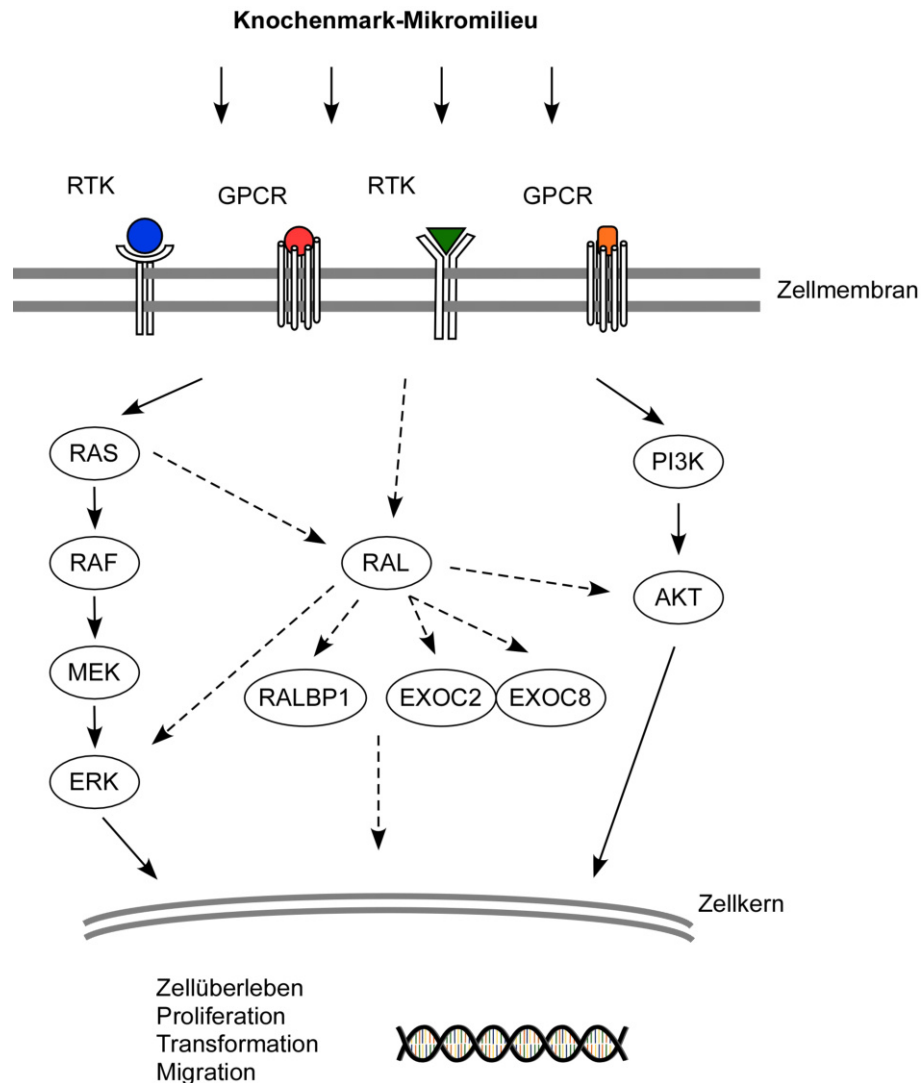
activated protein kinase)“ Signalweg [16, 46–49]. Trotz zahlreicher Ansätze ist eine Inhibition von RAS bisher klinisch nicht anwendbar. Daher besteht ein vielversprechender Ansatz darin, nachgeschaltete Effektoren, andere RAS-abhängige sowie RAS-unabhängigen Signalwegen zu identifizieren und inhibieren [50–53].

Mutationen von *BRAF* können in MM-Zellen ebenfalls zu einer Aktivierung des MAPK-Signalwegs führen und so das Zellüberleben beeinflussen. In MM-Zellen löst eine pan-RAF-Inhibition Zelltod aus, während eine Blockade des MEK/ERK-Moduls keinen Einfluss auf das Überleben von MM-Zellen hat. Darüber hinaus könnte eine Überexpression der RAF-Isoformen in MM-Zellen ebenfalls zur Aktivierung des MAPK-Signalwegs führen [16, 49, 54].

Ein weiterer Signalweg mit häufiger Aktivierung im MM ist der „PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)/AKT (AKT serine/threonine kinase)“ Signalweg. Die Proteinkinase AKT ist in ca. 50 % der MM-Patienten konstitutiv aktiviert, wodurch AKT durch Phosphorylierung verschiedener Substrate – wie z.B. GSK-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ ) – die Zellproliferation fördert und Apoptose inhibiert [55, 56]. Zellen mit konstitutiver AKT-Aktivierung sind besonders sensitiv gegenüber einer AKT-Inhibition, weshalb man von AKT-abhängigem und AKT-unabhängigem MM sprechen kann [56]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die AKT-Aktivierung in MM-Zellen unabhängig von onkogenem RAS auftritt [46]. Aktivierende Mutationen der PI3K-Untereinheiten oder Deletion des Tumorsuppressors *PTEN*, die häufig in einigen soliden Tumoren zu finden sind [57], treten im MM selten auf [58, 59]. Möglicherweise sind genetische Läsionen in Rezeptor-Tyrosinkinasen für eine dauerhafte Phosphorylierung von AKT verantwortlich [45, 60].

Der RAL (RAS like proto-oncogene)-Signalweg wird neben den RAS/MAPK und PI3K/AKT-Signalwegen als „dritter RAS-abhängiger“ Signalweg bezeichnet [61–64]. Die GTPase RAL wurde auf der Suche nach *RAS*-verwandten Genen entdeckt. Die Aktivität von RAL kann durch RALGEFs (guanine nucleotide exchange factors) beeinflusst werden [65–68]. Einige RALGEFs weisen eine *RAS*-association Domäne auf, die für die Interaktion mit *RAS* und *RAS*-verwandten Proteinen zuständig ist. Somit steht der RAL-Signalweg in Zusammenhang mit der Vermittlung von *RAS*-getriebenen onkogenen Prozessen wie Transformation oder Tumorzellproliferation. In einigen Tumorentitäten mit häufigem Auftreten von *RAS*-Mutationen, wie z.B. dem Pankreaskarzinom, Kolonkarzinom, Melanom, Lungenkarzinom und Plattenepithelkarzinom wurde der Einfluss von RAL auf Proliferation und Apoptose von Tumorzellen bereits nachgewiesen. Jedoch auch in Tumorentitäten, die weniger mit *RAS*-Mutationen assoziiert sind (z.B. Blasenkrebs, Prostatakarzinom, hepatozelluläres Karzinom), ist RAL an diesen Prozessen beteiligt [68, 69]. Bei einigen Zelltypen wurde eine Aktivierung von RAL in Abhängigkeit von *RAS* nachgewiesen, jedoch ist dieser Zusammenhang nicht allgemeingültig [70–72] (siehe auch Abschnitt 1.2.3 „Rolle der RAL-Isoformen in Tumoren“ auf Seite 15). Beim MM wurde bisher gezeigt, dass die

Migration von MM-Zellen von RAL beeinflusst wird [73]. Es herrscht allerdings Unklarheit darüber, ob RAL im MM ebenfalls für Transformation, Tumorzellüberleben, Tumorwachstum und Metastasierung verantwortlich ist und ob diese Prozesse RAS-abhängig sind.



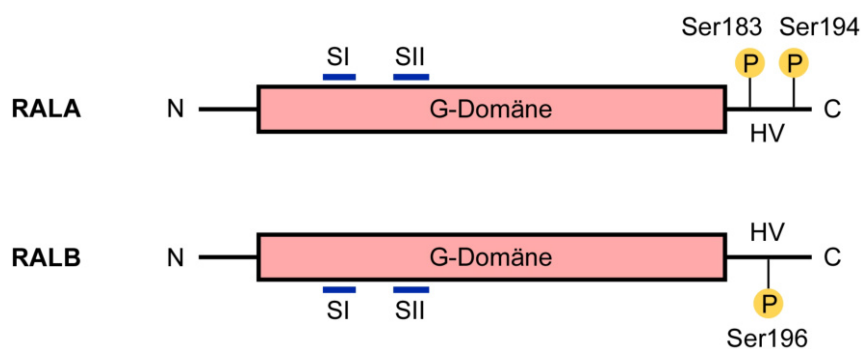
**Abbildung 3: Onkogenes Signaling im Multiplen Myelom.** Vereinfachte Darstellung eines Teils des onkogenen Signalnetzwerks in MM-Zellen. Gestrichelte Pfeile zeigen hypothetische Verbindungen. Durch Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) oder G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) kommt es zur Aktivierung von intrazellulären Signalwegen, die im Zellkern die Transkription beeinflussen und auf Zellüberleben, Proliferation, Transformation und Migration einwirken können [74, 75].

## 1.2 Das RAS-like proto-oncogene RAL

Im Jahr 1986 wurde von Pierre Chardin und Armand Tavitian erstmals ein Gen aus cDNA von immortalisierten Simian B-Lymphozyten entdeckt, das eine hohe Homologie



zu den *ras*-Genen aufwies [65]. Dieses Gen wurde aufgrund seiner nahen Verwandtschaft zu *RAS* „*ras* related (*ral*)“ benannt. Kurz darauf wurden das humane *RALA*-Gen sowie das verwandte *RALB*-Gen entdeckt [76]. Beide RAL-Proteine sind in ihrer Sequenz zu 82 % identisch und besitzen eine G-Domäne, die den Nukleotidaustausch reguliert (Abb. 4). Innerhalb dieser Domäne befinden sich sog. Switch I und Switch II-Regionen, deren Konformationsänderungen beim Nukleotidaustausch die Interaktion mit Regulatoren und Effektoren ermöglicht. Die größten Unterschiede weisen beide RAL-Proteine in ihrer C-terminalen hypervariablen Region auf (50 % Sequenzidentität). Diese Region enthält Membran-Zielstrukturen und Phosphorylierungsstellen und beeinflusst somit die subzelluläre Lokalisation und Effektor-Interaktion [66].



**Abbildung 4: Proteinstruktur von RAL.** Beide RAL-Isoformen weisen 82 % Sequenzidentität auf. Die N-terminalen Bereiche beinhalten die G-Domäne, welche für die GTP-Bindung und -Hydrolyse verantwortlich ist. Darin befinden sich die Switch I- (SI) und Switch II-Regionen (SII), die ihre Konformation während des GDP-GTP-Zyklus ändern und an der Effektor-Bindung beteiligt sind. Die C-terminale hypervariable Region (HV) enthält die Membran-Zielstruktur sowie Phosphorylierungsstellen, die die subzelluläre Lokalisation und Effektor-Interaktion beeinflussen (Abb. modifiziert nach Gentry et. al, 2014 [66]).

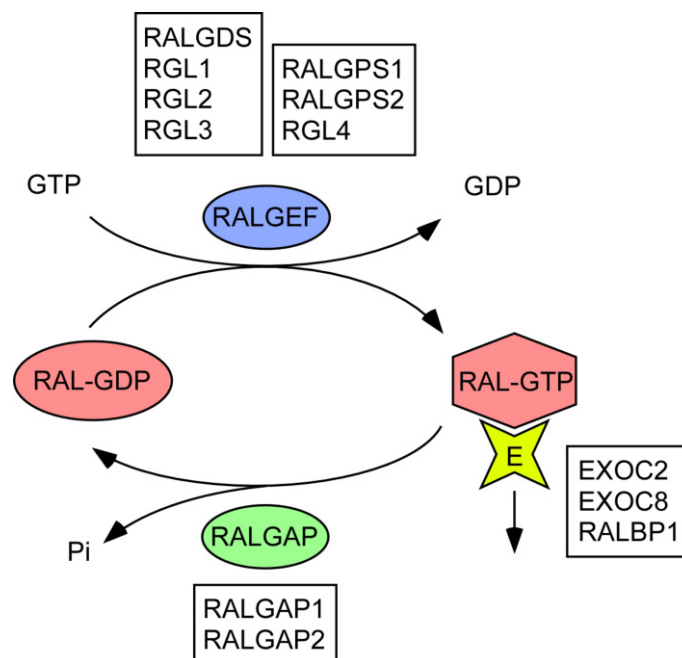
### 1.2.1 Regulation der RAL-Aktivierung

Der Nukleotidaustausch von RAL wird von RALGEFs (guanine nucleotide exchange factors) oder RALGAPs (RAL GTPase activating proteins) unterstützt (siehe Abb. 5). Innerhalb der RALGEFs lässt sich die Gruppe der RAL guanine nucleotide dissociation stimulator (RALGDS) abgrenzen. Dazu zählen die Proteine RALGDS, RGL1, RGL2 und RGL3, die eine katalytische Domäne (CDC25-Homologie-Domäne) enthalten. Diese reguliert die Umwandlung der inaktiven GDP-gebundenen Form von RAL in die aktive GTP-gebundene Form. Neben der katalytischen CDC25-Domäne besitzen RALGDS-Proteine ebenfalls ein RAS Exchange Motif (REM), welches die CDC25-Homologie-Domäne stabilisiert, und eine RAS-association (RA)-Domäne, die für die Interaktion mit RAS und RAS-verwandten Proteinen verantwortlich ist. Zur zweiten Gruppe der RALGEFs zählen RALGPS1 und RALGPS2, diese besitzen kein REM und keine RA-Domäne, aber enthalten eine Pleckstrin

homology (PH)-Domäne. RGL4 ist ein weiterer RALGEF, der kein REM, keine RA-Domäne und keine PH-Domäne besitzt, jedoch in der Lage ist, auch andere kleine GTPasen der RAS-Familie zu aktivieren [66–68]. Bei der RAS-abhängigen Aktivierung von RAL durch RALGDS ist die Co-Lokalisierung von RAS und RAL an der Plasmamembran notwendig. Ebenso muss RALGDS von RAS an die Membran rekrutiert werden und post-translationale Modifikationen von RAS und RAL stattfinden, um die Aktivierung durch RALGDS zu übermitteln [77].

Die RAL-GTP-Hydrolyse wird durch RALGAPs unterstützt, die aus einer der beiden Untereinheiten RALGAP $\alpha$ 1 oder RALGAP $\alpha$ 2 und der RALGAP $\beta$ -Untereinheit bestehen. In diesen Heterodimeren stabilisiert RALGAP $\beta$  die katalytische RALGAP $\alpha$ -Untereinheit. Diese beschleunigt die GTP-Hydrolyse von RAL, jedoch nicht von anderen RAS-verwandten GTPasen [66–68].

Die RAL-Aktivität kann auch durch weitere RAS-unabhängige Mechanismen, wie Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin [78, 79],  $\beta$ -Arrestine [80] oder Stickstoffmonoxid (NO) [81] beeinflusst werden.



**Abbildung 5: Regulation der GTPase-Aktivität von RAL.** RAL wechselt zwischen seinem inaktiven GDP-gebunden und seinem aktiven GTP-gebunden Zustand. Im aktivierten Zustand können Bindungen mit Effektoren (E) eingegangen werden. RALGEFs und RALGAPs beschleunigen den Nukleotidaustausch von RAL und fördern somit die Bildung von aktiviertem bzw. inaktiviertem RAL (Abb. nach Martin & Der, 2012 [82]).

### 1.2.2 Funktionen von RAL

In seiner aktivierten Form kann RAL Bindungen mit Effektoren eingehen und somit nachgeschaltete Signalkaskaden aktivieren und zelluläre Prozesse beeinflussen. Einer der

Prozesse, die von RAL beeinflusst werden, ist der Vesikel-Transport. Dieser Prozess wird u.a. vom Exozyst-Komplex, einem oktameren Proteinkomplex, gesteuert. Die beiden Untereinheiten Exocyst complex component 2 (EXOC2, SEC5) und Exocyst complex component 8 (EXOC8, EXO84) wurden als Effektoren von RAL beschrieben. Die Bindestellen für diese beiden Exozyst-Untereinheiten auf RALA überlappen teilweise, weshalb beide Effektoren nicht gleichzeitig an RALA binden können. Zudem erfolgt die Interaktion mit beiden Untereinheiten in verschiedenen Teilen der Zelle. RAL scheint den Exozyst-Komplex dabei zu stabilisieren, welcher daraufhin verschiedene Funktionen übernehmen kann. So ist RAL zusammen mit den Exozyst-Komponenten z.B. am zielgerichteten Vesikel-Transport in polarisierten Epithelzellen beteiligt, kontrolliert die Sekretion in verschiedenen Zelltypen (Exozytose dichter Granula in Blutplättchen, Insulinsekretion in  $\beta$ -Zellen des Pankreas) und reguliert den Rezeptor-Transport in Neuronen. Auch für die Motilität von Zellen wird der Exozyst-Komplex benötigt, da Zellbewegungen ebenfalls eine Umstrukturierung der Plasmamembran erfordern [66, 83, 84].

Ähnliche Funktionen reguliert RAL durch das RALA binding protein 1 (RALBP1, RLIP76). RALBP1 besitzt eine katalytische RhoGAP-Domäne und übt eine GAP-Aktivität gegenüber den kleinen GTPasen der Rho-Familie CDC42 und RAC1 aus. Da CDC42 und RAC1 die Formation von Filopodien bzw. Lamellipodien stimulieren, reguliert RAL möglicherweise die Organisation des Aktin-Zytoskeletts durch RALBP1. Zusätzlich ist RAL mithilfe von RALBP1 in der Rezeptor-vermittelten Endozytose von EGF und Insulin-Rezeptoren involviert. RALBP1 interagiert mit verschiedenen Proteinen, die an der Regulation der Endozytose beteiligt sind. Es wurde gezeigt, dass RAL diese Proteine durch RALBP1 rekrutiert, um die Rezeptor-vermittelte Endozytose zu beeinflussen. Weiterhin besitzt RALBP1 zwei ATP-Bindemotive und fungiert als ATP-abhängiger Transporter. Diese Transport-Funktion kann ausschlaggebend für den zellulären Export von Chemotherapeutika sein. RALA und RALBP1 fördern außerdem die mitochondriale Spaltung, welche die Verteilung der Mitochondrien während der Mitose kontrolliert [66, 84].

Die Funktionen von RALA und RALB in der Zelle können durch post-translationale Modifikationen beeinflusst werden. Trotz der starken Ähnlichkeit der gesamten Proteinsequenzen beider RAL-Isoformen sind die C-terminalen Membran-Zielsequenzen nur zu 50 % identisch. Somit sind beide Isoformen in der Lage, unterschiedliche Funktionen an unterschiedlichen Orten der Zelle auszuüben. Die C-Termini beider Isoformen enden in einem CAAX-Motiv (C = Cystein, A = aliphatische Aminosäure, X = terminale Aminosäure), welches post-translationale Modifikationen begünstigt und dadurch Interaktionen mit der Membranen und die Lokalisation beeinflusst. Diese Modifikationen sind somit wichtig für die Funktion von RALA und RALB. Außerdem besitzen beide Isoformen am C-Terminus unterschiedliche Phosphorylierungsstellen, die ebenfalls die zelluläre Lokalisation und Funktion beeinflussen [66, 84]. Die Ubiquitinierung und Deubiquitinierung kann auch einen

Einfluss auf die Aktivität und Funktion von RAL haben. Es wurde gezeigt, dass Ubiquitinierung die Aktivität von RALA verändert und unterschiedliche Ubiquitinierungs-Zustände einen Einfluss auf die Interaktion von RALB mit seinen Effektoren haben [85, 86].

Andere weniger gut charakterisierte Effektoren von RAL umfassen das Aktin-Bindeprotein Filamin, PLD, PLCD1, ZONAB und mTORC1. Dabei sind der mechanistische Hintergrund der Interaktionen und welche zellulären Funktionen dadurch beeinflusst werden nicht vollständig geklärt [66, 68, 69, 84]. RAL ist ebenfalls in der Lage, eine Reihe von Transkriptionsfaktoren und Genen zu beeinflussen. Dazu gehören c-Jun (durch JNK), ATF2, STAT3, NFAT, AFX (FOXO4), c-Fos, Cyclin D (durch NF $\kappa$ B) und AP-1 [67, 69, 83]. Die Beeinflussung der Genexpression trägt möglicherweise auch zu einer Förderung der Zellproliferation bei, weshalb die RAL GTPasen im Zusammenhang mit onkogener Transformation, Tumorwachstum, Tumorzellüberleben und Metastasierung gebracht werden [66–69, 83, 84, 87].

### 1.2.3 Rolle der RAL-Isoformen in soliden Tumoren

In einer Vielzahl von Tumor-Entitäten liegt im Vergleich zu normalem Gewebe eine hohe Expression und/oder chronische Aktivierung von RAL vor [71, 88–94]. Je nach Entität und Zelltyp können RALA und RALB unterschiedliche Funktionen bei Tumorigenese, Zellproliferation, Tumorzellüberleben und Metastasierung übernehmen [88, 95–97].

Im Pankreaskarzinom wurde eine signifikante Aktivierung von RALA und RALB in Tumorproben beschrieben. Die Aktivierung von RALA wird in Pankreaskarzinom-Zelllinien von onkogenem KRAS beeinflusst, wie entsprechende Änderungen der RALA-GTP-Spiegel nach KRAS-Knockdown zeigen. In diesen Zelllinien ist RALA für Transformation und Tumor-Initiation verantwortlich, während RALB Metastasierung beeinflusst [71, 88].

Auch beim Kolonkarzinom findet man eine erhöhte RAL-Aktivität in Tumorgewebe und Zelllinien. Es wurden allerdings gegensätzliche Eigenschaften von RALA und RALB auf das Tumorwachstum beschrieben. Nach RNA-Interferenz (RNAi)-vermittelter Inhibition von RALA nahm das Verankerungs-unabhängige Wachstum von Tumorzellen ab, während es nach Inhibition von RALB zu einer Zunahme der Größe und Anzahl der Kolonien im Soft-Agar kam [89]. Eine direkte Verbindung zwischen KRAS und RALA-Aktivierung ist beim Kolonkarzinom Zelllinien-abhängig. Genexpressionsanalysen nach KRAS, BRAF oder RALA-Knockdown in Zelllinien ergaben zudem unterschiedliche Expressionsprofile für RAL gegenüber KRAS und BRAF [72].

Beim Blasenkarzinom wurde mit zunehmendem Tumorgrad eine höhere RALA mRNA-Expression beobachtet. So weisen Tumorzellen von Patienten mit Metastasen erhöhte RALA und RALB-Proteinspiegel auf [93]. In invasiven Zelllinien zeigen RALA und RALB zudem eine starke Aktivierung im Gegensatz zu nicht-invasiven Zelllinien [94]. RALB beeinflusst die Migration von Blasenkarzinomzellen, was für RALA nicht beobachtet wurde.

Es wurden sogar antagonistische Funktionen von RALA und RALB auf die Migration von Tumorzellen beobachtet. Beim Tumorwachstum wurden jedoch redundante Funktion beider RAL-Isoformen nachgewiesen [95].

Ähnlich der Rolle beim Blasenkarzinom trägt RAL beim Prostatakarzinom zur Metastasierung und weniger zum Tumorwachstum bei. Ein Verlust von RALA hemmt zwar die Metastasierung, jedoch nicht das Tumorwachstum [98]. Auch beim Prostatakarzinom ist RALA im Vergleich zu normalem Gewebe überexprimiert [93].

Bei einer Reihe weiterer Tumorentitäten beeinflusst RAL ebenfalls Proliferation, Zellüberleben, Invasion und/oder Migration. Dazu zählen das Melanom [90, 99], das Bronchialkarzinom [91, 92, 100], das Mammakarzinom [101, 102], maligne periphere Nervenscheidentumoren [103], das Plattenepithelkarzinom [104, 105] und das Leberzellkarzinom [106, 107].

#### **1.2.4 Rolle der RAL-Isoformen in hämatologischen Krebserkrankungen**

Da RAL die hämatopoetische Differenzierung und Selbsterneuerung von Zellen beeinflusst, ist es ein potentiell wichtiger Faktor für die Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung von leukämischen Zellen [108]. In multipotenten Zellen mit nicht-leukämischen Phänotyp hemmt die Aktivierung von RAL durch RAS die neutrophile Differenzierung, was die Grundlage für eine kontinuierliche Proliferation dieser Zellen ist. Bei der Aktivierung des RALGEF/RAL-Signalwegs kommt es nicht zu einer Aktivierung von AKT oder ERK. In diesem Modell erfolgt die Inhibition der neutrophilen Differenzierung durch RAL über mehrere Effektoren außerhalb der MEK/ERK und PI3K/AKT-Signalwege.

In Zellen der akut myeloischen Leukämie (AML) führt Knockdown von RALB zur Auslösung von Apoptose und zur Abnahme der TBK1-Phosphorylierung. Daneben kommt es zu einer Reduktion des anti-apoptotischen Proteins BCL2 nach RALB-Knockdown [109]. Bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML) wurde RALA als Target der miRNA-181a beschrieben. Überexpression von miRNA-181a führt in CML-Zellen zur Abnahme von RALA mRNA und Protein-Spiegeln. Eine Inhibition von RALA durch miRNA-181a-Überexpression oder RALA siRNA führt zur Unterdrückung des Zellwachstums, Zellzyklusarrest, Induktion von Apoptose und verminderter Migration/Invasion [110–112]. Es wurde festgestellt, dass die RALA-Aktivität in CML Zelllinien und Primärzellen höher ist als in normalen Kontrollzellen [111, 112]. Eine RALA-Depletion führt darüber hinaus zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Arsen-Trioxid, was ursprünglich bei der Promyelozytenleukämie (M3) eingesetzt wird, jedoch ebenfalls in CML-Patienten Wirksamkeit zeigte [111]. Gleichermäßen erhöht eine RALA-Überexpression die Resistenz gegenüber Imatinib [112]. Somit ist RAL in der CML möglicherweise ebenfalls für die Vermittlung von Resistenz gegenüber Therapeutika verantwortlich.

Die Stimulation von B-Zellen und MM-Zellen mit dem Chemokin stromal cell-derived factor-

1 (SDF-1) löst eine starke Migration und Aktivierung von RAL aus [73]. RAL vermittelt dabei die SDF-1-induzierte Migration, welche durch Inhibition von RAL beeinträchtigt werden kann. Zusätzlich ist die SDF-1-induzierte RAL-Aktivierung nicht abhängig von RAS, wobei die Migration hauptsächlich von RALB und weniger von RALA kontrolliert wird.

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Bisherige Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe legen dar, dass MM-Zellen eine Abhängigkeit von onkogenem RAS für das Zellüberleben zeigen und diese Überlebenssignale über den ersten RAS-abhängigen Signalweg durch MAPK/ERK vermittelt werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass eine konstitutive Aktivierung des zweiten RAS-abhängigen Signalwegs PI3K/AKT ebenfalls zum Zellüberleben im MM beiträgt. Jedoch stellte sich der PI3K/AKT-Signalweg als unabhängig von onkogenem RAS heraus [46, 56, 113]. Als „dritter RAS-assoziiertes Signalweg“ wird der RAL-Signalweg diskutiert [61–63], dessen Rolle im MM in der vorliegenden Arbeit untersucht wird.

Wie in Kapitel 1.2.3 eingangs erläutert, ist in zahlreichen Tumorentitäten eine erhöhte Expression und Aktivierung von RAL zu finden. Im MM ist die Expression und Aktivierung von RAL gänzlich unbekannt. Daraus folgend ist es möglich, dass RAL in MM-Zellen ebenfalls exprimiert und aktiviert ist und darüber hinaus das Überleben von MM-Zellen mitbeeinflusst. Bisher wurde eine Beteiligung von RAL bei der Migration von MM-Zellen belegt [73], jedoch kein Zusammenhang mit dem Zellüberleben im MM beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wird die Expression der beiden RAL-Isoformen in HMZL und primären MM-Zellen sowie die RAL-Aktivierung in HMZL analysiert. Mittels Knockdown-Analysen mit Isoform-spezifischen shRNAs wird untersucht, ob RAL in MM-Zellen eine Rolle für das Überleben spielt und welche der beiden Isoformen diese Funktion gegebenenfalls übernimmt. Darüber hinaus wird eine mögliche Beeinflussung der MAPK/ERK und PI3K/AKT-Überlebenssignalwege bei der Regulation des Zellüberlebens durch RAL geprüft.

Wie Ergebnisse beim Pankreaskarzinom zeigen, besteht eine Abhängigkeit der RAL-Aktivierung von onkogenem RAS [71, 88]. So gilt RAL als einer der RAS-Effektoren, der ebenfalls im MM an onkogenem Signaling durch mutiertes RAS beteiligt sein könnte [61–63]. In Knockdown-Analysen wird geklärt, ob RAL im MM direkt durch onkogenes RAS aktiviert wird. Weiterhin sollen Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Genregulation beider Signalwege durch Genexpressionsanalysen dargestellt werden.

Es existieren bisher keine Kenntnisse darüber, welche Signalwege und Effektoren von RAL zur Übermittlung von Zellüberlebenssignalen im MM genutzt werden. In Massenspektrometrie-Analysen werden Interaktionspartner von RAL identifiziert und somit mögliche Effektoren und Downstream-Komponenten zur weiteren Untersuchung beschrieben.

Abschließend wird der Nutzen einer klinischen Translation der RAL-Inhibition in Kombinationsexperimenten mit im MM aktuellen Wirkstoffen überprüft. Eine Kombination von RAL-Blockade und therapeutischen Wirksubstanzen könnte verstärkte Effekte auf das Zellüberleben haben. Aufgrund der potentiell wichtigen Rolle von RAL im MM könnte die Identifikation wirksamer Kombinationstherapien und eine klinische Translation von Interesse für die MM-Therapie sein.

## 2 Material & Methoden

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Kultivierung humaner Myelomzelllinien

Die humanen Myelomzelllinien (HMZL) AMO-1, JJN-3, KMS-11, KMS-12-BM, L-363, RPMI-8226 und U-266 wurden vom Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig) bezogen. Die Zelllinie MM.1S stammt von LGC Standards GmbH (Wesel). Die Zelllinie INA-6 wurde freundlicherweise von Prof. Dr. M. Gramatzki (Kiel) zur Verfügung gestellt. Alle Zelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in RPMI-1640 Medium (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) kultiviert. Zum Medium wurden 10 % fötales Rinderserum (fetal bovine serum, FBS, GE Healthcare, Freiburg), 1 mM Natrium-Pyruvat (Sigma-Aldrich, Deisenhofen), 2 mM L-Glutamin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) zugesetzt. Zu INA-6 Zellkulturen wurde zusätzlich 2 ng/ml rekombinantes humanes IL-6 gegeben. Alle Zellkulturen wurden regelmäßig auf Mykoplasmen-Kontamination getestet.

#### 2.1.2 Isolierung primärer Myelomzellen

Die Isolierung primärer MM-Zellen aus Routine-Knochenmark-Aspiraten von MM-Patienten erfolgte nach Aufklärung und deren Zustimmung und der Genehmigung durch das Ethikkomitee der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg (Referenznummer 76/13). Dazu wurden zunächst größere Koagulationen aus dem Knochenmark-Aspirat durch ein Sieb entfernt. Anschließend wurde für die Ficoll-Dichte-Gradienten-Zentrifugation Pancoll (PAN Biotech, Aidenbach) mit dem Aspirat überschichtet und nach Zentrifugation (2352xg, 25 min, ohne Bremse) die mononukleäre Zellfraktion an der Phasengrenze entnommen. Die Zellen wurden mit phosphatgepufferter Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS) und MACS-Trennpuffer (PBS mit 0,5 % (v/v) FBS und 2,5 mM EDTA) gewaschen, in 200 µl kaltem MACS-Trennpuffer aufgenommen, mit 20 µl CD138 Microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) für 15 min bei 4 °C unter Rotation inkubiert und zur Isolation der CD138-positiven Zellen auf eine MACS Large Cell Column (Miltenyi Biotec) gegeben. Nachdem die Säule mit reichlich kaltem MACS-Trennpuffer gewaschen wurde, wurden die Zellen mit RPMI-1640 Vollmedium eluiert. Die primären MM-Zellen wurden mit primären Knochenmark-Stromazellen co-kultiviert. Diese Stromazellen wurden aus der CD138-negativen Fraktion gewonnen und in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; GE Healthcare, Freiburg) mit 20 % FBS, Natriumpyruvat, L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin in den beschriebenen Konzentrationen kultiviert. Vor der Verwendung in Co-Kultur wurden diese trypsinisiert und mit einer Dichte von ca. 1500 Zellen pro Well (96-Well-Platten) ausgesät.



## 2.2 Immunhistochemie

Um die Expression von RALA und RALB in MM-Zellen zu untersuchen, wurden immunhistochemische Färbungen an Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Knochenmarkbiopsaten von MM-Patienten durchgeführt. Ebenfalls wurden Färbungen an Plasmazellen von gesunden Spendern und MGUS-Patienten gemacht. Aufeinanderfolgende Schnitte von Proben mit konfluenten Plasmazelleninfiltraten wurden mit anti-CD138 (1:100, Klon MI15; Dako Agilent, Waldbronn), RALA (Maus monoklonal, 1:800, no. ABD-048; Jena Bioscience, Jena) oder RALB (Kaninchen polyklonal, 1:100, no. 3523; Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main) Antikörpern gefärbt. Alle MGUS-Fälle und Proben mit reaktiven Plasmazellen oder einer diffuseren Infiltration maligner Plasmazellen wurden mittels Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen analysiert. Dabei wurden die selben Antikörper mit leicht angepassten Konzentrationen verwendet. Alle Immunhistochemie-Färbungen und Auswertungen wurden am Pathologischen Institut der Universität Würzburg durch Dr. Anja Mottok erstellt. Die Methode der Fluoreszenz-Färbung wurde bereits in Steinbrunn *et al.*, 2011 [46] und Müller *et al.*, 2017 [49] beschrieben.

## 2.3 Klonierung von Vektoren

Zum Knockdown von Genen wurden shRNA-Expressionsvektoren mit verschiedenen Zielsequenzen generiert. Alle verwendeten shRNA-Expressionsvektoren basieren auf dem pSUPER-System [114]. Um Klonierung in andere Vektorsysteme zu vereinfachen, wurde der pSUPER-Vektor (pSUP) durch Einführung von verschiedenen Restriktionsenzym-Schnittstellen zum pSUS-Vektor und weiter zum pSUSTER2-Vektor modifiziert. Die verwendeten Zielsequenzen sind in Tab. 1 aufgeführt. Die Oligonukleotide zur Klonierung in die shRNA-Expressionsvektoren wurden so konzipiert, dass nach Annealing beider Stränge die überhängenden Enden kompatibel zu den Restriktionsenzym-Schnittstellen in den entsprechenden Vektorsystemen waren. Bei pSUP-Vektoren wurden die Schnittstellen *HindIII* und *BglII* genutzt, bei pSUS und pSUSTER2 *BglII* und *SacI*. So wurden shRALA 1, shRALB 1, shKRAS und shNRAS in *HindIII* und *SacI*-verdaute pSUP-Vektoren insertiert und shRALA 2 und shRALB 2 in *BglII* und *SacI*-verdaute pSUS-Vektoren. Zusätzlich wurde shKRAS in *BglII* und *SacI*-verdaute pSUSTER2-Vektoren insertiert und shRALA 2 durch einen *BglII* und *SacI*-Verdau aus pSUS RALA 2 ausgeschnitten und ebenfalls in *BglII* und *SacI*-verdaute pSUSTER2-Vektoren insertiert. Nach Ligation und Transformation in XL-1 kompetente *E. coli* Bakterien wurden erfolgreich transformierte Kolonien nach Ampicillin-Selektion ausgewählt und die erfolgreiche Ligation in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) überprüft. Nach positiver Kontroll-PCR wurde der entsprechende Klon vervielfältigt und größere Mengen des Plasmids in Plasmid Midi oder Maxi Extraktionen (NucleoBond Xtra Midi; Macherey-Nagel, Düren / Plasmid Maxi Kit; QIAGEN, Hilden) isoliert.

**Tabelle 1: Zielsequenzen der genutzten shRNA-Expressionsvektoren.** Jede shRNA enthält eine spezifische 19-nt Zielsequenz, die komplementär zur angegebenen Position der jeweiligen Proteinsequenz ist.

shRNA	Zielsequenz	Ziel-protein	Vektor-system	Referenz
shRALA 1	5' -AGACAGGTTTCTGTAGAAG-3' (Position 403-421)	RALA	pSUPER	[71]
shRALB 1	5' -GACTATGAACCTACCAAAG-3' (Position 124-142)	RALB	pSUPER	[71]
shKRAS	5' -GTTGGAGCTGCTGGCGTAG-3' (Position 25-43)	KRAS	pSUPER, pSUSTER2	[46]
shNRAS	5' -GTTGGAGCAGATGGTGTG-3' (Position 25-43)	NRAS	pSUPER	[46]
shRALA 2	5' -ACAGAGCTGAGCAGTGGAA-3' (Position 431-449)	RALA	pSUS, pSUSTER2	[71]
shRALB 2	5' -AAGCTGACAGTTATAGAAA-3' (Position 140-158)	RALB	pSUS	[95]

Um HA-RALA in MM.1S-Zellen stabil zu exprimieren, wurden Sleeping Beauty Proteinexpressions-Vektoren generiert. Diese Vektoren besitzen Inverted Repeat (IR) Sequenzen, welche von Transposase-Enzymen genutzt werden, um dazwischen liegende DNA-Sequenzen stabil ins Genom der Zielzelle zu integrieren [115]. Der verwendete Vektor (pT2/SVPuro/CAG) enthält neben dem Puromycin-Resistenzgen einen CAG-Promotor zur Proteinexpression [116]. Zunächst wurde die RALA-Proteinsequenz aus einem bereits klonierten pCAGGS/SE/3xHA-RALA-Vektor mittels einer PCR (Primer 5': 5' -AGAGCTAGCATGGCTGCAAATAAGCCCAAG-3', Primer 3': 5' -TCAGATGCTCAAGGGGCTTCA-3' amplifiziert. Dadurch wurde das Startcodon und eine *NheI*-Schnittstelle am 5'-Ende der RALA-Proteinsequenz erzeugt. Nach anschließender Extraktion der amplifizierten Sequenz und *NheI* und *NotI*-Verdau wurde das Insert in den beschriebenen *NheI* und *NotI*-verdauten pT2/SVPuro/CAG-Vektor ligiert. Um RALA-Proteine mit einem HA-Tag zu versehen, wurden Oligonukleotide, die die HA-Tag-Sequenz enthalten (HA-Tag Sense: 5' -CTAGGTAGGAGTGACAGACACGTGGAACCGGTGAGTATACATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACG-3', annealt, phosphoryliert und in den erzeugten *NheI*-geschnittenen pT2/SVPuro/CAG/RALA-Vektor eingefügt. Für eine Übersicht der verwendeten Vektoren siehe im Anhang Kapitel 6.2 Vektorkarten (Seite 68).

## 2.4 Transfektion von Myelomzellen durch Elektroporation

Für die transiente Transfektion von HMZL wurden pro Ansatz  $1,5 \cdot 2 \times 10^7$  Zellen ( $1 \times 10^7$  bei INA-6-Zellen) in RPMI-1640 Medium ohne Zusätze gewaschen und anschließend in  $500 \mu\text{l}$  RPMI-1640 Medium ohne Zusätze aufgenommen. Für den Knockdown wurden  $20 \mu\text{g/ml}$  der jeweiligen shRNA-Expressionsplasmide eingesetzt. In Kontrollzellen wurden entsprechende Konzentrationen des Leervektors transfiziert. Bei Elektroporation mit anschließender Behandlung mit Pharmaka wurden  $15 \mu\text{g/ml}$  der shRNA-Expressionplasmide bzw. Leervektoren eingesetzt. Zusätzlich wurden  $20 \mu\text{g/ml}$  eines Expressionsplasmids für humanes trunkiertes CD4 (pCDNA3.1(+)-CD4 $\Delta$ ; Invitrogen, Darmstadt) und  $10 \mu\text{g/ml}$  eines EGFP-Expressionsplasmids (pEGFP-N3; Clontech, Heidelberg) ko-transfiziert. Die Elektroporation erfolgte in 4 mm Küvetten (BioRad, München) mit dem BioRad Gene Pulser bei einer Kapazität von  $960 \mu\text{F}$ . Die Spannungsstärke wurde abhängig von der Zelllinie gewählt, siehe hierzu Tab. 2. Nach Elektroporation wurden die Zellen in RPMI-1640 ohne Zusätze überführt und nach 5-10 min in 30 ml vorgewärmtes Vollmedium gegeben. Die Aufreinigung der transfizierten Zellen erfolgte nach ca. 24 h und ist in Kapitel 2.5 beschrieben.

**Tabelle 2: Spannungen zur Elektroporation von HMCL.**

HCML	Spannung
AMO-1	270-300 V
INA-6	280 V
KMS-11	270-300 V
KMS-12-BM	270-300 V
L-363	280 V
MM.1S	310-330 V
U-266	270-300 V

Zur stabilen Transfektion wurden MM.1S-Zellen mit  $20 \mu\text{g/ml}$  des Sleeping Beauty Transposon-Plasmids, welches neben der Codierung für die HA-RALA-Proteinsequenz ebenfalls ein Puromycin-Resistenzgen enthält, transfiziert. Zusätzlich wurden  $30 \mu\text{g/ml}$  eines Proteinexpressionsplasmids (pCMV-SB100, Addgene, Cambridge, MA, USA, [115]), welches für die Expression der Transposase notwendig ist, und pEGFP-N3 ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) transfiziert. Kontrollzellen wurden mit der entsprechenden Konzentration des Leervektors transfiziert. Stabil transfizierte Zellen wurden anschließend mit Puromycin (Merck, Darmstadt) selektioniert, was in Kapitel 2.6 näher beschrieben ist.

## 2.5 Aufreinigung transient transfizierter Myelomzellen

Nach Transfektion und Inkubation der Zellen über Nacht wurden die transfizierten Zellen je nach Zelllinie mit magnetischen anti-CD4 Beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) oder mit Fluoreszenz-basierter Zellsortierung (fluorescence-activated cell sorting, FACS) aufgereinigt.

Bei der Säulen-basierten CD4-Aufreinigung wurden die Zellen pelletiert und mit MACS-Trennpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 100  $\mu$ l MACS-Trennpuffer aufgenommen und mit 20  $\mu$ l CD4 Microbeads versetzt. Nach Inkubation für 15 min bei 4 °C unter Rotation wurden die Zellen auf eine Large Cell Column (Miltenyi Biotec) gegeben, die Säule mit kaltem MACS-Trennpuffer gewaschen und mit Vollmedium eluiert. Nach Elution erfolgte eine Dichtegradienten-Zentrifugation, um tote von lebenden Zellen zu trennen. Dazu wurden 2,5 ml Zellsuspension mit 750  $\mu$ l Optiprep (Progen Biotechnik, Heidelberg) gemischt, mit 200-500  $\mu$ l PBS überschichtet und für 7 min bei 4000xg zentrifugiert. Die lebenden Zellen wurden an der Phasengrenze zwischen Optiprep-Medium und PBS entnommen, mit Vollmedium gewaschen und für weitere Experimente in Kultur genommen.

Bei AMO-1-Zellen erfolgte nach Transfektion eine FACS-Aufreinigung. Dabei wurde die Dichtegradienten-Zentrifugation vor der Aufreinigung durchgeführt und die Zellen in Vollmedium aufgenommen. Die transfizierten Zellen wurden dann anhand der EGFP-Fluoreszenz durch den fluoreszenz-aktivierten Zellsorter isoliert und anschließend erneut in Vollmedium für weitere Experimente aufgenommen.

## 2.6 Selektion stabil transfizierter Myelomzellen

Stabil transfizierte MM.1S-Zellen wurden nach 2 d in frischem Vollmedium aufgenommen und mit 0,5  $\mu$ g/ml Puromycin (Merck, Darmstadt) kultiviert. Nach Puromycin-Selektion (4-8 Wochen) wurden tote Zellen durch Dichtegradienten-Zentrifugation oder Austausch des Zellkulturmediums entfernt. Die lebenden Zellen wurden weiterhin in Kultur genommen und für weitere Experimente verwendet.

## 2.7 Durchflusszytometrie und Apoptose-Assay

Die Durchflusszytometrie wurde zur Ermittlung der Transfektionseffizienz nach der Elektroporation und zur Kontrolle einer erfolgreichen Aufreinigung transfizierter Zellen eingesetzt. Die Transfektionseffizienz wurde anhand des Anteils der EGFP-positiven Zellen ca. 24 h nach Elektroporation ermittelt, ebenso wurde eine erfolgreiche Aufreinigung transfizierter Zellen anhand des Anteils der EGFP-positiven Zellen kontrolliert. Dazu wurden die Zellen in PBS aufgenommen und mit 2  $\mu$ g/ml Propidiumiodid (PI; Sigma-Aldrich) angefärbt und

der Anteil der PI-positiven Zellen gegenüber den EGFP-positiven Zellen im Durchflusszytometer (FACSCalibur; CellQuest Pro Software, Becton Dickinson, Heidelberg) gemessen. Zur Apoptose-Messung wurde eine Annexin V/PI-Färbung mit anschließender Durchflusszytometrie durchgeführt. Die Zellen wurden in 200  $\mu$ l Annexin V-Puffer (10 mM HEPES (Sigma-Aldrich), pH 7,4; 140 mM NaCl (Roth); 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$  (Merck)) aufgenommen und mit 2  $\mu$ g/ml PI und 1  $\mu$ l Allophycocyanin (APC), PromoFluor-647 (PF647) oder Fluorescein-Isocyanat (FITC) gefärbt. Nach 10-15 min Inkubation erfolgte die Fluoreszenz-Messung im Durchflusszytometer.

Für weitere Auswertungen wurde die Software FlowJo (Becton Dickinson) verwendet. Der Anteil der überlebenden Zellen wurde relativ zur Anzahl der überlebenden Kontrollzellen (Dimethylsulfoxid (DMSO)-behandelte oder Leervektor-transfizierte Zellen) berechnet.

## 2.8 Pulldown-Assay

Die HMZL INA-6 und MM.1S wurden mit pSUPER-basierten shRNA-Expressionskonstrukten transfiziert und 2 d nach der Elektroporation geerntet. Der Aktivierungsstatus von RALA wurde mit Hilfe des RAL Activation Assays (#STA-408; Cell Biolabs, San Diego, CA, USA) gemäß den Angaben des Herstellers gemessen. Anschließend wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt, um die RALA-GTP-Spiegel und die RALA-Gesamtproteinspiegel zu untersuchen.

## 2.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot-Analyse

Geerntete Zellpellets wurden entweder für die spätere Verwendung bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren oder direkt nach der Ernte mit Lysepuffer bzw. Lämmli-Puffer versetzt. Bei Aufnahme der Zellpellets in 1xLämmli-Puffer erfolgte zuvor eine Zellzahlbestimmung, sodass gleiche Proteinmengen in den Samples gegeben waren. Anschließend wurden die Proben mit 0,5 Zyklen bei einer Amplitude von 20 % und 3 Pulsen sonifiziert (UP50H; Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow) und für 3-5 min bei  $98^\circ\text{C}$  erhitzt. Die Menge des zugegebenen Lämmli-Puffers war abhängig von der Anzahl der geernteten Zellen und der Größe des Zellpellets. Bei der Lyse der Zellpellets mit Lysepuffer wurde dieser mit cComplete<sup>TM</sup> Protease Inhibitor Cocktail (#04 693 116 001; Roche, Mannheim), Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 (#P5726; Sigma-Aldrich) und 3 (#P0044; Sigma-Aldrich) nach Herstellerangaben versetzt und zu den Zellpellets gegeben. Auch hier war die Menge des zugegebenen Lysepuffers abhängig von der Anzahl der geernteten Zellen und der Größe des Zellpellets. Nach der Lyse der Zellen für 15 min auf Eis wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (10-15 min,  $4^\circ\text{C}$ ,  $14\,000\times g$ ) und der Proteingehalt mittels des DC Protein Assay Kit (BioRad) am Microplate Reader (Model 680; BioRad) bestimmt. Anschließend wurden jeder Probe äquivalente Mengen an Protein entnommen, 1:1 mit 2xLämmli-Puffer gemischt, für 3-5

min bei 98 °C erhitzt und auf ein 10 oder 15 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der Auftrennung der Proteine während der Gelelektrophorese (Tris-Glyzin-SDS (TGS)-Laufpuffer) wurden diese auf eine Nitrocellulose-Membran (Amersham Protran Premium 0.45 µm; GE Healthcare) transferiert. Durch Inkubation der Membran für 30-60 min bei Raumtemperatur in Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween20 (TBS-T) und 2,5 % Magermilchpulver (Sucofin, TSI GmbH & Co. KG, Zeven) wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert. Anschließend wurde die Membran mit den entsprechenden Primärantikörpern verdünnt in 2,5 %iger TBS-T-Milch über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schwenken inkubiert. Für eine Liste der verwendeten Primärantikörper siehe Tab. 3.

**Tabelle 3: Primärantikörper für Western Blot-Analysen.**

Antikörper	Verdünnung	Spezies	Art.-Nr.	Hersteller
β-actin	1:10 000	Ratte	#03568	Biozol
α-tubulin	1:10 000	Maus	#A5316	Sigma Aldrich
AKT	1:1000	Kaninchen	#9272	Cell Signaling
phosphoAKT (Ser473)	1:1000	Kaninchen	#4058	Cell Signaling
phosphoAKT (Thr 308)	1:1000	Kaninchen	#2965	Cell Signaling
phosphoGSK-3β	1:1000	Kaninchen	#9336	Cell Signaling
ERK1/2	1:1000	Kaninchen	#9102	Cell Signaling
phosphoERK1/2	1:1000	Kaninchen	#9101	Cell Signaling
RALA	1:1000	Kaninchen	#3526	Cell Signaling
RALB	1:1000	Kaninchen	#3523	Cell Signaling
Caspase-3	1:1000	Kaninchen	#9662S	Cell Signaling
PARP-1 (F-2)	1:1000	Maus	#sc-8007	Santa Cruz
KRAS (F234)	1:200-1:1000	Maus	#sc-30	Santa Cruz
NRAS (F155)	1:200-1:1000	Maus	#sc-31	Santa Cruz
HA-tag	1:2500-1:5000	Kaninchen	#ab9110	Abcam

Nach Inkubation mit dem Primärantikörper wurde die Membran mit TBS-T gewaschen und mit dem entsprechenden Sekundärantikörper für 30-60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Folgende HRP (horseradish peroxidase)-gekoppelte Sekundärantikörper wurden verwendet: Goat Anti-Mouse IgG (#115-036-003), Goat Anti-Rabbit IgG (#111-036-045) und Goat Anti-Rat IgG (#112-036-062) von Jackson ImmunoResearch Laboratories (Newmarket, UK), jeweils in 1:20 000 Verdünnungen in 2,5 %iger TBS-T-Milch. Nach erneutem Waschen der Membran wurde diese für 30 sec mit ECL-Lösung behandelt und Röntgenfilme (Typon Röntgenfilm GmbH, Frankenthal) in einer Dunkelkammer mit der Membran belichtet und entwickelt. Die Zusammensetzung der einzelnen Puffer und Lösungen ist im Anhang in Kapitel 6.3 (Seite 73) aufgeführt.

## 2.10 Behandlung von MM-Zellen mit pharmakologischen Inhibitoren

HMZL und primäre MM-Zellen wurden für 3 d mit steigenden des RAL-Inhibitors RBC8 (Selleck Chemicals, Houston, TX, USA) behandelt. Die Inkubation von primären MM-Zellen erfolgte zusammen mit primären Stromazellen. Nach der Durchführung von Apoptose-Assays wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) Dosis-Wirkungs-Kurven (nicht-lineare Regressionsanalyse mit variabler Steigung) von drei unabhängigen Experimenten erstellt.

Kombinations-Behandlungen mit RBC8 und dem MEK-Inhibitor PD0352901 (Selleck Chemicals, Houston, TX, USA), PIK3CA-Inhibitor BYL-719 (Active Biochem, Bonn), oder dem AKT-Inhibitor Akti-1,2 (Merck, Darmstadt) wurden ebenfalls für 3 d durchgeführt mit anschließenden Apoptose-Assays zur Bestimmung des Zelltods.

Die Behandlung von RALA-depletierten L-363-Zellen mit PD0352901, BYL-719 oder dem AKT-Inhibitor MK-2206 (Active Biochem, Bonn) erfolgte 24 h nach Elektroporation für 2 d. RALA-depletierte MM.1S-Zellen wurden 24 h nach Elektroporation für 3 d mit den Proteasominhibitoren Carfilzomib (PR-171), Ixazomib (MLN2238) oder dem IMiD Pomalidomid behandelt. Anschließend wurden ebenfalls Apoptose-Assays zur Bestimmung des Zelltods durchgeführt.

RBC8, Carfilzomib, Ixazomib und Pomalidomid wurden von Selleck Chemicals (Houston, TX, USA) bezogen. Kontrollzellen wurden mit DMSO behandelt.

## 2.11 RNA-Isolation und Genexpressionsanalyse mittels Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung

Für Transkriptomanalysen wurde in MM.1S-Zellen ein KRAS oder RALA-Knockdown mit pSUSTER2 shRNA-Expressionsvektoren erzeugt. Kontrollzellen wurden mit Leervektoren transfiziert. Die Zellen wurden 2 d nach der Elektroporation geerntet und RNA unter Verwendung des NucleoSpin RNA-Kits (#740955.250; Macherey-Nagel) gemäß den Anweisungen des Herstellers isoliert. Extrahierte Gesamt-RNA wurde Integritätsprüfungen unter Verwendung eines Bioanalyzer 2100 (Agilent, Waldbronn) unterzogen. Die mediane RNA integrity number betrug 10,0 (Spannweite zwischen 9,6-10,0). RNA-Sequenzier (RNA-Seq)-Libraries wurden mit dem TruSeq-Strand-mRNA-Kit (Illumina, München) hergestellt, äquimolar gepoolt und in einer single-end 75nt-Sequenzierung unter Verwendung eines NextSeq 500 (Illumina, München) sequenziert. Verbliebene Adaptersequenzen in den Sequenzier-Reads wurden mit Cutadapt Version 1.12 entfernt. Die Reads wurden an die humane Referenzsequenz GENCODE v24 unter Verwendung der STAR-Version 2.5.2b aligniert. Die differentielle Genexpressionsanalyse wurde in der R (v3.3.1)/Bioconductor (v3.3)-Umgebung unter Verwendung des DESeq2-Pakets v1.12.3 durchgeführt. Diese Arbeiten wurden von Dr. Claus-Jürgen Scholz in der Core Unit Sy-

stemMedizin am Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) der Universität Würzburg durchgeführt.

## **2.12 HA-RALA-Immunopräzipitation und massenspektrometrische Analyse von RAL-Interaktionspartnern**

Zur massenspektrometrischen Analyse von RAL-Interaktionspartnern wurden MM.1S-Zellen mit stabil exprimierendem HA-RALA hergestellt (siehe Kapitel 2.4 und 2.6). Die Isolierung von HA-markiertem RALA erfolgte durch Immunopräzipitation (IP) mit Pierce™ Anti-HA Magnetic Beads (#88836, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Dazu wurden je  $3 \times 10^7$  Zellen, die entweder eine stabile oder keine HA-RALA-Expression (Kontrollzellen) zeigten, aus der Zellkultur geerntet. Die Zellen wurden für 15 min auf Eis mit 1 ml kaltem IP-Lysepuffer (25 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 % (v/v) Glycerol, 0,25 % (v/v) NP-40) lysiert. Zur Inhibition von Proteasen und Phosphatasen wurde dem Lysepuffer vor der Verwendung der Halt™ Protease und Phosphatase Inhibitor Cocktail (#78444, Thermo Fisher Scientific) im Verhältnis 1:100 zugesetzt. Nach Abzentrifugieren von Zelltrümmern dienten 18 µl des Zelllysats zur Qualitätskontrolle (Input) und wurden mit 6 µl 4xLaemmli-Puffer für 3-5 min bei 98 °C erhitzt. Pro IP-Reaktion wurden je 100 µl Anti-HA Magnetic Beads zweifach mit TBS-T (25 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween-20) gewaschen und anschließend das Zelllysat zugegeben. Nach Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur unter Rotation wurden die Anti-HA Magnetic Beads gesammelt und 18 µl des Überstands zur Qualitätskontrolle (Unbound) mit 6 µl 4xLaemmli-Puffer für 3-5 min bei 98 °C erhitzt. Die Beads wurden dreimal mit 1 ml TBS-T gewaschen und mit 400 µl 1xSDS-PAGE Sample Buffer (100 mM Tris pH 6,8, 20 % (v/v) Glycerol, 8 % (w/v) SDS, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau, kein β-ME) für 5-10 min schwenkend eluiert. Von Input, Unbound und IP-Proben wurden Western Blot-Analysen zur Kontrolle einer erfolgreichen IP-Reaktion durchgeführt und die IP-Proben anschließend mit Hilfe der Massenspektrometrie (MS) von Prof. Dr. Andreas Schlosser (Rudolf-Virchow-Zentrum für Experimentelle Biomedizin der Universität Würzburg) analysiert.

Dazu wurden die IP-Proben mit 50 mM DTT bei 70 °C für 10 min reduziert, mit 120 mM Iodacetamid bei Raumtemperatur für 20 min alkyliert und auf NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Gelen (Life Technologies, Darmstadt) in MOPS-Puffer nach Herstellerangaben getrennt. Die Gele wurden nach dreimaligem Waschen mit Wasser für 45 min mit Simply Blue Safe Stain (Life Technologies) angefärbt. Nach erneutem Waschen für 2 h wurde jedes Gel in 15 Streifen geschnitten. Für den In-Gel-Verdau wurden die Gel-Streifen mit 30 % Acetonitril entfärbt, mit 100 % Acetonitril geschrumpft und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Der Trypsin-Verdau erfolgte über Nacht bei 37 °C in 0,05 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  pH 8,0 mit 0,1 µg Protease pro Streifen. Die Peptide wurden mit 5 % Methansäure aus den Gel-Streifen extrahiert.



Nano-LC-MS/MS-Analysen wurden mit dem Orbitrap Fusion Massenspektrometer (Thermo Scientific) mit einer PicoView Ionenquelle (New Objective, Woburn, MA, USA), gekoppelt an ein EASY-nLC 1000 Flüssigchromatograph (Thermo Scientific), durchgeführt. Die Peptide wurden auf Kapillarsäulen (PicoFrit, 30 cm x 150 µm ID, New Objective), befüllt mit ReproSil-Pur 120 C18-AQ 1.9 µm (Dr. Maisch, Ammerbuch-Entringen), geladen. Anschließend erfolgte die Auftrennung mit einem 30 minütigen linearen Gradienten von 3-30 % Acetonitril und 0,1 % Methansäure bei einer Flussrate von 500 nl/min. MS und MS/MS Scans wurden im Orbitrap-Analyser erfasst und die Rohdaten-Verarbeitung, Datenbank-Suche und Quantifizierung mit MaxQuant version 1.5.7.4 durchgeführt [117]. Die Suche erfolgte gegen das *H. sapiens* Referenz-Proteom (Uniprot) und einer Datenbank, die übliche Zellkulturverunreinigungen enthält. Die Proteinidentifizierung erfolgte bei einer false discovery rate (FDR) von <1 % auf Protein und Peptid-Ebene. Zur Proteinmassebestimmung wurden LFQ Intensitäten genutzt [51]. Proteine mit weniger als zwei identifizierten razor/unique Peptiden wurden verworfen. Die weitere Datenanalyse erfolgte mit eigens erstellten R-Skripten.

Zur Unterscheidung von unspezifisch immunopräzipitierten Proteinen erfolgte eine Quantil-Normalisierung der LFQ-Intensitäten der Kontroll-IP-Proben und eine Berechnung der medianen Intensitäten. Fehlende LFQ-Intensitäten in Kontrollproben wurden mit Werten nahe der Basislinie angerechnet. Die Berechnung wurde mit Werten aus einer Standardnormalverteilung mit einem Mittelwert des 5 %-Quantils der kombinierten log<sub>10</sub>-transformierten LFQ-Intensitäten und einer Standardabweichung von 0,1 durchgeführt. Zur Identifizierung von signifikant co-immunopräzipitierten Proteinen wurden Boxplot-Ausreißer in Intensitätsbins von mindestens 300 Proteinen identifiziert. Log<sub>2</sub>-transformierte Protein-Quotienten von IP gegen Kontrolle mit Werten außerhalb eines 1,5-fachen bzw. 3-fachen Interquartilbereichs wurden als signifikant co-immunopräzipitiert betrachtet. Die zugrunde liegende Verteilung war eine gespiegelte Verteilung der negativen log<sub>2</sub>-Verhältnisse IP gegen Kontrolle.

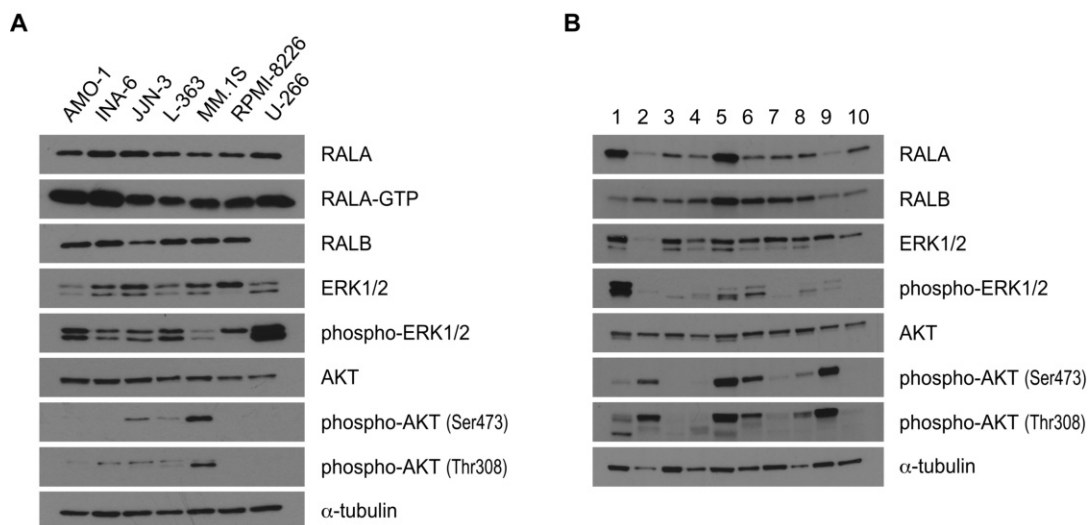
### 2.13 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse wurde der zweiseitige Student's T-Test ( $P < 0,05$ ) von drei unabhängigen Experimenten durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Expression der RAL-Isoformen im Multiplen Myelom

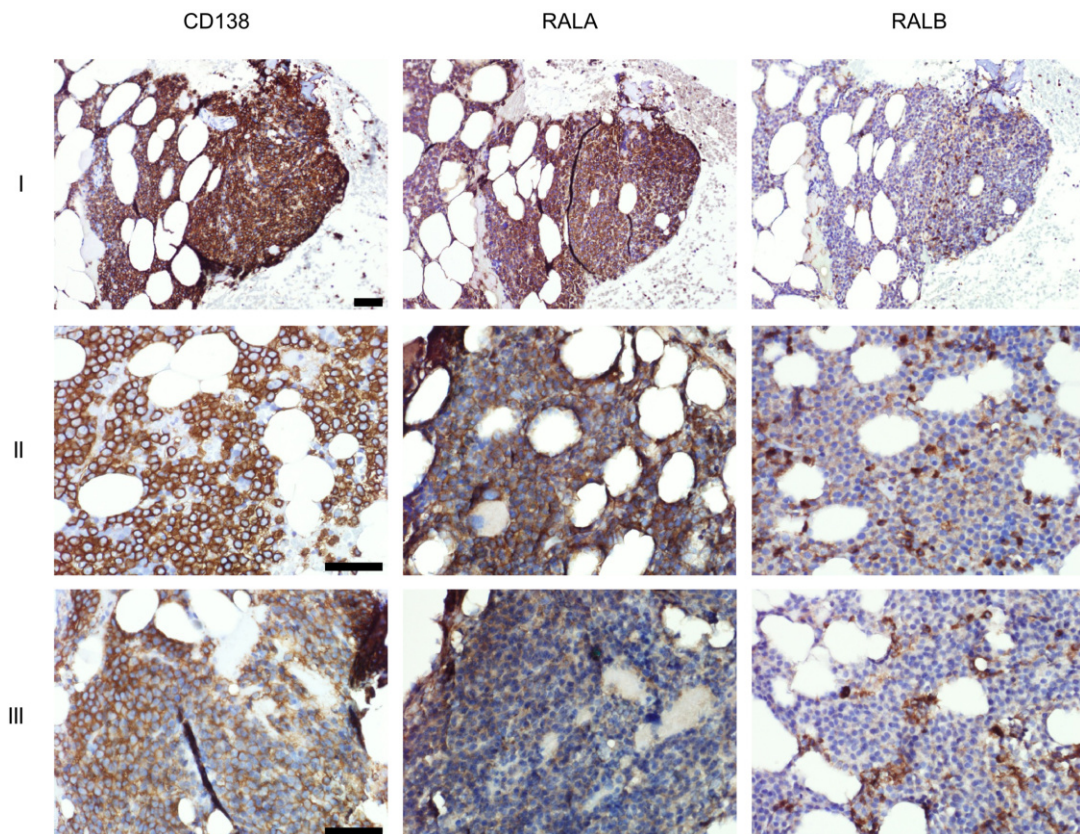
Zu Beginn wurde die Expression der RAL-Isoformen in HMZL und Primärzellen untersucht. Mittels Western Blot-Analysen von Gesamtzellextrakten und spezifischen Antikörpern gegen die RAL-Isoformen konnten beide Isoformen in sechs von sieben Zelllinien nachgewiesen werden. In den untersuchten Zelllinien (n=7) werden RALA und RALB unterschiedlich stark exprimiert, wobei U-266 keine RALB-Expression zeigt (Abb. 6A). RALA lag in allen HMZL in seiner aktivierten, GTP-gebundenen Form vor, was mittels RALA-spezifischen Pulldown-Assays untersucht wurde. In CD138-positiven primären MM-Zellen waren beide RAL-Isoformen in allen (n=10) Proben nachweisbar und deutlich heterogener in ihrer Stärke exprimiert (Abb. 6B). Zum Vergleich der RAL-Expression mit MAPK und PI3K/AKT-Signaling wurden im Western Blot ebenfalls die ERK1/2 und AKT-Expression von Zelllinien und Primärzellen untersucht. Zusätzlich wurde die ERK1/2 und AKT-Aktivierung mit phospho-spezifischen Antikörpern dargestellt. Sowohl bei Zelllinien als auch bei Primärzellen konnte kein Zusammenhang zwischen der RAL-Expression und der Expressionsstärke und Aktivierung von ERK1/2 oder AKT beobachtet werden.



**Abbildung 6: Expression der RAL-Isoformen in Myelomzellen.** (A) Repräsentative Western Blot-Analysen zeigen die RALA, RALB Expression und RALA-GTP in HMZL (n=7) und (B) RALA und RALB-Expression in primären MM-Zellen (n=10). Zusätzlich ist die Expression und Aktivierung des MAPK und AKT-Signalings gezeigt. Dabei ließ sich keine Korrelation zwischen RAL-Expression und ERK1/2 oder AKT-Aktivierung erkennen.  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladekontrolle.

Des Weiteren wurde die RAL-Expression *in situ* mit immunhistochemischen Färbungen von Knochenmarkbiopsaten untersucht. Nach einer Doppelfärbung von RALA/CD138 bzw. RALB/CD138 (Abb. 7) wurde die Expression in normalen Plasmazellen von gesun-

den Spendern (n=5), MGUS-Plasmazellen (n=10) und Zellen von MM-Patienten (n=26) miteinander verglichen. Die Expressionsstärke (Intensität der Färbung) wurde dabei in schwach, mittel oder stark eingeteilt. Bei normalen Plasmazellen war RALA in einer von fünf Proben nachweisbar. In dieser Probe waren 10 % der Zellen RALA-positiv und zeigten eine schwache Expression. Ebenso war RALA in fünf von zehn Proben mit prä-malignen MGUS-Plasmazellen schwach exprimiert. Hier schwankte der Anteil der RALA-positiven Zellen pro Probe zwischen 10-100 %. In normalen wie auch MGUS-Plasmazellen war RALB nicht nachweisbar. Im Gegensatz dazu war RALA in 22 von 26 Proben mit primären Myelomzellen nachweisbar. Hiervon waren bei 20 Proben 80-100 % der Zellen RALA-positiv mit einer mittleren oder starken RALA-Expression. Zwei Primärproben wiesen eine mittlere RALA-Expression in 25 % und 50 % der Zellen auf. In 14 der 26 Proben lag der Anteil der RALB-positiven Zellen pro Probe zwischen 5-30 % und zeigte eine schwache Expression. Diese Auswertung ist zusätzlich in Tab. 4 zusammengefasst.



**Abbildung 7: In situ Expression der RAL-Isoformen in primären Myelomzellen.** Die RALA und RALB-Expression wurde in Knochenmarkbiopsaten von 26 MM-Patienten untersucht. Dargestellt CD138, RALA und RALB-Färbungen einer Patientenprobe (I) in 200-facher Vergrößerung sowie zweier weiterer Patientenproben (II und III) in jeweils 400-facher Vergrößerung. Maßstab = 50  $\mu$ m. Die immunhistochemischen Färbungen wurden von Dr. Anja Mottok am Pathologischen Institut der Universität Würzburg durchgeführt.

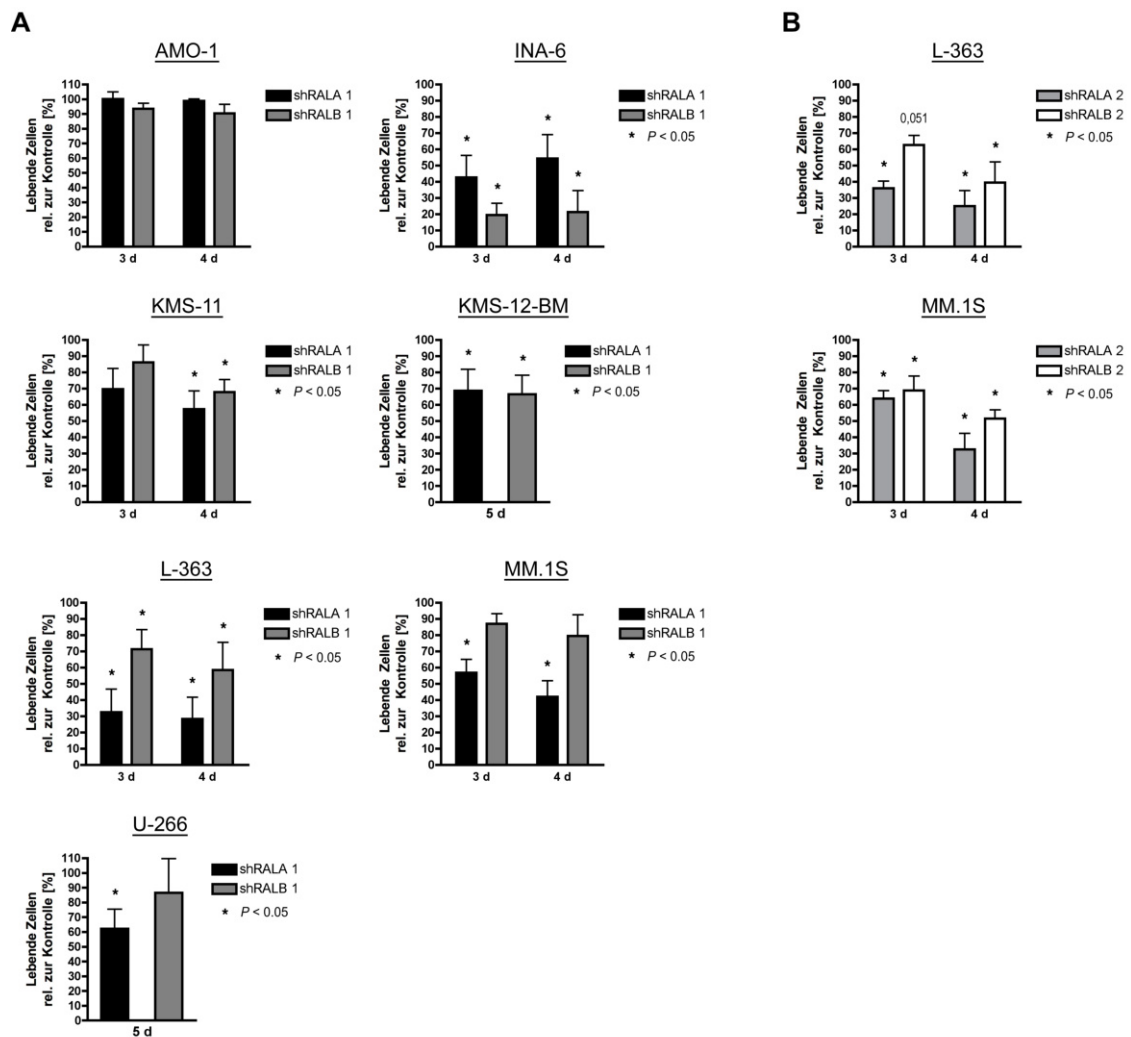
**Tabelle 4: Auswertung der RAL-Expression in immunhistochemischen Färbungen von normalen, MGUS und MM-Plasmazellen.** Die Expression wurde anhand der Intensität der Färbungen in schwach, mittel oder stark eingeteilt. In normalen Plasmazellen war RALA in 1 von 5 Proben nachweisbar. Dabei zeigten 10 % der Zellen eine schwache Expression. In MGUS-Plasmazellen war RALA in 5 von 10 Proben nachweisbar. Hiervon zeigten zwischen 10-100 % der Zellen eine schwache Expression. RALB war sowohl in normalen als auch in MGUS-Plasmazellen nicht nachweisbar. In MM-Plasmazellen war RALA in 22 von 26 Färbungen nachweisbar. 25-100 % der Zellen zeigten eine mittlere oder starke RALA-Expression. Bei 14 der 26 Färbungen zeigten 5-30 % der Zellen eine schwache RALB-Expression. NPZ=normale Plasmazellen, MGUS=Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz, MM=Multiples Myelom.

Befund	Anzahl (n)	RALA positiv		RALB positiv	
NPZ	5	1		0	
		positive Zellen	Expression	positive Zellen	Expression
		10 %	schwach	-	-
MGUS	10	5		0	
		positive Zellen	Expression	positive Zellen	Expression
		10-100 %	schwach	-	-
MM	26	22		14	
		positive Zellen	Expression	positive Zellen	Expression
		25-100 %	mittel-stark	5-30 %	schwach

### 3.2 Einfluss von shRNA-vermitteltem RAL-Knockdown auf das Zellüberleben von Myelomzellen

Da HMZL sowie primäre MM-Zellen eine erhöhte Expression der beiden RAL-Isoformen sowie eine grundsätzliche Aktivierung von RALA zeigten, wurde eine mögliche funktionelle Rolle beider Isoformen auf das Zellüberleben von MM-Zellen untersucht. Dazu wurde ein transienter RNAi-vermittelter Knockdown in HMZL erzeugt und anschließend ein Zellviabilitäts-Assay durchgeführt. Zunächst wurden shRNA-Expressionsvektoren mit unterschiedlichen Zielsequenzen gegen RALA (pSUP RALA 1 und pSUS RALA 2) und RALB (pSUP RALB 1 und pSUS RALB 2) generiert und Zelllinien anschließend damit transfiziert. Kontrollzellen wurden mit den entsprechenden Leervektoren transfiziert. Der Knockdown der jeweiligen RAL-Isoform wurde im Western Blot nachgewiesen und die Zellviabilität 3 d, 4 d oder 5 d nach Transfektion mit Annexin V/PI-Färbungen und Durchflusszytometrie untersucht (siehe Abb. 8 und Tab. 5). Nach RALA-Knockdown mit pSUPER shRNA-Expressionsvektoren (pSUP RALA 1) nahm das Zellüberleben bei 6 von 7 getesteten Zelllinien im Vergleich zu Kontrollzellen signifikant ab. RALB-Knockdown (pSUP RALB 1) führte bei 4 von 7 getesteten Zelllinien zu einer signifikanten Abnahme des Zellüberlebens. Dabei war INA-6 die einzige Zelllinie, deren Überleben nach RALB-Knockdown

stärker beeinflusst wurde als nach RALA-Knockdown. Ein RALA und RALB-Knockdown mit pSUS shRNA-Expressionsvektoren (pSUS RALA 2 und pSUS RALB 2) löste in L-363 und MM.1S-Zellen ebenfalls signifikant Apoptose aus. Die Überlebensraten der einzelnen Zelllinien nach RAL-Knockdown sind zusammen mit dem Zeitpunkt der Messung des Zellüberlebens in Tab. 5 aufgelistet.



**Abbildung 8: Zellüberleben von MM-Zelllinien nach RAL-Knockdown.** RALA-Knockdown mit pSUP RALA 1-Vektoren führte in 6 der 7 getesteten Zelllinien zu einer signifikanten Induktion von Apoptose. RALB-Knockdown mit pSUP RALB 1-Vektoren verringerte das Überleben in 4 der 7 untersuchten Zelllinien signifikant. Nach RALA und RALB-Knockdown mit pSUS shRNA-Expressionsvektoren (pSUS RALA 2 und pSUS RALB 2) wurde das Zellüberleben von L-363 und MM.1S ebenfalls signifikant reduziert. Das Zellüberleben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mittels Annexin V/PI-Färbung und Durchflusszytometrie bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus unabhängigen Triplikaten. Prozentwerte wurden relativ zu Leervektor-Kontrollen berechnet.

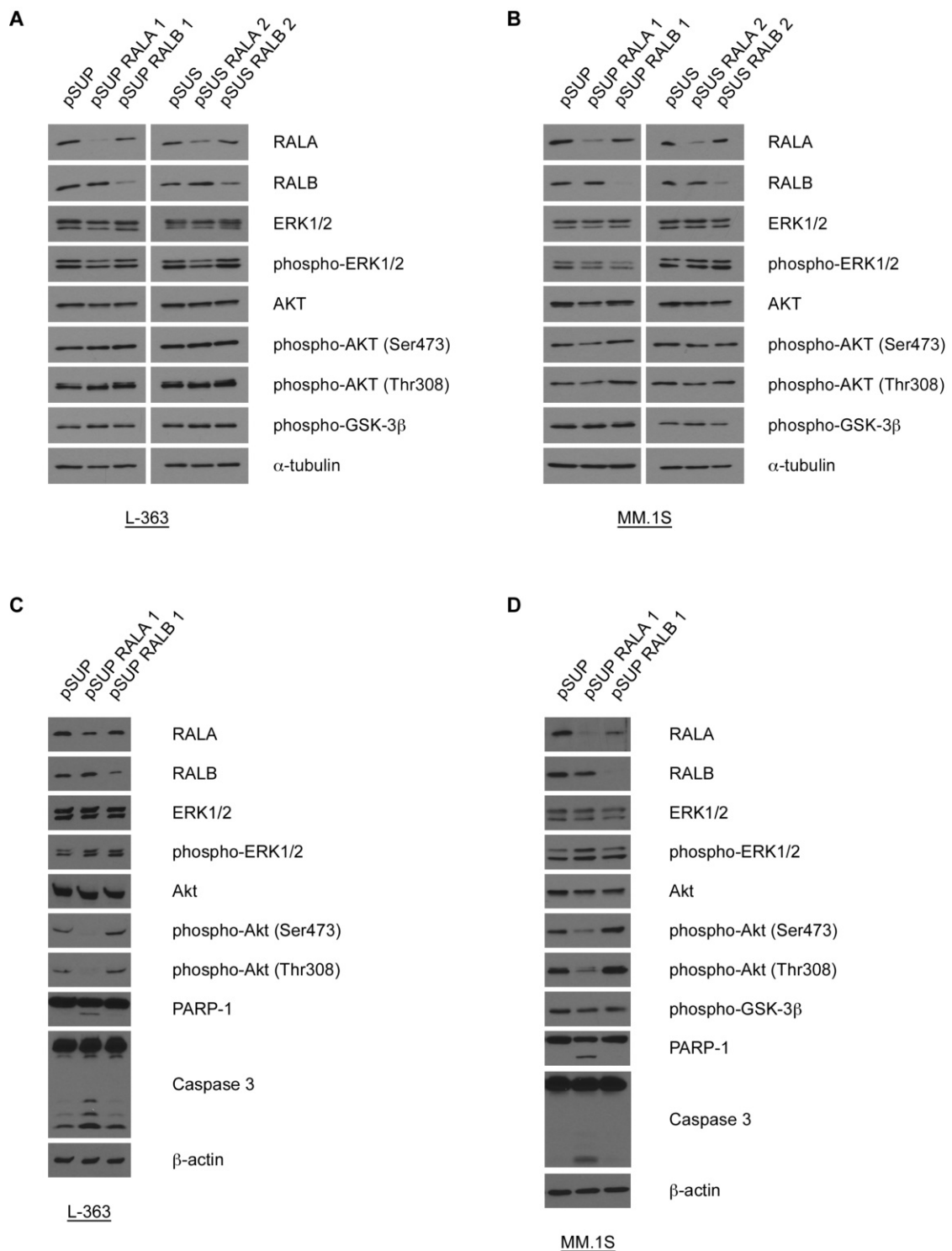
**Tabelle 5: Zellüberlebensraten von MM-Zelllinien nach RAL-Knockdown.** Prozentwerte geben für jeden Zeitpunkt nach Transfektion die mittlere Rate an lebenden Zellen von drei unabhängigen Experimenten relativ zur Kontrolle an. Das Zellüberleben zum jeweiligen Zeitpunkt wurde durch Annexin V/PI-Färbung und Durchflusszytometrie bestimmt. Aufgrund einer langsameren Proliferation von KMS-12-BM und U-266-Zellen wurden hier spätere Zeitpunkte zur Messung des Zellüberlebens gewählt.

Zelllinie	pSUP RALA	pSUP RALB	pSUS RALA	pSUS RALB	Zeit nach Transfektion
AMO-1	100 %	93 %	-	-	3 d
	99 %	90 %	-	-	4 d
INA-6	43 %	19 %	-	-	3 d
	54 %	21 %	-	-	4 d
KMS-11	70 %	86 %	-	-	3 d
	57 %	68 %	-	-	4 d
KMS-12-BM	69 %	66 %	-	-	5 d
L-363	33 %	71 %	36 %	63 %	3 d
	28 %	59 %	25 %	39 %	4 d
MM.1S	57 %	87 %	64 %	69 %	3 d
	42 %	79 %	32 %	52 %	4 d
U-266	62 %	87 %	-	-	5 d

### 3.3 Einfluss von shRNA-vermitteltem RAL-Knockdown auf die Aktivierung des MAPK oder PI3K-Signalwegs

Nachfolgend wurde der Zusammenhang zwischen RAL und klassischem RAS-abhängigem und RAS-unabhängigem Signaling untersucht. Wie bisherige Daten zeigten, besteht im MM eine Abhängigkeit zwischen onkogenem RAS und der MAPK-Aktivierung, wohingegen die PI3K/AKT-Aktivierung unabhängig von onkogenem RAS ist [46, 118]. Um den Einfluss von RAL auf RAS-abhängiges MEK/ERK und RAS-unabhängiges PI3K/AKT-Signaling im MM zu untersuchen, wurde die Aktivierung beider Signalwege in HMZL nach RAL-Knockdown analysiert. Dabei wurden jeweils zwei verschiedene Zielsequenzen genutzt, um RALA oder RALB in L-363 und MM.1S-Zellen auszuschalten. Nach 2 d wurden ERK1/2 und AKT-Proteinspiegel sowie die jeweiligen phospho-Proteinspiegel mit spezifischen Antikörpern mittels Western Blot analysiert. Außerdem wurde die Phosphorylierung des AKT-Substrats GSK-3 $\beta$  untersucht. RALA sowie RALB-Knockdown mit jeweils beiden Zielsequenzen (pSUP RALA 1 und pSUS RALA 2 bzw. pSUP RALB 1 und pSUS RALB 2) hatte nach 2 d in L-363 und MM.1S keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von ERK1/2, AKT und GSK-3 $\beta$  (Abb. 9A und B). Nach 3 d hatte in L-363 und MM.1S weder RALA-

noch RALB-Knockdown einen Einfluss auf die ERK1/2-Phosphorylierung, wohingegen die AKT-Phosphorylierung bei beiden Zelllinien durch RALA-Knockdown reduziert wurde, nicht jedoch durch RALB-Knockdown (Abb. 9C und D). Eine zusätzliche Western Blot-Analyse von PARP-1 und Caspase 3 nach 3 d zeigte eine Spaltung beider Proteine nach RALA-Knockdown (Abb. 9C und D).



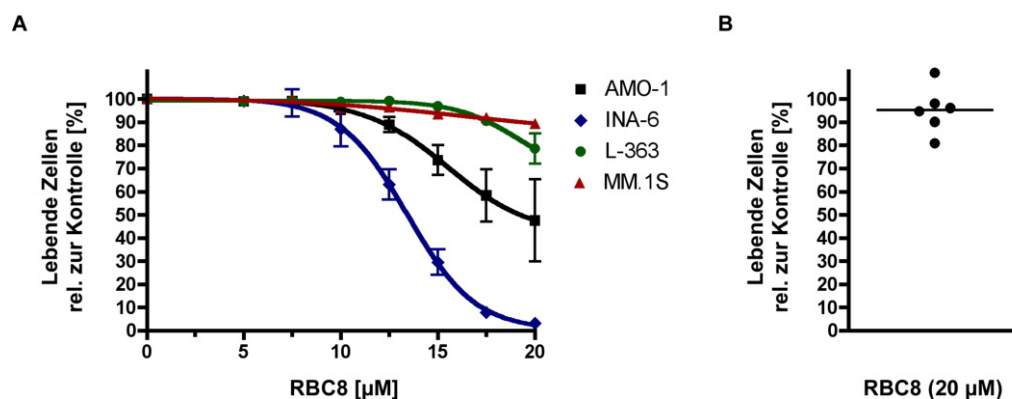
**Abbildung 9: Western Blot-Analyse der MAPK und AKT-Aktivierung nach RAL-Knockdown.** RALA und RALB-Knockdown wurde nach 2 d in L-363 (**A**) und MM.1S (**B**) mit zwei verschiedenen Zielsequenzen für jede RAL-Isoform durchgeführt. Exemplarische Western Blot-Analysen zeigen 2 d nach RALA und RALB-Knockdown keine Veränderung der ERK1/2, AKT und GSK-3 $\beta$ -Phosphorylierung. 3 d nach RALA-Knockdown wurden bei L-363 (**C**) sowie MM.1S (**D**) Verringerungen in der AKT-Phosphorylierung und Spaltungen von PARP-1 und Caspase 3 beobachtet.  $\alpha$ -Tubulin bzw.  $\beta$ -actin dienten als Ladekontrolle.



### 3.4 Behandlung von MM-Zellen mit dem RAL-Inhibitor RBC8

Die chemische Verbindung RBC8 wurde erstmals von Yan *et al.* 2014 als allosterischer RAL-Inhibitor beschrieben [100]. RBC8 wirkt durch Bindung an RAL-GDP in einer Region innerhalb der Switch II-Region, die an die Guanin-Nukleotid-Bindungstasche angrenzt. Dadurch wird RAL in seinem GDP-gebunden inaktivierten Zustand gehalten und der GDP-GTP-Zyklus unterbrochen [64].

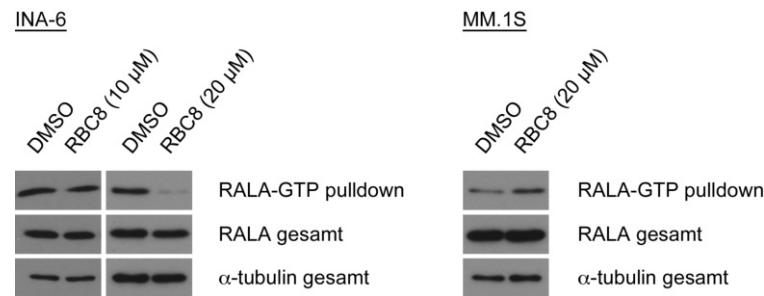
AMO-1, INA-6, MM.1S und L-363-Zellen wurden für 3 d mit steigenden Konzentrationen von RBC8 behandelt, anschließend wurde das Zellüberleben mittels Annexin V/PI-Färbung und Durchflusszytometrie gemessen. Aus den gemessenen Werten aus drei unabhängigen Experimenten wurden Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt, aus denen jeweils die mittlere effektive Konzentration ( $EC_{50}$ ) abgeleitet wurde. Im Gegensatz zum RAL-Knockdown hatte eine RAL-Blockade durch RBC8 in diesen Zelllinien einen vergleichsweise geringen Effekt auf das Überleben der Zellen (siehe Abb. 10A). In AMO-1 und INA-6 wurde das Überleben mit höheren Konzentrationen reduziert ( $EC_{50}$ -Werte:  $19,2 \mu\text{M}$  bzw.  $13,5 \mu\text{M}$ ), wohingegen in MM.1S und L-363 auch bei höheren Konzentrationen bis  $20 \mu\text{M}$  kaum Effekte auf das Zellüberleben zu beobachten waren. Bei der Behandlung von primären MM-Zellen mit ansteigenden RBC8-Konzentrationen wurde bei keiner der Proben das Zellüberleben unter 80 % lebende Zellen relativ zur Kontrolle reduziert (Abb. 10B).



**Abbildung 10: Zellüberleben nach Behandlung von MM-Zelllinien mit dem RAL-Inhibitor RBC8.** (A) AMO-1, INA-6, L-363 und MM.1S-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen des RAL-Inhibitors RBC8 behandelt. Das Zellüberleben wurde nach 3 d mittels Durchflusszytometrie und Annexin V/PI-Färbung ermittelt. In AMO-1 und INA-6-Zellen wurde das Zellüberleben durch RBC8-Behandlung bei Konzentrationen über  $10 \mu\text{M}$  beeinflusst. In L-363 und MM.1S-Zellen wurde das Zellüberleben durch RBC8-Behandlung kaum beeinflusst. (B) Das Zellüberleben von primären MM-Zellen, die mit RBC8 behandelt wurden, wurde nicht unter 80 % lebende Zellen relativ zur Kontrolle verringert.

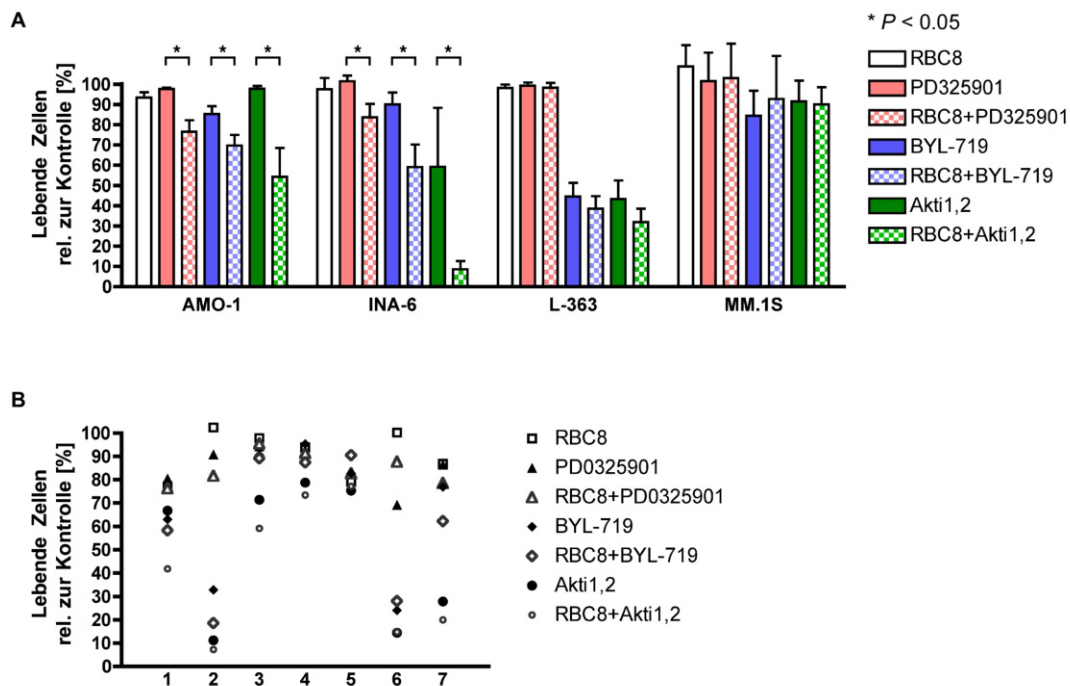
Um die Effekte von RBC8 auf die RAL-Aktivierung *in vitro* zu untersuchen, wurden RALA-Pulldown-Assays nach RBC8-Behandlung durchgeführt. MM.1S und INA-6-Zellen wurden für 3 h mit  $20 \mu\text{M}$  RBC8 behandelt. Anschließend wurde aktiviertes RALA-GTP mittels

Pulldown-Assays isoliert und im Western Blot analysiert. Nach Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  RBC8 wurden in MM.1S und INA-6 keine Veränderungen in den RALA-GTP-Spiegeln beobachtet, während eine Behandlung mit 20  $\mu\text{M}$  RBC8 zu reduzierten RALA-GTP-Spiegeln führte (Abb. 11).



**Abbildung 11: RAL-Aktivierung nach Behandlung von MM-Zellen mit dem RAL-Inhibitor RBC8.** MM.1S und INA-6-Zellen wurden für 3 h mit 20  $\mu\text{M}$  RBC8 behandelt. In anschließenden RALA-Pulldown-Assays wurde in MM.1S kein Einfluss von RBC8 auf die RALA-Aktivierung festgestellt. In INA-6-Zellen wurden die RALA-GTP-Spiegel durch Behandlung mit 20  $\mu\text{M}$  RBC8 reduziert, während bei einer Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  kein Effekt auf die RALA-Aktivierung zu beobachten war. RALA-Gesamtproteinspiegel und  $\alpha$ -Tubulin dienten als Ladekontrolle.

Die Kombination einer Behandlung mit dem RAL-Inhibitor RBC8 mit Inhibitoren des MAPK- bzw. PI3K/AKT-Signalwegs wurde in HMZL und primären MM-Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen für 3 d mit den pharmakologischen Inhibitoren PD0352901, BYL-719 und Akti-1,2 allein und in Kombination mit RBC8 behandelt. Zellen, die sensitiv gegenüber einer RBC8-Behandlung waren (AMO-1 und INA-6, Vergleich Abb. 10), zeigten ebenfalls additive Effekte auf die Reduktion des Zellüberlebens nach Kombinations-Behandlung. Im Gegensatz dazu war bei Zellen, die insensitive gegenüber RBC8 waren (L-363 und MM.1S), keine verstärkte Apoptose-Induktion durch die Kombination von RBC8 mit PD0352901, BYL-719 oder Akti-1,2 zu beobachten (Abb. 12A). Ebenso zeigten primäre MM-Zellen, die ebenfalls weitestgehend insensitive gegenüber RBC8 waren, keine zusätzliche Reduktion des Zellüberlebens nach Kombination von RBC8 mit PD0352901, BYL-719 oder Akti-1,2 (Abb. 12B).

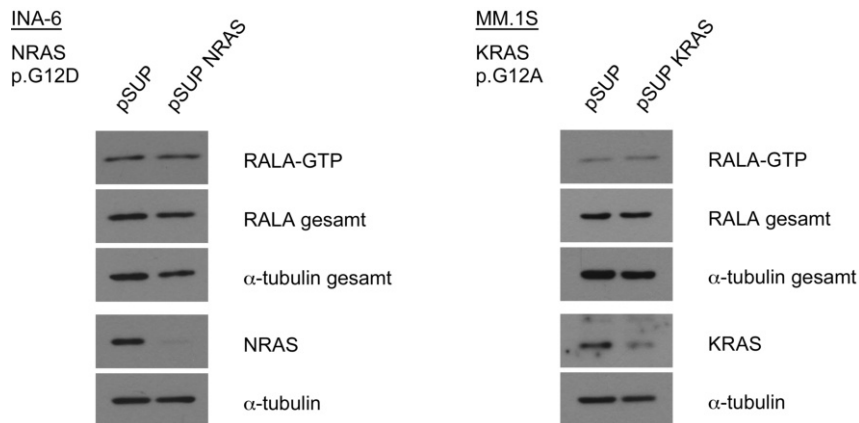


**Abbildung 12: Zellüberleben nach Behandlung von MM-Zellen mit dem RAL-Inhibitor RBC8 in Kombination mit MAPK- bzw. PI3K/AKT-Inhibitoren. (A)** HMZL wurden für 3 d mit 10  $\mu\text{M}$  RBC8, 1  $\mu\text{M}$  PD0325901, 10  $\mu\text{M}$  (AMO-1, INA-6, L-363) bzw. 2,5  $\mu\text{M}$  (MM.1S) BYL-719, 10  $\mu\text{M}$  (AMO-1, L-363) bzw. 5  $\mu\text{M}$  (INA-6, MM.1S) Akti-1,2 und jeweils der Kombination von RBC8 mit einer der anderen drei Inhibitoren behandelt. Die RBC8-sensitiven Zelllinien AMO-1 und INA-6 zeigten jeweils eine verstärkte Apoptose-Induktion bei Kombination von RBC8-Behandlung mit MAPK, PI3K oder AKT-Inhibition. In den RBC8-insensitiven Zelllinien L-363 und MM.1S brachte eine Kombination von RBC8 mit MAPK, PI3K oder AKT-Inhibitoren keine zusätzlichen Effekte auf das Zellüberleben. **(B)** Primäre MM-Zellen ( $n=7$ ) wurden ebenfalls für 3 d mit 20  $\mu\text{M}$  RBC8, 1  $\mu\text{M}$  PD0325901, 10  $\mu\text{M}$  BYL-719, 10  $\mu\text{M}$  Akti-1,2 und der jeweiligen RBC8-Kombination behandelt. In den Primärzellen kam es kaum zu einer verstärkten Apoptose-Induktion durch eine MAPK, PI3K oder AKT-Inhibition in Kombination mit RBC8. Balkendiagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichung dreier unabhängiger Replikate. Prozentwerte wurden relativ zu DMSO-behandelten Kontrollzellen errechnet. Punktdiagramme zeigen Zellüberlebensraten der Einzelmesswerte relativ zur jeweiligen DMSO-behandelten Kontrolle. Zellüberlebensraten wurden mittels Durchflusszytometrie und Annexin V/PI-Färbung gemessen.

### 3.5 Abhängigkeit der RAL-Aktivierung von onkogenem RAS

Um zu untersuchen, ob ein direkter Zusammenhang zwischen onkogenem RAS und RAL-Aktivierung besteht, wurden RAL-Pulldown-Assays nach RAS-Knockdown durchgeführt. Dazu wurden die RAS-mutierten Zelllinien INA-6 (NRAS-p.G12D) und MM.1S (KRAS-p.G12A) mit pSUPER shRNA-Expressionsvektoren gegen NRAS bzw. KRAS transfiziert. RAS-Knockdown wurde nach 2 d mittels Western Blot verifiziert und RAL-spezifische Pulldown-Assays durchgeführt. Die RAL-Aktivierung wurde durch Entfernung von onkoge-

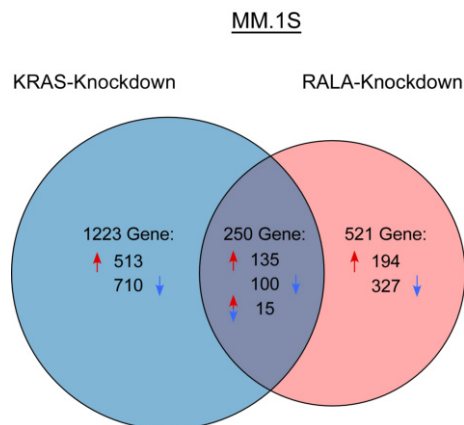
nem RAS in INA-6 und MM.1S nicht beeinflusst (Abb. 13). RALA-Gesamtproteinspiegel dienten neben  $\alpha$ -Tubulin als Ladungskontrolle und zeigten ebenfalls keine Veränderung durch RAS-Knockdown.



**Abbildung 13: RAL-Aktivierung nach RAS-Knockdown.** Onkogenes RAS wurde in *NRAS*-mutierten (p.G12D) INA-6-Zellen und *KRAS*-mutierten (p.G12A) MM.1S-Zellen mittels spezifischen shRNA-Expressionsvektoren ausgeschaltet. RALA-Pulldown-Assays wurden 2 d nach Transfektion durchgeführt. Western-Analysen zeigen bei beiden Zelllinien keine Veränderung der RALA-Aktivierung durch Knockdown von onkogenem RAS. RALA-Gesamtproteinspiegel und  $\alpha$ -Tubulin dienten als Ladungskontrolle.

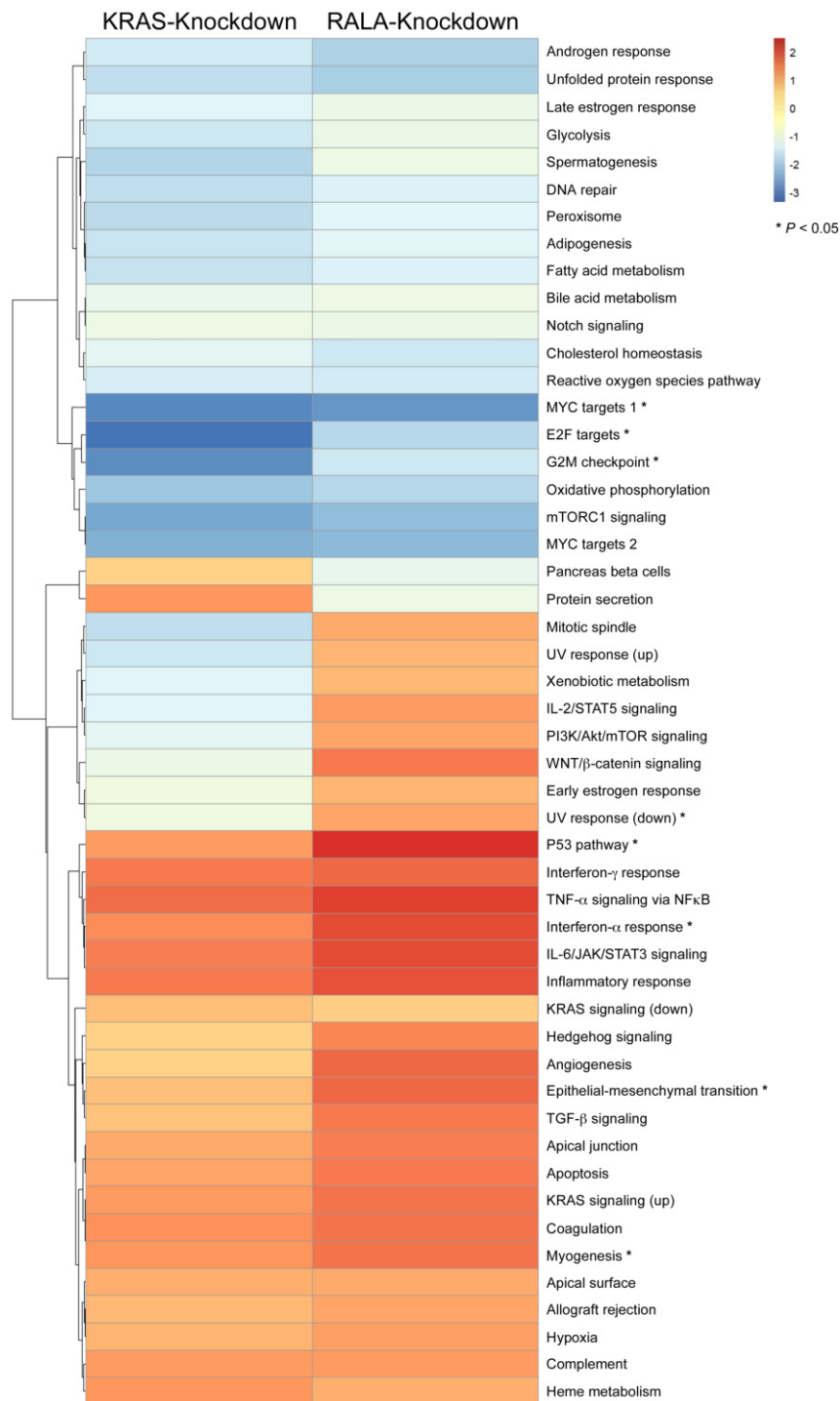
### 3.6 Genexpressionsanalyse nach RAS und RAL-Knockdown

Nachdem gezeigt wurde, dass die RAL-Aktivierung unabhängig von onkogenem RAS ist (Vgl. Abb. 13), wurde der Einfluss beider Proteine auf die Genexpression untersucht und verglichen. Dafür wurden MM.1S-Zellen mit pSUSTER2 shRNA-Expressionsvektoren gegen *KRAS*, *RALA* oder mit Leervektoren als Kontrolle transfiziert. Der Knockdown wurde nach 2 d im Western Blot nachgewiesen, RNA isoliert und RNA-Sequenzierungen durchgeführt. Bei Genexpressionsanalysen wurde die differenzielle Expression aller Gene mit einer false discovery rate (FDR) von  $<0,05$  untersucht. Nach *KRAS*-Knockdown zeigten von  $n=1473$  differenziell exprimierten Genen,  $n=656$  eine Hochregulation und  $n=817$  eine Herabregulation. Dagegen waren von  $n=771$  differenziell exprimierten Genen nach *RALA*-Knockdown  $n=336$  hochreguliert und  $n=435$  herabreguliert (Abb. 14). Ein *KRAS*-Knockdown hatte somit insgesamt einen größeren Einfluss auf die Änderung der Genexpression als ein *RALA*-Knockdown. Dabei ergab sich eine Überschneidung von  $n=250$  Genen ( $n=135$  hochreguliert,  $n=100$  herabreguliert,  $n=15$  in unterschiedliche Richtung verändert). Diese war im Vergleich zur Anzahl der nicht-überlappenden Gene ( $n=1744$ ) deutlich geringer.

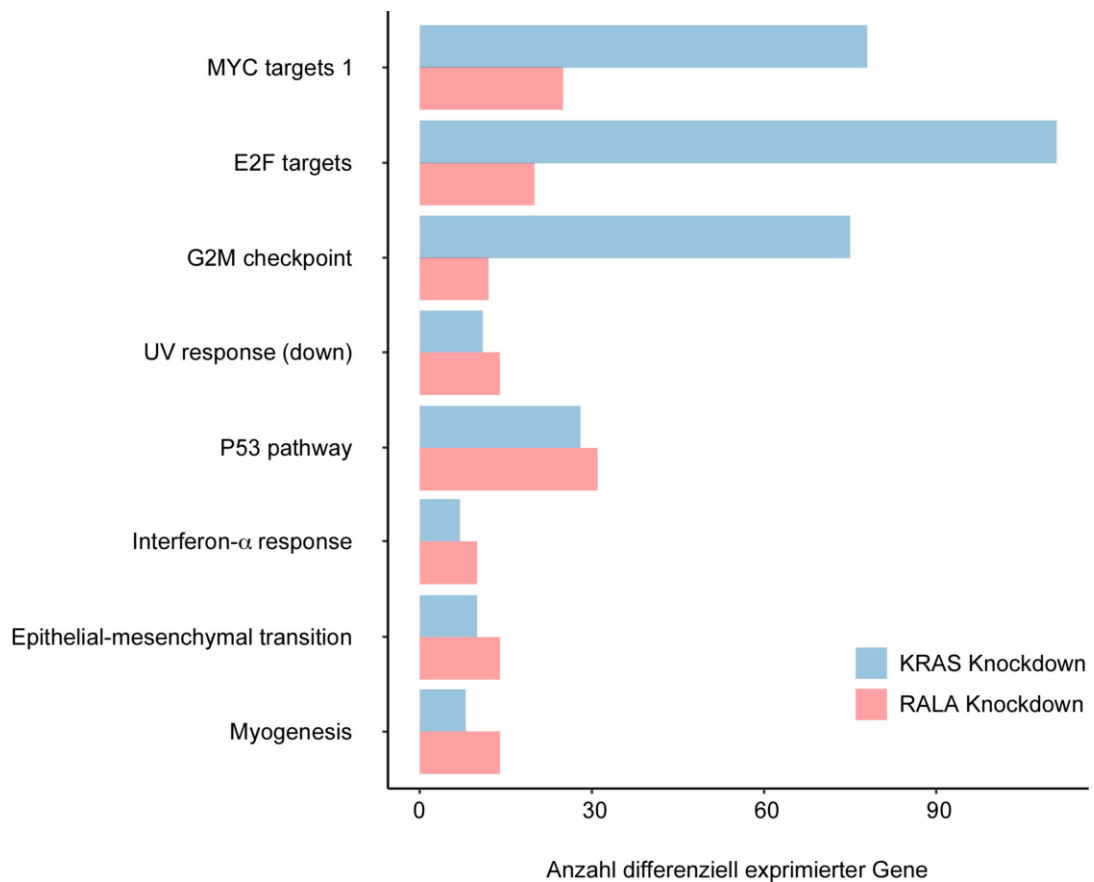


**Abbildung 14: Anzahl differenziell exprimierter Gene nach onkogenem KRAS- bzw. RALA-Knockdown.** RNA-Sequenzierungen wurden nach shRNA-vermitteltem KRAS oder RALA-Knockdown in MM.1S durchgeführt. Gezeigt sind alle differenziell exprimierten Gene mit einer FDR <0,05 von insgesamt 28 440 analysierten Genen. Nach KRAS-Knockdown zeigten 1473 Gene (656 hochreguliert, 817 herabreguliert) eine differenzielle Expression, nach RALA-Knockdown 771 Gene (336 hochreguliert, 435 herabreguliert). Bei 250 Genen war die Expression unter beiden Bedingungen verändert, wovon 135 erhöht waren und 100 verringert. 15 Gene wiesen unter beiden Bedingungen eine Expressionsänderung in die entgegengesetzte Richtung auf.

Für alle differenziell exprimierten Gene nach KRAS oder RALA-Knockdown wurde eine Gene Set Anreicherungsanalyse (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA) mit der *Molecular Signatures Database Hallmark Gene Set Collection* [119] durchgeführt und die Anreicherung differenziell exprimierter Gen-Cluster in einer Heatmap dargestellt. Die erstellten Genexpressionsprofile zeigen bei 8 Gen-Clustern eine signifikante Änderung in der Anzahl der differenziell exprimierten Gene zwischen beiden Knockdown-Bedingungen (siehe Abb. 15). Innerhalb dieser 8 Gen-Cluster ist erkennbar, dass die Expression der Gene in den Clustern *MYC targets 1*, *E2F targets* und *G2M checkpoint* signifikant mehr durch KRAS-Knockdown verändert wurde als durch RALA-Knockdown. Im Gegensatz dazu wurden durch RALA-Knockdown signifikant mehr Gene in den Clustern *UV response (down)*, *P53 pathway*, *Interferon- $\alpha$  response*, *Epithelial-mesenchymal transition* und *Myogenesis* in ihrer Expression verändert als nach KRAS-Knockdown (Abb. 16).



**Abbildung 15: Heatmap aus der Anreicherungsanalyse aller differenziell exprimierten Gene nach KRAS oder RALA-Knockdown in MM.1S-Zellen.** Genexpressionsänderungen wurden mittels einer GSEA in Genclustern zusammengefasst. Die Farbcodierung zeigt eine bis zu zweifache Hochregulation und eine bis zu dreifache Herabregulation. 8 Gencluster weisen signifikante Unterschiede in den Anteilen der differenziell exprimierten Gene zwischen beiden Knockdown-Bedingungen auf.



**Abbildung 16: Gencluster mit signifikant veränderten Anteilen differenziell exprimierter Gene nach KRAS und RALA-Knockdown.** Aus der GSEA zeigen 8 Gencluster eine unterschiedliche Anzahl differenziell exprimierter Gene zwischen KRAS und RALA-Knockdown (adjusted  $P$ -value  $<0.05$ ). In den Clustern *MYC targets 1*, *E2F targets* und *G2M checkpoint* sind nach KRAS-Knockdown mehr Gene in ihrer Expression verändert als nach RALA-Knockdown. Demgegenüber ist nach RALA-Knockdown die Expression der Gene in den Clustern *UV response (down)*, *P53 pathway*, *Interferon- $\alpha$  response*, *Epithelial-mesenchymal transition* und *Myogenesis* stärker verändert als durch KRAS-Knockdown.

Zur weiteren funktionellen Klassifikation der differenziell exprimierten Gene wurden diese mit Hilfe der bioinformatischen Plattform WebGestalt (WEB-based GENE SeT Analysis Toolkit [120–122]) in einer Overrepresentation Enrichment Analysis (ORA) in Gene Ontology (GO) Terms kategorisiert. Als funktionelle Datenbank wurde die „GO biological process“ Datenbank des Gene Ontology Consortiums gewählt. Die notwendige Mindestanzahl der Gene in einer Kategorie betrug 5, die maximale Anzahl von Genen in einer Kategorie war 2000. In Tab. 6 sind die Top 10 der angereicherten Kategorien für beide Knockdown-Bedingungen aufgeführt. KRAS-Knockdown beeinflusste neben den GO Terms *mitotic cell cycle* und *cell cycle* hauptsächlich Prozesse des DNA-Metabolismus. Im Gegensatz dazu reguliert RALA-Knockdown neben der zellulären Stressantwort, Zelltod und Apoptose vor allem Prozesse des Protein-Metabolismus. Diese Beobachtungen entsprechen

den Genexpressionsanalysen mit der GSEA (Vergleich Abb. 16), bei der die Gencluster, die hauptsächlich durch KRAS-Knockdown verändert waren, den Zellzyklus betreffen und Gencluster, die vorrangig durch RALA-Knockdown verändert waren, metabolische Prozesse und Apoptose darstellen.

**Tabelle 6: Anreicherungsanalyse differenziell exprimierter Gene nach KRAS- bzw. RALA-Knockdown.** Gene, die nach KRAS oder RALA-Knockdown eine veränderte Expression aufwiesen, wurden mit Hilfe von Webgestalt zu funktionellen Kategorien (GO terms) annotiert. Die Tabelle zeigt die Anreicherungen der 10 Top-Kategorien nach KRAS- bzw. RALA-Knockdown. C=Anzahl der Gene in der Referenzgenliste; O=Anzahl der Gene aus dem Datensatz, die mit der Referenzkategorie übereinstimmen; E=Erwartete Anzahl in der Kategorie; R=Verhältnis der Anreicherung; FDR=false discovery rate.

KRAS-knockdown							
Name	C	O	E	R	P-Wert	FDR	ID
mitotic cell cycle	972	187	75,69	2,47	0	0	GO:0000278
nuclear division	573	107	44,62	2,40	0	0	GO:0000280
sister chromatid segregation	215	61	16,74	3,64	0	0	GO:0000819
DNA metabolic process	947	190	73,74	2,58	0	0	GO:0006259
DNA replication	294	92	22,89	4,02	0	0	GO:0006260
DNA-dependent DNA replication	143	57	11,14	5,12	0	0	GO:0006261
DNA repair	497	97	38,70	2,51	0	0	GO:0006281
cellular response to DNA damage stimulus	767	138	59,73	2,31	0	0	GO:0006974
cell cycle	1684	276	131,13	2,10	0	0	GO:0007049
chromosome segregation	329	83	25,62	3,24	0	0	GO:0007059

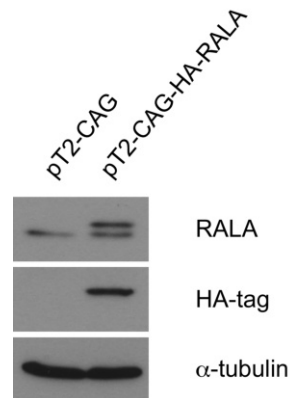


RALA-knockdown							
Name	C	O	E	R	P-Wert	FDR	ID
cellular response to stress	1720	121	70,46	1,72	$1,31 \times 10^{-9}$	$1,12 \times 10^{-5}$	GO:0033554
regulation of intracellular signal transduction	1684	116	68,98	1,68	$1,05 \times 10^{-8}$	$4,47 \times 10^{-5}$	GO:1902531
apoptotic process	1782	118	73,00	1,62	$6,95 \times 10^{-8}$	$1,98 \times 10^{-4}$	GO:0006915
programmed cell death	1802	118	73,82	1,60	$1,27 \times 10^{-7}$	$2,47 \times 10^{-4}$	GO:0012501
regulation of protein modification process	1629	109	66,73	1,63	$1,45 \times 10^{-7}$	$2,47 \times 10^{-4}$	GO:0031399
positive regulation of protein metabolic process	1485	101	60,83	1,66	$2,09 \times 10^{-7}$	$2,97 \times 10^{-4}$	GO:0051247
negative regulation of cellular protein metabolic process	968	73	39,65	1,84	$2,87 \times 10^{-7}$	$3,10 \times 10^{-4}$	GO:0032269
negative regulation of protein metabolic process	1023	76	41,91	1,81	$2,90 \times 10^{-7}$	$3,10 \times 10^{-4}$	GO:0051248
cell death	1916	122	78,49	1,55	$3,41 \times 10^{-7}$	$3,24 \times 10^{-4}$	GO:0008219
positive regulation of cellular protein metabolic process	1399	95	57,31	1,66	$5,47 \times 10^{-7}$	$4,67 \times 10^{-4}$	GO:0032270

### 3.7 Stabile Expression von HA-markiertem RALA in Myelomzellen

Für massenspektrometrische Analysen der RAL-Interaktionspartner wurden MM.1S-Zellen so modifiziert, dass HA-markiertes RALA stabil exprimiert wird. Dazu wurden Zellen mit Sleeping Beauty Transposon-Vektoren (pT2/SVPuro/CAG) und Proteinexpressionsvektoren für die Expression der Transposase transfiziert. Kontrollzellen wurden mit Sleeping Beauty Leervektoren und dem Transposase-Expressionsplasmid transfiziert. Nach anschließender Selektion erfolgreich transponierter Zellen mit Puromycin wurde die Proteinexpression im Western Blot analysiert. In Kontrollzellen, war HA-markiertes RALA nicht

nachweisbar, während in pT2/CAG/HA-RALA-transfizierten Zellen die exprimierten HA-RALA-Proteine sowohl mit dem spezifischen anti-RALA-Antikörper als auch dem anti-HA-Antikörper nachweisbar waren (Abb. 17). Im Vergleich zu endogen exprimiertem RALA wurde HA-RALA in ähnlicher Menge exprimiert.

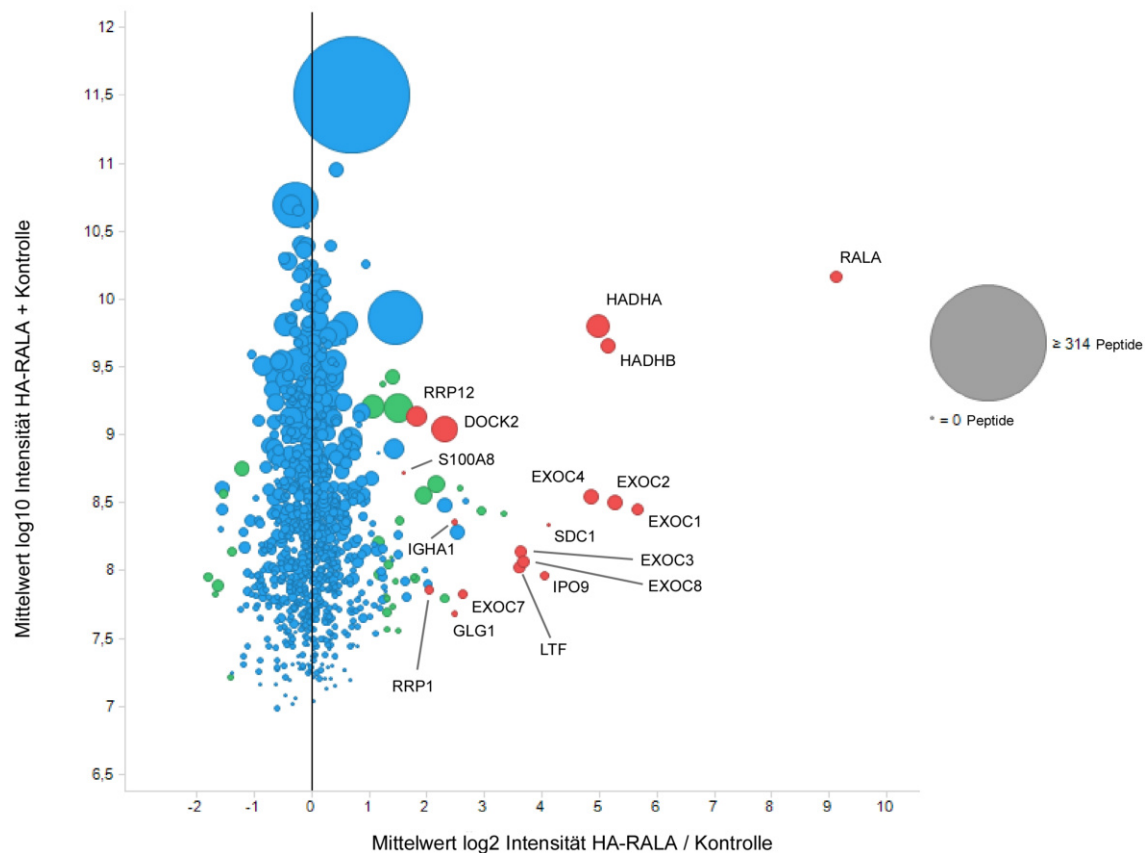


**Abbildung 17: Stabile Expression von HA-markiertem RALA in MM.1S.** HA-RALA wurde in MM.1S-Zellen mittels Sleeping Beauty Konstrukten stabil exprimiert und im Western Blot nachgewiesen. Kontrollzellen wurden mit Leervektoren sowie dem Transposase-Expressionsplasmid transfiziert.

### 3.8 Massenspektrometrische Analyse von RAL-Interaktionspartnern

Die in Kapitel 3.7 erzeugten MM.1S-Zellen wurden zur massenspektrometrischen Analyse von RAL-Interaktionspartnern genutzt. Zunächst wurde in Proteinkomplex Immunpräzipitations-Reaktionen (Co-IP) HA-RALA und damit interagierende Proteine aus Zellysaten isoliert. Zellen, die mit pT2/SVPuro/CAG-Leervektoren transfiziert und selektioniert wurden, stellten dabei eine Leerkontrolle dar. Die isolierten HA-RALA-Proteine und dessen Interaktionspartner wurden daraufhin mit Hilfe der quantitativen Massenspektrometrie analysiert. Mit Markierungsfreier massenspektrometrischer Quantifizierung (label-free quantification, LFQ) wurden Peptide aus zwei unabhängigen Replikaten identifiziert und Mediane der LFQ-Werte errechnet. Dabei wurden 48 Proteine als potentielle Interaktionspartner identifiziert, davon 17 Proteine mit höchster Konfidenz (Abb. 18). Darunter fallen 6 Proteine des Exocyst-Komplexes (EXOC1-4, 7 und 8). 5 der identifizierten Exocyst-Komponenten (EXOC1, 2, 3, 4 und 8) sind ebenfalls als hoch-konfidente Interaktionspartner in der Hit-Predict Datenbank gelistet, einer Meta-Datenbank für Protein-Protein Interaktionen [123]. Weiterhin wurden folgende Proteine als Interaktionspartner identifiziert, die jedoch nicht in der HitPredict Datenbank gelistet sind: Trifunctional enzyme subunit alpha (HADHA), Trifunctional enzyme subunit beta (HADHB), Deducator of cytokinesis protein 2 (DOCK2), RRP12-like protein (RRP12), Ribosomal RNA processing protein 1 (RRP1), Protein S100-A8 (S100A8), Syndecan-1 (SDC1), Importin-9 (IPO9), Lactotransferrin (LTF), Ig alpha-1

chain C region (IGHA1) und Golgi apparatus protein 1 (GLG1).



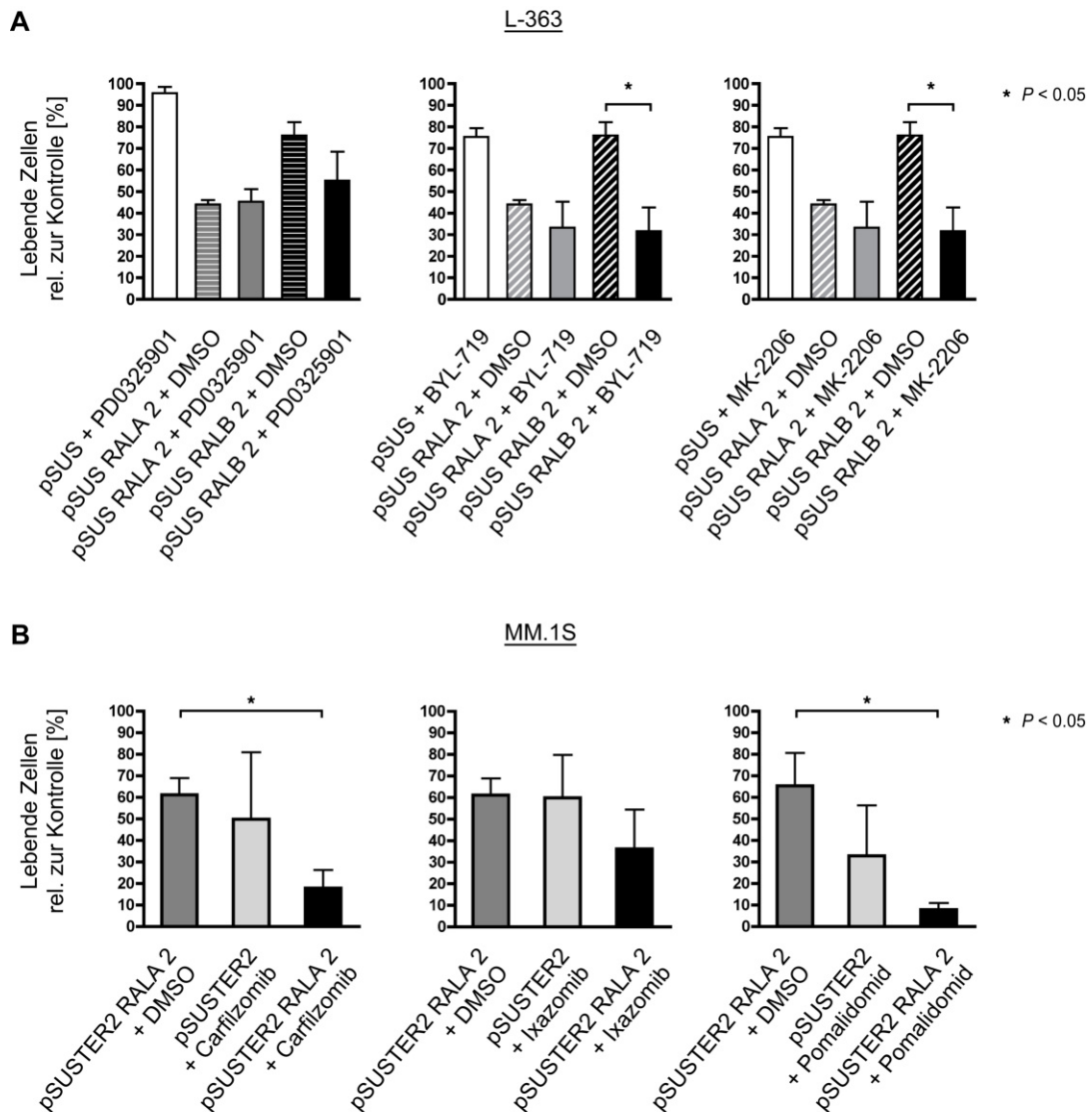
**Abbildung 18: Massenspektrometrische Analyse der RALA-Interaktionspartner.** Co-IPs mit HA-RALA wurden mit MM.1S-Zellen, die HA-RALA stabil exprimierten, durchgeführt. Kontroll-Co-IPs wurden mit MM.1S Kontrollzellen (ohne HA-RALA-Expression) durchgeführt. Dargestellte LFQ-Werte zeigen Mittelwerte, die aus zwei Replikaten berechnet wurden. Unspezifisch identifizierte Proteine weisen ein Verhältnis der Intensität von HA-RALA/Kontrolle um 0 auf (blau-markierte Proteine). Spezifische Interaktionspartner besitzen positive Quotienten der Intensität von HA-RALA/Kontrolle (grün und rot-markierte Proteine). Als potentielle Interaktionspartner wurden 48 Proteine identifiziert, hiervon 17 Proteine mit höchster Konfidenz (rot). Die Größe der Datenpunkte korreliert mit der Anzahl der identifizierten Peptide.

### 3.9 Kombination von RAL-Knockdown mit klinisch relevanten Wirksubstanzen

Aufgrund der nicht vorhanden bzw. geringen Beeinflussung der MEK/MAPK- bzw. PI3K/AKT-Signalwege durch RAL-Knockdown ist eine Kombination von RAL-Knockdown mit MEK/-MAPK- bzw. PI3K/AKT-Inhibition von Interesse hinsichtlich einer Steigerung der beobachteten Apoptose-Induktion. Dazu wurden L-363-Zellen nach Knockdown von RALA oder RALB mit dem MEK1/2-Inhibitor PD0325901 (1  $\mu$ M), dem PIK3CA-Inhibitor BYL-719

(2,5  $\mu\text{M}$ ) oder dem AKT-Inhibitor MK-2206 (1  $\mu\text{M}$ ) behandelt. Die durch RALA-Knockdown verursachte Apoptose-Induktion wurde durch Kombination mit einer der Wirksubstanzen nicht verstärkt. Dagegen wurde die durch RALB-Knockdown ausgelöste Apoptose durch Kombination mit PD0325901 leicht gesteigert. Die Kombination von RALB-Knockdown mit BYL-719 oder MK-2206 führte zu einer signifikant stärkeren Reduktion des Zellüberlebens im Vergleich zu RALB-Knockdown allein. Die Beobachteten Effekte auf das Zellüberleben waren dabei vergleichbar mit denen nach RALA-Knockdown (siehe Abb. 19A).

Schließlich wurden die Effekte der RALA-Depletion in Kombination mit potentiellen und aktuellen MM-Therapeutika auf das Überleben von MM-Zellen untersucht. MM.1S-Zellen wurden mit RALA shRNA-Expressionsvektoren oder Leervektoren transfiziert, am folgenden Tag aufgereinigt und für 3 d mit 0,5 nM Carfilzomib oder 11 nM Ixazomib oder für 6 d mit 5  $\mu\text{M}$  Pomalidomid behandelt. Die Behandlung mit dem Proteasom-Inhibitor Carfilzomib erhöhte den Zelltod unter RALA-Knockdown signifikant im Vergleich zu DMSO-behandelten RALA-Knockdown-Zellen. Die Kombination von RALA-Knockdown mit Ixazomib zeigte ebenfalls eine verstärkte Apoptose, allerdings wiesen diese Effekte keine statistische Signifikanz auf. Die Behandlung mit dem IMiD Pomalidomid erhöhte die Apoptose in RALA-depletierten MM.1S-Zellen im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen mit RALA-Knockdown signifikant (Abb. 19B). Da jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen der Behandlung mit dem jeweiligen Therapeutikum allein und der Behandlung unter RALA-Knockdown beobachtet wurden, lässt sich nicht ausschließen, dass der beobachtete Effekt auf das Zellüberleben bei einer Behandlung unter RALA-Knockdown ausschließlich auf die Wirkung des jeweiligen Therapeutikums zurück zu führen ist.



**Abbildung 19: Kombination von RALA-Knockdown mit potentiellen und aktuellen MM-Therapeutika. (A)** Nach Transfektion von L-363-Zellen mit shRNA-Expressionsvektoren gegen RALA oder RALB bzw. Leervektoren wurden transfizierte Zellen nach 24 für 2 d mit 1  $\mu$ M PD0325901, 2.5  $\mu$ M BYL-719 oder 1  $\mu$ M MK2206 behandelt. Das Zellüberleben nach RALA-Knockdown wurde durch Kombination mit PD0325901, BYL-719 oder MK-2206 nicht stärker verringert als durch RALA-Knockdown allein. Die Kombination von RALB-Knockdown mit PD0325901 führte zu einer leichten Apoptose-Induktion. Dagegen löste RALB-Knockdown in Kombination mit BYL-719 oder MK-2206 signifikant stärker Apoptose aus, im Vergleich zu RALB-Knockdown allein. **(B)** MM.1S-Zellen wurden mit Vektorkonstrukten gegen RALA oder Leervektoren transfiziert und 24 h nach Transfektion mit 0,5 nM Carfilzomib, 11 nM Ixazomib oder 5  $\mu$ M Pomalidomid behandelt. Behandlung mit Carfilzomib für 3 d oder Pomalidomid für 6 d in Kombination mit RALA-Knockdown reduzierte das Zellüberleben signifikant im Vergleich zu RALA-Knockdown allein. Ixazomib-Behandlung für 3 d in Kombination mit RALA-Depletion zeigte einen leichten additiven Effekt auf das Zellüberleben, verglichen mit RALA-Depletion allein. Das Zellüberleben wurde mittels Annexin V/PI-Färbung und Durchflusszytometrie gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus unabhängigen Triplikaten. Prozentwerte wurden relativ zu DMSO-behandelten Leervektor-Kontrollen berechnet.

## 4 Diskussion

Das multiple Myelom stellt die zweithäufigste hämatologische Neoplasie dar, bei der die Überlebenszeit der Patienten mit dem Einsatz neuer Wirkstoffe wie Proteasom-inhibitoren (Bortezomib, Carfilzomib, Ixazomib) und IMiDs (Thalidomid, Lenalidomid, Pomalidomid) erheblich verbessert werden konnte [18, 124]. Dennoch gilt die Erkrankung mit 5-Jahres-Überlebensraten von ca. 50 % [4] bis heute als unheilbar. Daher ist die Erforschung neuer Targets als therapeutische Angriffspunkte und die Entwicklung von neuen und besseren Behandlungsmöglichkeiten im MM unabdingbar. Mutationen der RAS Proto-Onkogene zählen mit einem Auftreten bei 30-50 % der Fälle zu den häufigsten Mutationen im MM [16, 46–48]. Aufgrund der häufigen onkogenen Aktivierung von RAS und der wichtigen Rolle des RAS/MAPK-Signalwegs für das Überleben von MM-Zellen ist eine RAS-Inhibition als therapeutisches Angriffsziel attraktiv. Allerdings ist das kleine G-Protein aufgrund seiner chemischen Struktur therapeutisch nicht angreifbar [50–53]. Als alternatives RAS-assoziiertes Angriffsziel geriet das RAS like proto-oncogene RAL als potentieller Vermittler des Tumorzellüberlebens in den Fokus [64, 125].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der GTPase RAL für das Überleben von MM-Zellen und der Zusammenhang mit onkogenem RAS untersucht. Zunächst wurde die Expression der beiden RAL-Isoformen in MM-Zellen analysiert. Es wurde beobachtet, dass generell eine hohe Expression von RAL in HMZL und primären MM-Zellen vorlag. Dabei waren beide Isoformen unterschiedlich stark exprimiert und RALA war bei allen untersuchten Zelllinien im aktivierten Zustand vorzufinden, wie die Ergebnisse der Pulldown-Assays zeigten. Die Expression und grundsätzlich hohe Aktivierung von RAL in HMZL geben Hinweise darauf, dass RAL in MM-Zellen wichtige Funktionen übernimmt und zur Selbsterhaltung der Zellen beiträgt. Da HMZL überwiegend aus Patienten mit fortgeschrittener Krankheit etabliert wurden und daher eher spätere, teils terminale, Krankheitsstadien repräsentieren [126], wäre zu erwarten, dass die Expression sowie die Aktivierung von RAL mit fortschreitendem Krankheitsverlauf zunimmt. Tatsächlich konnte bei der Untersuchung der RAL-Expression *in situ* gezeigt werden, dass die RAL-Expression in MM-Zellen deutlich häufiger und stärker auftrat als bei MGUS oder normalen Plasmazellen. Ebenso war in MGUS-Zellen eine höhere Expression zu beobachten als in normalen Plasmazellen. Mit fortschreitender Erkrankung scheint also bei malignen Plasmazellen insbesondere RAL an Bedeutung für die Zellen zuzunehmen.

Der Einfluss der beiden RAL-Isoformen auf das Überleben von Myelomzellen wurde in HMZL mit Knockdown-Experimenten untersucht. Bei der Analyse des Zellüberlebens nach RAL-Knockdown mit Isoform-spezifischen shRNA-Expressionsvektoren wurde beobachtet, dass das Zellüberleben bei der Mehrzahl der sieben untersuchten Zelllinien nach

RAL-Knockdown stark abnahm. Mit Ausnahme von einer Zelllinie trug die RALB-Isoform in diesen Experimenten etwas weniger zum Zellüberleben bei als RALA, was darauf hindeutet, dass in den meisten MM-Zellen vor allem RALA die Rolle des Mediators für das Zellüberleben übernimmt. Es scheinen jedoch beide RAL-Isoformen unterschiedliche Funktionen in unterschiedlichen MM-Zellen zu übernehmen. Beobachtungen von de Gorter *et al.* [73] zeigen, dass vielmehr RALB als RALA die Migration von MM-Zellen beeinflusst. So ist es denkbar, dass in der Mehrzahl der HMZL hauptsächlich RALA für das Überleben der Myelomzellen zuständig ist, während RALB überwiegend die Migration beeinflusst. Da jedoch nicht alle HMZL gleichermaßen empfindlich auf RALA-Knockdown und manche Zelllinien sogar stärker auf RALB-Knockdown reagierten, scheint diese Rollenaufteilung zwischen beiden RAL-Isoformen nicht allgemeingültig zu sein bzw. von der Zelllinie abzuhängen. Ein unterschiedlicher Einfluss beider Isoformen auf verschiedene zelluläre Prozesse ist vor allem in malignen Zelltypen nicht ungewöhnlich [88, 95–97]. Zwar weisen RALA und RALB identische Sequenzen in den Bereichen zur Effektor-Interaktion auf, allerdings kann die Bindung an Effektoren und damit auch die Beeinflussung der zellulären Funktion aufgrund von unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen beider Isoformen stark variieren [66, 69]. Somit ist es durchaus denkbar, dass beide RAL-Isoformen auch im MM unterschiedliche Funktionen übernehmen. Darüber hinaus wurde der RAL-Knockdown in L-363 und MM.1S-Zellen jeweils mit einer zweiten Zielsequenz gegen die RAL-Isoformen erzeugt. Beide Zelllinien zeigten unter RALA bzw. RALB-Knockdown mit beiden Zielsequenzen vergleichbare Effekte auf das Zellüberleben, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Induktion von Apoptose tatsächlich auf den Isoform-spezifischen RAL-Knockdown und weniger auf off-target Effekte oder toxische Nebeneffekte zurück zu führen ist.

Die Beteiligung an der Regulation des Tumorzellüberlebens macht RAL zu einem möglichen therapeutischen Target. Jedoch sind RAS und verwandte kleine GTPasen aufgrund ihrer kompakten Proteinstruktur und der hohen Affinität zu GDP/GTP schwierig zu inhibieren [64, 127]. Dennoch identifizierte die Gruppe um Theodorescu [100] die chemische Verbindung RBC8 als spezifischen RAL-Inhibitor und zeigte, dass RBC8 die Aktivierung von RALA und RALB in lebenden Zellen reduziert. Die Bindung von RBC8 an ein allosterisches Zentrum von RAL-GDP verhindert den Nukleotidaustausch und hält das Protein im inaktiven Zustand. Diese Inhibition ist nicht Isoform-spezifisch, sodass RALA und RALB gleichermaßen blockiert werden. Die Wirksamkeit des Inhibitors scheint jedoch vom jeweiligen Zelltypen abzuhängen [100, 107, 112, 128]. Auch bei der Behandlung von HMZL mit RBC8 wurden Zelllinien-abhängige Effekte auf das Zellüberleben beobachtet. Diese entsprachen den Beobachtungen, dass bei derselben Konzentration RBC8-sensitive und -insensitive Zelllinien eine unterschiedliche RAL-Aktivierung zeigten. Zudem zeigt der Inhibitor in HMZL diese Wirkungen erst mit höheren Konzentrationen, was die klinische

Anwendbarkeit des Wirkstoffs im MM erschweren könnte. Möglicherweise treten ab höheren Konzentrationen neben der RAL-Inhibition unspezifische Effekte auf das Zellüberleben auf, wie Daten aus Thrombozyten zeigten [129].

Um zu untersuchen, ob die Überlebenseffekte, die durch RAL vermittelt werden, im Zusammenhang mit den klassischen Proliferations und Apoptose-Signalwegen RAS/MAPK und PI3K/AKT stehen, wurde der Einfluss beider RAL-Isoformen auf die Aktivierung beider Signalwege in Knockdown-Experimenten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die ERK1/2-Phosphorylierung auch längere Zeit nach RAL-Knockdown unverändert blieb. Die beobachteten Effekte von RAL auf das Zellüberleben werden in diesen HMZL folglich unabhängig des RAS/MAPK-Signalwegs vermittelt. Ebenso hat ein länger anhaltender RALB-Knockdown keinen Einfluss auf den PI3K/AKT-Überlebenssignalweg. Im Gegensatz dazu wurde die AKT-Phosphorylierung zwar kürzere Zeit nach RALA-Knockdown nicht beeinflusst, jedoch wurde nach längerem RALA-Knockdown eine Reduktion der AKT-Phosphorylierung beobachtet. Während also RALA über konstitutiv aktiviertes AKT-Signaling auf das Überleben der MM-Zellen wirkt, beeinflusst RALB das Überleben von MM-Zellen unabhängig der bekannten Überlebenssignalwege RAS/MAPK und PI3K/AKT.

Bei der Untersuchung der Abhängigkeit zwischen RAL-Aktivierung und onkogenem RAS wurde nach Depletion von onkogenem RAS keine Änderung im Aktivierungszustand von RAL beobachtet. Da die Gesamtproteinspiegel von RAL ebenfalls unbeeinflusst vom RAS-Knockdown waren, ist davon auszugehen, dass onkogenes RAS weder die Expression noch den Aktivierungszustand von RAL im MM direkt beeinflusst. Zusätzlich kann davon ausgegangen werden, dass Wildtyp-RAS ebenfalls keinen bzw. nur einen minimalen direkten Effekt auf die RAL-Aktivierung und -Expression ausübt, da die verwendeten shRNA-Zielsequenzen nicht nur zu einem Knockdown von onkogenem RAS, sondern auch von Wildtyp-RAS führen [46]. Im Gegensatz zu RAS wurden bei RAL bisher keine aktivierenden Hotspot-Mutationen beschrieben, die zu einer erhöhten Proteinaktivität führen [45, 60, 84, 87, 130–132]. So liegen die Gründe für eine RAL-Aktivierung in MM-Zellen zum einen möglicherweise eher in einer Aktivierung durch Chemokine aus dem Knochenmark-Mikromilieu, wie sie bereits von de Gorter *et al.* [73] bei MM-Zellen beschreiben wurde. Auch bei diesen Untersuchungen konnte keine Abhängigkeit der RAL-Aktivierung durch Chemokine von RAS festgestellt werden, was den Beobachtungen einer unabhängigen RAL-Aktivierung in der vorliegenden Arbeit entspricht. Zum anderen ist eine erhöhte RAL-Aktivierung auch aufgrund einer höheren Aktivität von RALGEFs und/oder einer verringerten Aktivität von RALGAPs denkbar. So wurden im MM bereits einzelne Mutationen in Genen der RALGEF und RALGAP nachgewiesen [60]. Darunter finden sich Missense-Mutationen in den RALGEFs RALGPS1 und RGL1, die dazu führen könnten, dass RALGEFs unabhängig von upstream gelegenen Faktoren – wie z.B. RAS – die Aktivierung der downstream geschalteten RAL-Proteine beschleunigen. Zusätzlich



wurden Missense-Mutationen, Translokationen und Deletionen in Genen der RALGAPs RALGAPA1, RALGAPA2 und RALGAPB in einzelnen MM-Patienten nachgewiesen [60]. Somit wäre auch eine verringerte Deaktivierung von RAL durch RALGAPs denkbar. Es besteht jedoch Unklarheit darüber, ob diese genetischen Aberrationen rekurrent in einer Subgruppe von MM-Patienten vorkommen und welchen Einfluss sie für die jeweiligen Proteine und die RAL-Aktivierung haben. Dies bietet Raum für weitere Untersuchungen zur Aufklärung einer fehlgeleiteten Aktivierung von RAL-Signaling.

Um die Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen RAS und RAL in der Beeinflussung der Genexpression zu untersuchen, wurden RNA-Sequenzierungen und Genexpressionsanalysen durchgeführt. Anhand der Anzahl differenziell exprimierter Gene nach KRAS- bzw. RALA-Knockdown ist zu erkennen, dass KRAS weitaus mehr Einfluss auf die Genexpression nimmt als RALA. Nur wenige der differenziell exprimierten Gene werden gemeinsam von beiden GTPasen beeinflusst, was darauf hindeutet, dass zur Aufrechterhaltung der Zellproliferation und Inhibition der Apoptose letztendlich unterschiedliche Gene von RAS und RAL beeinflusst werden. Die detailliertere Klassifizierung mittels einer GSEA und Anreicherung in GO Terms verdeutlicht den unterschiedlichen Einfluss von RAS und RAL auf die Genexpression. So werden durch KRAS unter anderem Proliferations-assoziierte Gene beeinflusst, während RALA auch Apoptose-assoziierte Gene steuert. Diese Ergebnisse zeigen, dass beide Signalwege über RAS und RAL im MM unterschiedliche Aufgaben übernehmen können und decken sich mit Beobachtungen aus Kolon-Tumorzellen [72], in denen RAL-Knockdown einen sehr geringen Einfluss auf die Expression von MAPK-Zielgenen ausübt. Ebenso konnte in dieser Arbeit keine Beeinflussung von RAL auf RAS/MAPK-Signaling bei der Kontrolle des Zellüberlebens beobachtet werden. Zusammenfassend kann man davon ausgehen, dass RAL die anti-apoptischen Effekte im MM über einen RAS-unabhängigen Signalweg vermittelt, der in Verbindung mit AKT die Apoptose von MM-Zellen beeinflusst.

Die Beschreibungen von RAL-Effektoren, die genutzt werden, um das Überleben von MM-Zellen aufrecht zu erhalten, variieren stark in Abhängigkeit vom untersuchten Zellsystem [68, 69, 87]. Zur Untersuchung möglicher RAL-Effektoren im MM wurden in dieser Arbeit RAL-Interaktionspartner in massenspektrometrischen Analysen identifiziert. In diesen Analysen wurden unter anderem Proteine des Exozyst-Komplexes identifiziert, von denen EXO84 (EXOC8) und SEC5 (EXOC2) bereits als RAL-Effektoren beschrieben wurden [133, 134]. Ein weiterer bekannter RAL-Effektor RALBP1 wurde in diesen Experimenten nicht als Interaktionspartner von RAL identifiziert, was einen Hinweis darauf gibt, dass das Zusammenspiel von RAL und RALBP1 in MM-Zellen eine weniger große Rolle spielt. Dementsprechend zeigen Forschungen von Issaq *et al.* [135] keine Beteiligung von RALBP1 – jedoch von EXO84 und SEC5 – bei der Transformation und des Tumorstwachstums von humanen Zellen. Der Exozyst-Komplex ist vor allem am zielgerichteten

Vesikeltransport beteiligt, daher werden Interaktionen von RAL mit EXO84 und SEC5 mit Prozessen wie Zytokinese, Tight Junction-Bildung und Tumorzellinvasion assoziiert [68]. EXO84 und SEC5 besitzen teilweise überlappende RALA-Bindestellen, sodass beide Proteine um die Bindung mit RAL konkurrieren [136, 137]. Dies könnte erklären, warum beide Proteine in der Massenspektrometrie-Analyse nicht mit einem höheren Verhältnis detektiert wurden. Für beide Exozyst-Proteine wurde eine Beeinflussung unterschiedlicher Aspekte der Zell-Migration in Zusammenhang mit RALA beschrieben [138]. In dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass RALA in der Mehrzahl der HMZL das Überleben der MM-Zellen stärker fördert. Es ist denkbar, dass vorwiegend RALA die Überlebenswirkungen in diesen MM-Zellen über EXO84 und/oder SEC5 vermittelt und beide Effektoren dabei unterschiedliche Rollen bei der Zellüberlebenskontrolle einnehmen. Diese Beobachtungen entsprechen den Beobachtungen in Epithelzellen, dass hauptsächlich RALA in Verbindung mit dem Exozyst-Komplex am Vesikel-Transport von Membranproteinen involviert ist. Die Autoren führen das auf eine höhere Affinität von RALA zu EXO84 und SEC5 im Vergleich zu RALB zurück [139]. In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass die AKT-Phosphorylierung bei der Regulation des Zellüberlebens hauptsächlich durch RALA beeinflusst wird, nicht jedoch durch RALB. Zusammengenommen lässt dies vermuten, dass möglicherweise vor allem RALA die Überlebenswirkungen im Zusammenspiel mit AKT über EXO84/SEC5 vermittelt und RALB die Effekte auf das Zellüberleben eher über andere Mechanismen übermittelt.

Eine Steigerung der beobachteten Effekte auf das Überleben von MM-Zellen nach RAL-Knockdown wäre vor allem für eine potentielle Kombinationstherapie von Interesse. Da die beobachteten Apoptose-Effekte nach RAL-Knockdown unabhängig des MEK/MAPK-Signalwegs und nur im Fall von RALB zusammen mit dem PI3K/AKT-Signalweg vermittelt werden, wurde eine Kombination von RAL-Knockdown mit einem MEK, PIK3CA oder AKT-Inhibitor in MM-Zellen untersucht. Während die durch RALA-Knockdown ausgelöste Apoptose durch eine Kombination nicht gesteigert werden konnte, wurde die nach RALB-Knockdown induzierte Apoptose durch eine Kombinations-Behandlung mit einem PIK3CA oder AKT-Inhibitor weiter verstärkt. Dementsprechend konnte in dieser Arbeit eine Verringerung der AKT-Aktivierung nach RALA-Knockdown beobachtet werden, wohingegen keine Beeinflussung des PI3K/AKT-Signalings nach RALB-Knockdown beobachtet wurde. So können die Apoptose-Effekte nicht nach RALA-Knockdown, aber nach RALB-Knockdown durch zusätzliche PI3K/AKT-Inhibition verstärkt werden. Auch diese Experimente verdeutlichen die unterschiedlichen Rollen von RALA und RALB beim Signaling zur Regulation des Zellüberlebens und den Einfluss von RALA auf konstitutiv aktiviertes AKT. Die additiven Effekte auf das Zellüberleben durch Kombination von RAL-Blockade mit PI3K/AKT-Inhibitoren könnten eine potentielle Therapieoption für einen Teil der MM-Patienten darstellen. Zur Untersuchung der möglichen klinischen Translation einer RAL-Inhibition wurden ak-

tuell klinisch relevante Therapeutika (Proteasominhibitoren und IMiDs) in Kombination mit RAL-Knockdown in MM-Zellen untersucht. In Abhängigkeit von der verwendeten Substanz wurden die Apoptose-Effekte des RAL-Knockdown durch Kombination mit dem Therapeutikum verstärkt. Da jedoch die Einzelbehandlung mit einem der Therapeutika aufgrund der großen Spannweite der Apoptose-Induktion keine Signifikanz gegenüber der Kombinations-Behandlung aufwies, ließ sich der beobachtete additive Effekt nicht ausschließlich auf die Kombination zurückführen. Die durch RAL-Knockdown ausgelöste Apoptose wurde durch die zusätzliche Behandlung mit Carfilzomib signifikant erhöht, jedoch nicht durch eine zusätzliche Ixazomib-Behandlung. Da beide Wirkstoffe zur selben Wirkstoffklasse zählen und den gleichen Wirkmechanismus teilen, ist dieser unterschiedliche Einfluss auf das Zellüberleben in den Kombinationsexperimenten zunächst überraschend. Jedoch bewirkt Carfilzomib im Gegensatz zu Ixazomib eine irreversible Inhibition der  $\beta 5$ -Untereinheit des Proteasoms [140]. Möglicherweise könnte diese permanente Inhibition ausschlaggebend für einen größeren additiven Effekt bei der Reduktion der Zellviabilität durch Kombination von RAL-Knockdown mit Proteasom-Inhibition sein. Die Behandlung von MM-Zellen mit einem IMiD (Pomalidomid) in Kombination mit RAL-Knockdown verursachte ebenfalls eine signifikant stärkere Apoptose-Induktion im Vergleich zur Medikament-Einzelbehandlung. Insgesamt deuten diese Ergebnisse auf den potentiellen therapeutischen Nutzen einer RAL-Inhibition in Kombination mit aktuellen Wirksubstanzen im MM hin. Jedoch scheint der zusätzliche Effekt durch die Kombinationsbehandlung innerhalb einer Medikamentenklasse abhängig vom verwendeten Medikament zu sein. Möglicherweise ergibt eine Kombination einer Wirkstoffklasse mit RAL-Inhibition im MM nicht bei jedem Vertreter dieser Wirkstoffklasse eine höhere Wirksamkeit, was wiederum relevant für die Wahl des eingesetzten Therapeutikums sein könnte.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die GTPase RAL im MM eine bedeutende Rolle für das Überleben der Tumorzellen spielt. Im Vergleich zu nicht-malignen Plasmazellen wurde eine erhöhte RAL-Expression in primären Plasmazellen nachgewiesen und in Knockdown-Analysen eine starke Abhängigkeit des Überlebens der MM-Zellen von RAL gezeigt. Somit ist RAL sowohl an der Entstehung als auch der Aufrechterhaltung von onkogenem Signaling für das Zellüberleben im MM beteiligt. Diese Prozesse werden dabei unabhängig von onkogenem RAS gesteuert. Im MM werden durch RAL hauptsächlich anti-apoptotische Transkriptionsprozesse aufrechterhalten, die unabhängig von RAS aktiviert und übermittelt werden. Beide verwandte GTPasen sind somit Bestandteile unabhängiger Signalwege, die zum Überleben von MM-Zellen beitragen. Die Inhibition des RAL-Signalwegs könnte daher eine neue Therapieoption für das MM darstellen. Obwohl die pharmakologische RAL-Inhibition aufgrund der Proteinstruktur der kleinen GTPase eine Herausforderung darstellt, konnte bereits ein Inhibitor identifiziert werden.

Da die Wirksamkeit dieses Inhibitors jedoch abhängig vom Zelltyp und in MM-Zellen relativ gering ist, ist die Entwicklung potenterer RAL-Inhibitoren notwendig. Darüber hinaus ist die Aufklärung der Ursachen einer Aktivierung von RAL im MM von Interesse. Hierfür kommen beispielsweise überaktives RTK-Signaling oder eine onkogene Aktivierung bzw. Inaktivierung der Faktoren, die die RAL-Aktivierung kontrollieren, in Frage. Weiterhin wäre die weitere Charakterisierung des RAL-Downstream-Signalings im Bezug auf das Zellüberleben von Interesse. In der vorliegenden Arbeit wurden Proteine des Exozyst-Komplexes als direkte Interaktionspartner von RAL im MM identifiziert. Die Charakterisierung dieser Downstream-Effektoren als mögliche therapeutische Targets bietet Raum für weitere Untersuchungen.

## 5 Literatur

1. Palumbo, A. & Anderson, K. Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine* **364**, 1046–1060 (2011).
2. Kuehl, W. M. & Bergsagel, P. L. Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor. *Journal of Clinical Investigation* **122**, 3456–3463 (2012).
3. Röllig, C., Knop, S. & Bornhäuser, M. Multiple myeloma. *The Lancet* **385**, 2197–2208 (2015).
4. National Cancer Institute. *Surveillance epidemiology and end results program. SEER Cancer Stat Facts: Myeloma*. 2018.
5. Kyle, R. A. & Rajkumar, S. V. Management of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM). *Oncology (Williston Park, N.Y.)* **25**, 578–86 (2011).
6. Kuehl, W. M. & Bergsagel, P. L. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nature Reviews Cancer* **2**, 175–187 (2002).
7. Landgren, O., Gridley, G., Turesson, I. *et al.* Risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and subsequent multiple myeloma among African American and white veterans in the United States. *Blood* **107**, 904–906 (2006).
8. Kyle, R. A., Gertz, M. A., Witzig, T. E. *et al.* Review of 1027 Patients With Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *Mayo Clinic Proceedings* **78**, 21–33 (2003).
9. Nucci, M. & Anaissie, E. Infections in Patients with Multiple Myeloma in the Era of High-Dose Therapy and Novel Agents. *Clinical Infectious Diseases* **49**, 1211–1225 (2009).
10. Oyajobi, B. O. Multiple myeloma/hypercalcemia. *Arthritis Research and Therapy* **9**, S4 (2007).
11. Chawla, S. S., Kumar, S. K., Dispenzieri, A. *et al.* Clinical course and prognosis of non-secretory multiple myeloma. *European Journal of Haematology* **95**, 57–64 (2015).
12. Heher, E. C., Rennke, H. G., Laubach, J. P. & Richardson, P. G. Kidney Disease and Multiple Myeloma. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **8**, 2007–2017 (2013).
13. International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *British Journal of Haematology* **121**, 749–757 (2003).
14. Rajkumar, S. V., Dimopoulos, M. A., Palumbo, A. *et al.* International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *The Lancet Oncology* **15**, e538–e548 (2014).
15. Smith, D. & Yong, K. Multiple myeloma. *BMJ* **346**, 1–11 (2013).
16. Xu, J., Pfarr, N., Endris, V. *et al.* Molecular signaling in multiple myeloma: association of RAS/RAF mutations and MEK/ERK pathway activation. *Oncogenesis* **6**, e337 (2017).

17. Russell, S. J. & Rajkumar, S. V. Multiple myeloma and the road to personalised medicine. *The Lancet Oncology* **12**, 617–619 (2011).
18. Rajkumar, S. V. & Kumar, S. Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings* **91**, 101–119 (2016).
19. Fairfield, H., Falank, C., Avery, L. & Reagan, M. R. Multiple myeloma in the marrow: pathogenesis and treatments. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1364**, 32–51 (2016).
20. Gardner, R. C., Assinder, S. J., Christie, G. *et al.* Characterization of peptidyl boronic acid inhibitors of mammalian 20 S and 26 S proteasomes and their inhibition of proteasomes in cultured cells. *Biochemical Journal* **346**, 447–454 (2000).
21. Ciechanover, A. The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway. *Cell* **79**, 13–21 (1994).
22. Tsai, B., Ye, Y. & Rapoport, T. A. Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **3**, 246–255 (2002).
23. Xu, C., Bailly-Maitre, B. & Reed, J. C. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *Journal of Clinical Investigation* **115**, 2656–2664 (2005).
24. Rajkumar, S. V., Richardson, P. G., Hideshima, T. & Anderson, K. C. Proteasome Inhibition As a Novel Therapeutic Target in Human Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **23**, 630–639 (2005).
25. Obeng, E. A., Carlson, L. M., Gutman, D. M., Harrington Jr., W. J., Lee, K. P. & Boise, L. H. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood* **107**, 4907–4916 (2006).
26. Ito, T., Ando, H., Suzuki, T. *et al.* Identification of a Primary Target of Thalidomide Teratogenicity. *Science* **327**, 1345–1350 (2010).
27. Lopez-Girona, A., Mendy, D., Ito, T. *et al.* Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide. *Leukemia* **26**, 2326–2335 (2012).
28. Krönke, J., Udeshi, N. D., Narla, A. *et al.* Lenalidomide Causes Selective Degradation of IKZF1 and IKZF3 in Multiple Myeloma Cells. *Science* **343**, 301–305 (2014).
29. Lu, G., Middleton, R. E., Sun, H. *et al.* The Myeloma Drug Lenalidomide Promotes the Cereblon-Dependent Destruction of Ikaros Proteins. *Science* **343**, 305–309 (2014).
30. Mitsiades, N., Mitsiades, C. S., Poulaki, V. *et al.* Apoptotic signaling induced by immunomodulatory thalidomide analogs in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Blood* **99**, 4525–4530 (2002).
31. Raje, N., Terpos, E., Willenbacher, W. *et al.* Denosumab versus zoledronic acid in bone disease treatment of newly diagnosed multiple myeloma: an international, double-blind, double-dummy, randomised, controlled, phase 3 study. *The Lancet Oncology* **19**, 370–381 (2018).

32. Wagner, S. D. & Neuberger, M. S. Somatic Hypermutation of Immunoglobulin Genes. *Annual Review of Immunology* **14**, 441–457 (1996).
33. LeBien, T. W. & Tedder, T. F. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* **112**, 1570–1580 (2008).
34. Naradikian, M. S., Scholz, J. L., Oropallo, M. A. & Cancro, M. P. in *Drugs Targeting B-Cells in Autoimmune Diseases. Milestones in Drug Therapy*. Springer, Basel (Hrsg. Bosch, X., Ramos-Casals, M. & Khamashta, M. A.) 11–35 (2014).
35. Shlomchik, M. J. & Weisel, F. Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunological Reviews* **247**, 52–63 (2012).
36. Victora, G. D. & Nussenzweig, M. C. Germinal Centers. *Annual Review of Immunology* **30**, 429–457 (2012).
37. Hallek, M., Bergsagel, P. L. & Anderson, K. C. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* **91**, 3–21 (Jan. 1998).
38. Avet-Loiseau, H., Facon, T., Daviet, A. *et al.* 14q32 Translocations and Monosomy 13 Observed in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance Delineate a Multistep Process for the Oncogenesis of Multiple Myeloma. *Cancer Research* **59**, 4546–4550 (1999).
39. Bergsagel, P. L. & Kuehl, W. M. Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene* **20**, 5611–5622 (2001).
40. Morgan, G. J., Walker, B. A. & Davies, F. E. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nature Reviews Cancer* **12**, 335–348 (2012).
41. Prideaux, S. M., Conway O'Brien, E. & Chevassut, T. J. The Genetic Architecture of Multiple Myeloma. *Advances in Hematology* **2014**, 16 Pages (2014).
42. Smadja, N. V., Bastard, C., Brigaudeau, C., Leroux, D. & Fruchart, C. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* **98**, 2229–2238 (2001).
43. Raab, M. S., Podar, K., Breitkreutz, I., Richardson, P. G. & Anderson, K. C. Multiple myeloma. *The Lancet* **374**, 324–339 (2009).
44. Roccaro, A. M., Sacco, A., Thompson, B. *et al.* MicroRNAs 15a and 16 regulate tumor proliferation in multiple myeloma. *Blood* **113**, 6669–6680 (2009).
45. Leich, E., Weißbach, S., Klein, H.-U. *et al.* Multiple myeloma is affected by multiple and heterogeneous somatic mutations in adhesion- and receptor tyrosine kinase signaling molecules. *Blood Cancer Journal* **3**, e102–e102 (2013).
46. 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* **117**, 1998–2004 (2011).
47. Lionetti, M., Barbieri, M., Todoerti, K. *et al.* Molecular spectrum of BRAF, NRAS and KRAS gene mutations in plasma cell dyscrasias: implication for MEK-ERK pathway activation. *Oncotarget* **6**, 24205–24217 (2015).
48. Walker, B. A., Boyle, E. M., Wardell, C. P. *et al.* Mutational Spectrum, Copy Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma. *Journal of Clinical Oncology* **33**, 3911–3920 (2015).

49. Müller, E., Bauer, S., Stühmer, T. *et al.* Pan-Raf co-operates with PI3K-dependent signalling and critically contributes to myeloma cell survival independently of mutated RAS. *Leukemia* **31**, 922–933 (2017).
50. Baines, A. T., Xu, D. & Der, C. J. Inhibition of Ras for cancer treatment: the search continues. *Future Medicinal Chemistry* **3**, 1787–1808 (2011).
51. Cox, A. D., Fesik, S. W., Kimmelman, A. C., Luo, J. & Der, C. J. Drugging the undruggable RAS: Mission Possible? *Nature Reviews Drug Discovery* **13**, 828–851 (2014).
52. McCormick, F. K-Ras protein as a drug target. *Journal of Molecular Medicine* **94**, 253–258 (2016).
53. Wilson, C. Y. & Tolia, P. Recent advances in cancer drug discovery targeting RAS. *Drug Discovery Today* **21**, 1915–1919 (2016).
54. Chatterjee, M., Stühmer, T., Herrmann, P., Bommert, K., Dörken, B. & Bargou, R. C. Combined disruption of both the MEK/ERK and the IL-6R/STAT3 pathways is required to induce apoptosis of multiple myeloma cells in the presence of bone marrow stromal cells. *Blood* **104**, 3712–3721 (2004).
55. Vivanco, I. & Sawyers, C. L. The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer* **2**, 489–501 (2002).
56. Zöllinger, A., Stühmer, T., Chatterjee, M. *et al.* Combined functional and molecular analysis of tumor cell signaling defines 2 distinct myeloma subgroups: Akt-dependent and Akt-independent multiple myeloma. *Blood* **112**, 3403–3412 (2008).
57. Papa, A. & Pandolfi, P. P. The PTEN-PI3K Axis in Cancer. *Biomolecules* **9**, 1–11 (2019).
58. Ismail, S. I., Mahmoud, I. S., Msallam, M. M. & Sughayer, M. A. Hotspot mutations of PIK3CA and AKT1 genes are absent in multiple myeloma. *Leukemia Research* **34**, 824–826 (2010).
59. Chang, H., Qi, X. Y., Claudio, J., Zhuang, L., Patterson, B. & Stewart, A. K. Analysis of PTEN deletions and mutations in multiple myeloma. *Leukemia Research* **30**, 262–265 (2006).
60. Chapman, M. A., Lawrence, M. S., Keats, J. J. *et al.* Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature* **471**, 467–472 (2011).
61. Thomas, J. C., Cooper, J. M., Clayton, N. S. *et al.* Inhibition of Ral GTPases Using a Stapled Peptide Approach. *Journal of Biological Chemistry* **291**, 18310–18325 (2016).
62. Stephen, A. G., Esposito, D., Bagni, R. K. & McCormick, F. Dragging Ras Back in the Ring. *Cancer Cell* **25**, 272–281 (2014).
63. Rodriguez-Viciano, P. & McCormick, F. RalGDS comes of age. *Cancer Cell* **7**, 205–206 (2005).
64. Yan, C. & Theodorescu, D. RAL GTPases: Biology and Potential as Therapeutic Targets in Cancer. *Pharmacological Reviews* **70**, 1–11 (2018).
65. Chardin, P. & Tavitian, A. The ral gene: a new ras related gene isolated by the use of a synthetic probe. *The EMBO journal* **5**, 2203–2208 (1986).



66. Gentry, L. R., Martin, T. D., Reiner, D. J. & Der, C. J. Ral small GTPase signaling and oncogenesis: More than just 15 minutes of fame. *Biochimica et Biophysica Acta* **1843**, 2976–2988 (2014).
67. Ferro, E. & Trabalzini, L. RalGDS family members couple Ras to Ral signalling and that's not all. *Cellular Signalling* **22**, 1804–1810 (2010).
68. Kashatus, D. F. Ral GTPases in tumorigenesis: Emerging from the shadows. *Experimental Cell Research* **319**, 2337–2342 (2013).
69. Neel, N. F., Martin, T. D., Stratford, J. K., Zand, T. P., Reiner, D. J. & Der, C. J. The RalGEF-Ral Effector Signaling Network: The Road Less Traveled for Anti-Ras Drug Discovery. *Genes & Cancer* **2**, 275–287 (2011).
70. Wolthuis, R. M., Zwartkuis, F., Moen, T. C. & Bos, J. L. Ras-dependent activation of the small GTPase Ral. *Current Biology* **8**, 471–474 (Apr. 1998).
71. Lim, K.-H., Baines, A. T., Fiordalisi, J. J. *et al.* Activation of RalA is critical for Ras-induced tumorigenesis of human cells. *Cancer Cell* **7**, 533–545 (2005).
72. Györffy, B., Stelnic-Klotz, I., Sigler, C. *et al.* Effects of RAL signal transduction in KRAS- and BRAF-mutated cells and prognostic potential of the RAL signature in colorectal cancer. *Oncotarget* **6**, 13334–13346 (2015).
73. De Gorter, D. J. J., Reijmers, R. M., Beuling, E. A. *et al.* The small GTPase Ral mediates SDF-1 - induced migration of B cells and multiple myeloma cells. *Blood* **111**, 3364–3372 (2008).
74. Bommert, K., Bargou, R. C. & Stühmer, T. Signalling and survival pathways in multiple myeloma. *European Journal of Cancer* **42**, 1574–1580 (Juli 2006).
75. Bazzi, M. & Badros, A. Multiple myeloma: Implementing signaling pathways and molecular biology in clinical trials. *Cancer Biology & Therapy* **10**, 830–838 (Nov. 2010).
76. Chardin, P. & Tavitian, A. Coding sequences of human ralA and ralB cDNAs. *Nucleic Acids Research* **17**, 4380 (1989).
77. Matsubara, K., Kishida, S., Matsuura, Y., Kitayama, H., Noda, M. & Kikuchi, A. Plasma membrane recruitment of RalGDS is critical for Ras-dependent Ral activation. *Oncogene* **18**, 1303–1312 (Feb. 1999).
78. Wolthuis, R. M. F., Franke, B., van Triest, M. *et al.* Activation of the Small GTPase Ral in Platelets. *Molecular and Cellular Biology* **18**, 2486–2491 (1998).
79. Wang, K. L. & Roufogalis, B. D. Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin Stimulates GTP Binding to the Ras-related Protein Ral-A. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 14525–14528 (1999).
80. Bhattacharya, M., Anborgh, P. H., Babwah, A. V. *et al.*  $\beta$ -Arrestins regulate a RalGDS-Ral effector pathway that mediates cytoskeletal reorganization. *Nature Cell Biology* **4**, 547–555 (2002).
81. Mittar, D., Sehajpal, P. K. & Lander, H. M. Nitric oxide activates Rap1 and Ral in a Ras-independent manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **322**, 203–209 (2004).

82. Martin, T. D. & Der, C. J. Differential involvement of RalA and RalB in colorectal cancer. *Small GTPases* **3**, 126–130 (2012).
83. Feig, L. A. Ral-GTPases: approaching their 15 minutes of fame. *Trends in Cell Biology* **13**, 419–425 (2003).
84. Shirakawa, R. & Horiuchi, H. Ral GTPases: crucial mediators of exocytosis and tumourigenesis. *Journal of Biochemistry* **157**, 285–299 (2015).
85. Neyraud, V., Aushev, V. N., Hatzoglou, A., Meunier, B., Cascone, I. & Camonis, J. RalA and RalB Proteins Are Ubiquitinated GTPases, and Ubiquitinated RalA Increases Lipid Raft Exposure at the Plasma Membrane. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 29397–29405 (2012).
86. Simicek, M., Lievens, S., Laga, M. *et al.* The deubiquitylase USP33 discriminates between RALB functions in autophagy and innate immune response. *Nature Cell Biology* **15**, 1220–1230 (2013).
87. Bodemann, B. O. & White, M. A. Ral GTPases and cancer: linchpin support of the tumorigenic platform. *Nature Reviews Cancer* **8**, 133–140 (2008).
88. Lim, K.-H., O'Hayer, K., Adam, S. J. *et al.* Divergent Roles for RalA and RalB in Malignant Growth of Human Pancreatic Carcinoma Cells. *Current Biology* **16**, 2385–2394 (2006).
89. Martin, T. D., Samuel, J. C., Routh, E. D., Der, C. J. & Yeh, J. J. Activation and Involvement of Ral GTPases in Colorectal Cancer. *Cancer Research* **71**, 206–215 (2011).
90. Zipfel, P. A., Brady, D. C., Kashatus, D. F., Ancrile, B. D., Tyler, D. S. & Counter, C. M. Ral activation promotes melanomagenesis. *Oncogene* **29**, 4859–4864 (2010).
91. Male, H., Patel, V., Jacob, M. A. *et al.* Inhibition of RalA signaling pathway in treatment of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **77**, 252–259 (2012).
92. Guin, S., Ru, Y., Wynes, M. W. & Mishra, R. Contributions of KRAS and RAL in Non-Small-Cell Lung Cancer Growth and Progression. *Journal of Thoracic Oncology* **8**, 1492–1501 (2013).
93. Smith, S. C., Oxford, G., Baras, A. S. *et al.* Expression of Ral GTPases, Their Effectors, and Activators in Human Bladder Cancer. *Clinical Cancer Research* **13**, 3803–3813 (2007).
94. Saito, R., Shirakawa, R., Nishiyama, H. *et al.* Downregulation of Ral GTPase-activating protein promotes tumor invasion and metastasis of bladder cancer. *Oncogene* **32**, 894–902 (2013).
95. Oxford, G., Owens, C. R., Titus, B. J. *et al.* RalA and RalB: Antagonistic Relatives in Cancer Cell Migration. *Cancer Research* **65**, 7111–7120 (2005).
96. Chien, Y. & White, M. A. RAL GTPases are linchpin modulators of human tumour-cell proliferation and survival. *EMBO reports* **4**, 800–806 (2003).
97. Tchekvina, E., Agapova, L., Dyakova, N., Martinjuk, A., Komelkov, A. & Tatosyan, A. The small G-protein RalA stimulates metastasis of transformed cells. *Oncogene* **24**, 329–335 (2005).

98. Yin, J., Pollock, C., Tracy, K. *et al.* Activation of the RalGEF/Ral Pathway Promotes Prostate Cancer Metastasis to Bone. *Molecular and Cellular Biology* **27**, 7538–7550 (2007).
99. Mishra, P. J., Ha, L., Rieker, J. *et al.* Dissection of RAS downstream pathways in melanomagenesis: a role for Ral in transformation. *Oncogene* **29**, 2449–2456 (2010).
100. Yan, C., Liu, D., Li, L. *et al.* Discovery and characterization of small molecules that target the GTPase Ral. *Nature* **515**, 443–447 (2014).
101. Yu, Y. & Feig, L. A. Involvement of R-Ras and Ral GTPases in estrogen-independent proliferation of breast cancer cells. *Oncogene* **21**, 7557–7568 (2002).
102. Li, T. T., Alemayehu, M., Aziziyeh, A. I. *et al.*  $\beta$ -Arrestin/Ral Signaling Regulates Lysophosphatidic Acid-Mediated Migration and Invasion of Human Breast Tumor Cells. *Molecular Cancer Research* **7**, 1064–1077 (2009).
103. Bodempudi, V., Yamoutpoor, F., Pan, W. *et al.* Ral Overactivation in Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors. *Molecular and Cellular Biology* **29**, 3964–3974 (2009).
104. Sowalsky, A. G., Alt-Holland, A., Shamis, Y., Garlick, J. A. & Feig, L. A. RalA suppresses early stages of Ras-induced squamous cell carcinoma progression. *Oncogene* **29**, 45–55 (2010).
105. Sowalsky, A. G., Alt-Holland, A., Shamis, Y., Garlick, J. A. & Feig, L. A. RalA Function in Dermal Fibroblasts Is Required for the Progression of Squamous Cell Carcinoma of the Skin. *Cancer Research* **71**, 758–767 (2011).
106. Ezzeldin, M., Borrego-Diaz, E., Taha, M. *et al.* RalA signaling pathway as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma (HCC). *Molecular Oncology* **8**, 1043–1053 (2014).
107. Kodama, T., Bard-Chapeau, E. A., Newberg, J. Y. *et al.* Two-Step Forward Genetic Screen in Mice Identifies Ral GTPase-Activating Proteins as Suppressors of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* **151**, 324–337.e12 (2016).
108. Omidvar, N., Pearn, L., Burnett, A. K., Darley, L. & Darley, R. L. Ral Is both Necessary and Sufficient for the Inhibition of Myeloid Differentiation Mediated by Ras. *Molecular and Cellular Biology* **26**, 3966–3975 (2006).
109. Eckfeldt, C. E., Pomeroy, E. J., Lee, R. D. W. *et al.* RALB provides critical survival signals downstream of Ras in acute myeloid leukemia. *Oncotarget* **7**, 65147–65156 (2016).
110. Fei, J., Li, Y., Zhu, X. & Luo, X. miR-181a Post-Transcriptionally Downregulates Oncogenic RalA and Contributes to Growth Inhibition and Apoptosis in Chronic Myelogenous Leukemia (CML). *PLoS ONE* **7**, e32834 (2012).
111. Zhu, X., Li, Y., Luo, X. & Fei, J. Inhibition of small GTPase RalA regulates growth and arsenic-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia (CML) cells. *Cellular Signalling* **24**, 1134–1140 (2012).
112. Gu, C., Feng, M., Yin, Z., Luo, X. & Yang, J. RalA, a GTPase targeted by miR-181a, promotes transformation and progression by activating the Ras-related signaling pathway in chronic myelogenous leukemia. *Oncotarget* **7**, 20561–20573 (2016).

113. Hofmann, C., Stühmer, T., Schmiedl, N. *et al.* PI3K-dependent multiple myeloma cell survival is mediated by the PIK3CA isoform. *British Journal of Haematology* **166**, 529–539 (2014).
114. Brummelkamp, T. R., Bernards, R. & Agami, R. A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells. *Science* **296**, 550–553 (2002).
115. Izsvák, Z., Chuah, M. K. L., VandenDriessche, T. & Ivics, Z. Efficient stable gene transfer into human cells by the Sleeping Beauty transposon vectors. *Methods* **49**, 287–297 (2009).
116. Miyazaki, J.-i., Takaki, S., Araki, K. *et al.* Expression vector system based on the chicken  $\beta$ -actin promoter directs efficient production of interleukin-5. *Gene* **79**, 269–277 (1989).
117. Cox, J. & Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology* **26**, 1367–1372 (Dez. 2008).
118. Steinbrunn, T., Stühmer, T., Sayehli, C., Chatterjee, M., Einsele, H. & Bargou, R. C. Combined targeting of MEK/MAPK and PI3K/Akt signalling in multiple myeloma. *British Journal of Haematology* **159**, 430–440 (2012).
119. Liberzon, A., Birger, C., Thorvaldsdóttir, H., Ghandi, M., Mesirov, J. P. & Tamayo, P. The Molecular Signatures Database Hallmark Gene Set Collection. *Cell Systems* **1**, 417–425 (Dez. 2015).
120. Zhang, B., Kirov, S. & Snoddy, J. WebGestalt: An integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Research* **33**, W741–W748 (2005).
121. Wang, J., Duncan, D., Shi, Z. & Zhang, B. WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. *Nucleic acids research* **41**, 77–83 (2013).
122. Wang, J., Vasaikar, S., Shi, Z., Greer, M. & Zhang, B. WebGestalt 2017: a more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit. *Nucleic Acids Research* **45**, W130–W137 (2017).
123. López, Y., Nakai, K. & Patil, A. HitPredict version 4: comprehensive reliability scoring of physical protein–protein interactions from more than 100 species. *Database* **2015**, bav117 (2015).
124. Larocca, A., Mina, R., Gay, F., Brighen, S. & Boccadoro, M. Emerging drugs and combinations to treat multiple myeloma. *Oncotarget* **8**, 60656–60672 (Sep. 2017).
125. Moghadam, A. R., Patrad, E., Tafhiri, E. *et al.* Ral signaling pathway in health and cancer. *Cancer Medicine* **6**, 2998–3013 (Dez. 2017).
126. Jernberg-Wiklund, H. & Nilsson, K. in *Human Cell Culture*. Springer, Dordrecht (Hrsg. Masters, J. & Palsson, B.) Vol.III, 88–155 (2000).
127. Yan, C., Jones, D. N. M. & Theodorescu, D. Drugging the Ral GTPase. *Small GTPases* **6**, 157–159 (2015).
128. Skorobogatko, Y., Dragan, M., Cordon, C. *et al.* RalA controls glucose homeostasis by regulating glucose uptake in brown fat. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **115**, 7819–7824 (Juli 2018).

129. Walsh, T. G., Wersäll, A. & Poole, A. W. Characterisation of the Ral GTPase inhibitor RBC8 in human and mouse platelets. *Cellular Signalling* **59**, 34–40 (Juli 2019).
130. Hobbs, G. A., Der, C. J. & Rossman, K. L. RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *Journal of Cell Science* **129**, 1287–1292 (Apr. 2016).
131. Prior, I. A., Lewis, P. D. & Mattos, C. A Comprehensive Survey of Ras Mutations in Cancer. *Cancer Research* **72**, 2457–2467 (Mai 2012).
132. Lohr, J. G., Stojanov, P., Carter, S. L. *et al.* Widespread Genetic Heterogeneity in Multiple Myeloma: Implications for Targeted Therapy. *Cancer Cell* **25**, 91–101 (Jan. 2014).
133. Moskalenko, S., Henry, D. O., Rosse, C., Mirey, G., Camonis, J. H. & White, M. A. The exocyst is a Ral effector complex. *Nature Cell Biology* **4**, 66–72 (Jan. 2002).
134. Moskalenko, S., Tong, C., Rosse, C. *et al.* Ral GTPases Regulate Exocyst Assembly through Dual Subunit Interactions. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 51743–51748 (Dez. 2003).
135. Issaq, S. H., Lim, K.-H. & Counter, C. M. Sec5 and Exo84 Foster Oncogenic Ras-Mediated Tumorigenesis. *Molecular Cancer Research* **8**, 223–231 (Feb. 2010).
136. Fukai, S., Matern, H. T., Jagath, J. R., Scheller, R. H. & Brunger, A. T. Structural basis of the interaction between RalA and Sec5, a subunit of the sec6/8 complex. **22**, 3267–3278 (2003).
137. Jin, R., Junutula, J. R., Matern, H. T., Ervin, K. E., Scheller, R. H. & Brunger, A. T. Exo84 and Sec5 are competitive regulatory Sec6/8 effectors to the RalA GTPase. *The EMBO Journal* **24**, 2064–2074 (Juni 2005).
138. Hazelett, C. C. & Yeaman, C. Sec5 and Exo84 Mediate Distinct Aspects of RalA-Dependent Cell Polarization. **7**, e39602 (2012).
139. Shipitsin, M. & Feig, L. A. RalA but Not RalB Enhances Polarized Delivery of Membrane Proteins to the Basolateral Surface of Epithelial Cells. *Molecular and Cellular Biology* **24**, 5746–5756 (2004).
140. Gozzetti, A., Papini, G., Candi, V., Brambilla, C. Z., Sirianni, S. & Bocchia, M. Second Generation Proteasome Inhibitors in Multiple Myeloma. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **17**, 920–926 (Juni 2017).

## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

AFX (FOXO4)	Forkhead box O4
AKT	AKT serine/threonine kinase
AML	Akut myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
ATF2	Activating transcription factor 2
β-ME	β-Mercaptoethanol
CCND1	Cyclin D1
CCND3	Cyclin D3
CDC42	Cell division cycle 42
CDKN2A	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A
CDKN2C	Cyclin dependent kinase inhibitor 2C
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CRBN	Cereblon
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOCK2	Dedicator of cytokinesis protein 2
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
EXOC2, SEC5	Exocyst complex component 2
EXOC8, EXO84	Exocyst complex component 8
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FBS	fetal bovine serum
FDR	false discovery rate
FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3
FLC	Freie Leichtketten
GLG1	Golgi apparatus protein 1
GO	gene ontology
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
GSK-3β	Glycogen synthase kinase-3β
HADHA	Trifunctional enzyme subunit alpha
HADHB	Trifunctional enzyme subunit beta
HDAC	Histon-Deacetylase

---

HRP	horseradish peroxidase
HZML	humane Myelom-Zelllinie
Ig	Immunglobuline
IGF1	insulin like growth factor 1
IKZF1	IKAROS family zinc finger 1
IKZF3	IKAROS family zinc finger 3
IL-10	Interleukin 10
IL-6	Interleukin 6
IMiDs	Immunmodulierende Substanzen
IMWG	International Myeloma Working Group
IP	Immunopräzipitation
IPO9	Importin-9
JNK	C-Jun N-terminal kinase
KRAS	KRAS proto-oncogene, GTPase
LFQ	label-free quantification
LTF	Lactotransferrin
MACS	magnetic-activated cell sorting
MAF	MAF bZIP transcription factor
MAFB	MAF bZIP transcription factor B
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
miRNA	Micro RNA
MM	Multiple Myelom
MRT	Magnetresonanztomografie
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem mass spectrometry
mTORC1	Mammalian target of rapamycin complex 1
MYC	MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor
NF $\kappa$ B	Nuclear factor kappa B
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NO	Stickstoffmonoxid
NRAS	NRAS proto-oncogene, GTPase
NPZ	normale Plasmazellen
ORA	Overrepresentation Enrichment Analysis
PF647	PromoFluor-647
PH	Pleckstrin homology
PI	Propidium-Iodid

---

PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PLCD1	Phospholipase C delta 1
PLD	Phospholipase D
pSUP	pSUPER
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RA	RAS-association
RAC1	Rac family small GTPase 1
RAF	Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
RAL	RAS like proto-oncogene
RALBP1, RLIP76	RALA binding protein 1
RALGAP $\alpha$ 1	RAL GTPase activating protein catalytic alpha subunit 1
RALGAP $\alpha$ 2	RAL GTPase activating protein catalytic alpha subunit 2
RALGAP $\beta$	RAL GTPase activating protein non-catalytic beta subunit
RALGAPs	RAL GTPase activating proteins
RALGDS	RAL guanine nucleotide dissociation stimulator
RALGEFs	Guanine nucleotide exchange factors
RB1	RB transcriptional corepressor 1
REM	RAS Exchange Motif
RGL1	RAL guanine nucleotide dissociation stimulator like 1
RGL2	RAL guanine nucleotide dissociation stimulator like 2
RGL3	RAL guanine nucleotide dissociation stimulator like 3
RGL4	RAL guanine nucleotide dissociation stimulator like 4
Rho	RAS homolog family member
RNA	Ribonukleinsäure
RRP1	Ribosomal RNA processing protein 1
RRP12	RRP12-like protein
SDC1	Syndecan-1
SDF-1	Stromal cell-derived factor-1
SDS	Sodium lauryl sulfate, Natriumlaurylsulfat
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
S100A8	Protein S100-A8
TGF- $\beta$ 1	Transforming growth factor
TGS	Tris-Glyzin-SDS
TNF	Tumor necrosis factor
TP53	Tumor protein p53
VEGF	Vascular endothelial growth factor
ZONAB	ZO-1-associated nucleic acid binding protein



## 6.2 Vektorkarten

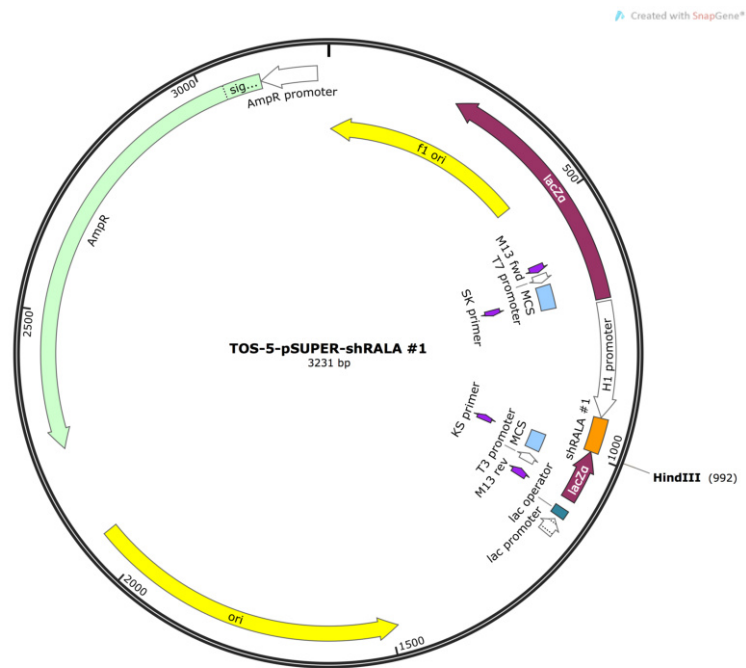


Abbildung 20: pSUPER shRALA 1.

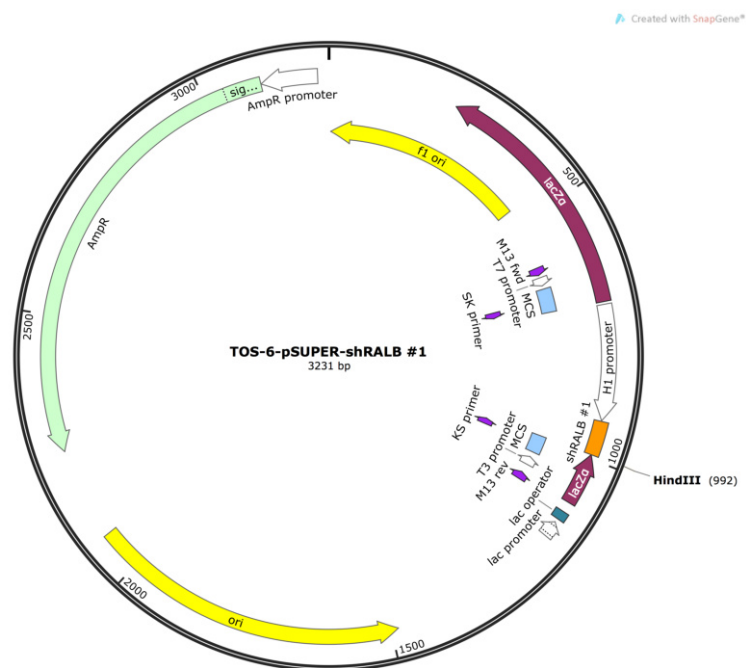


Abbildung 21: pSUPER shRALB 1.



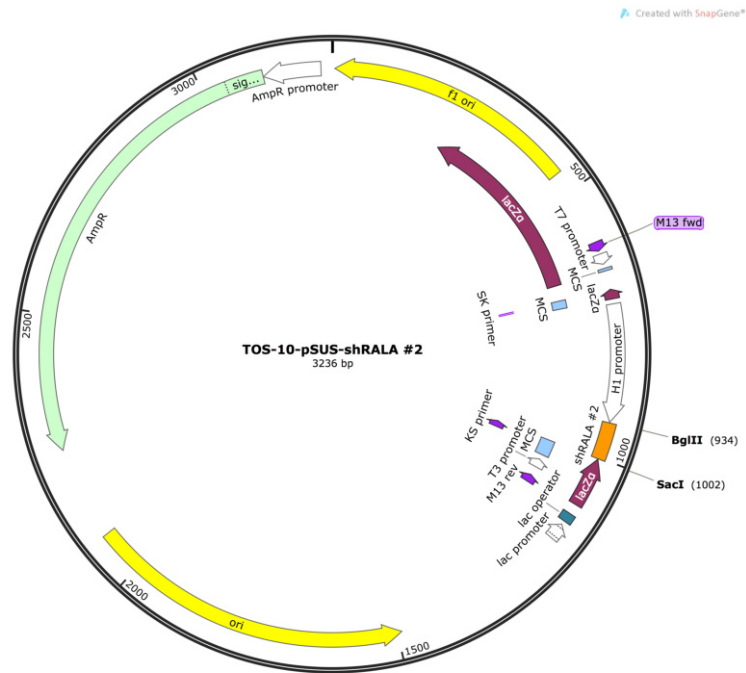


Abbildung 24: pSUS shRALA 2.

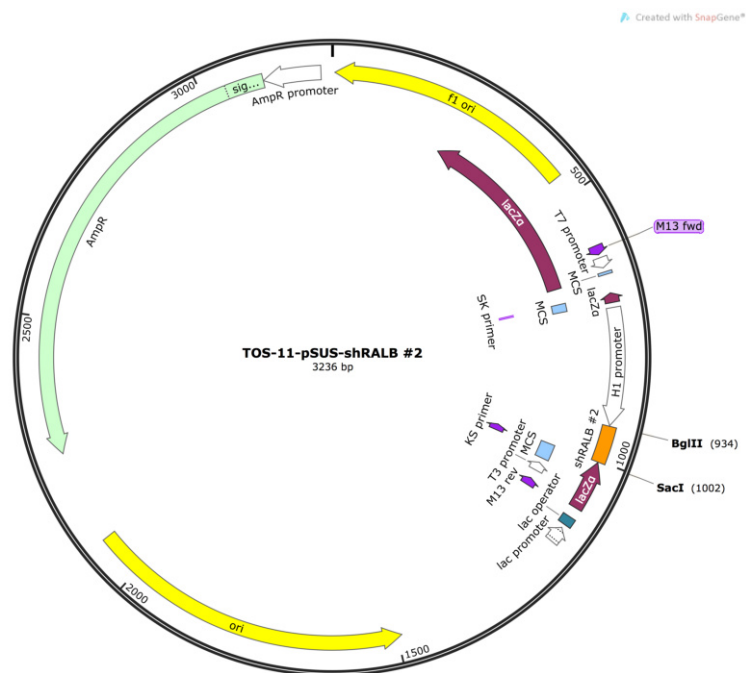


Abbildung 25: pSUPER shRALB 2.

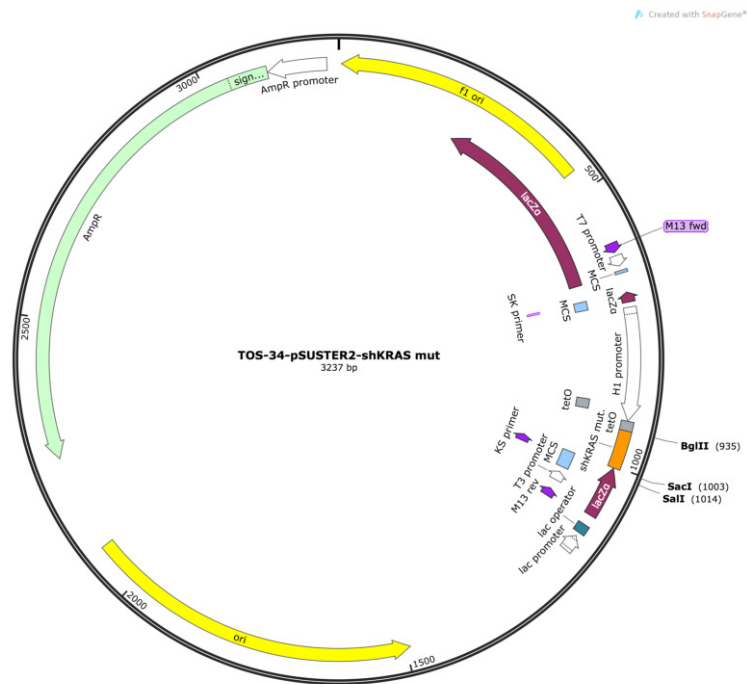


Abbildung 26: pSUSTER shKRAS mut.

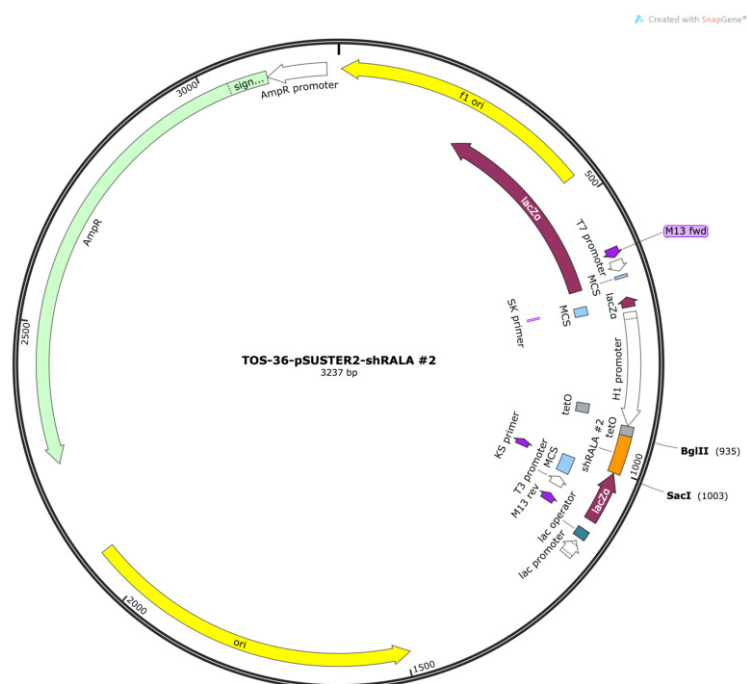


Abbildung 27: pSUSTER shRALA.



Abbildung 28: pT2 HA-RALA.

### 6.3 Puffer- und Reaktionslösungen für Western Blot Analysen

#### Lysepuffer

30 mM Tris pH 7,0  
120 mM NaCl  
10 % (v/v) Glycerin  
1 % (v/v) Triton X-100

Vor Gebrauch zugeben:

Protease-Inhibitor complete (Verhältnis 1:25)  
Phosphatase-Inhibitor-cocktail II (Verhältnis 1:50)  
Phosphatase-Inhibitor-cocktail III (Verhältnis 1:50)

#### 2xLaemmli-Puffer

100 mM Tris pH 6,8  
20 % (v/v) Glycerol  
4 % (w/v) SDS  
10 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol  
0,01 % (w/v) Bromphenolblau

#### TGS-Laufpuffer

25 mM Tris  
192 mM Glycin  
0,1 % (w/v) SDS

#### Transferpuffer

20 % (v/v) Methanol  
25 mM Tris  
192 mM Glycin  
0,037 % (w/v) SDS

#### TBS-T Puffer

2 mM Tris pH 7,6  
14 mM NaCl  
0,1 % (v/v) Tween20

**ECL-Lösung**

100 mM	Tris pH 8,8
2,5 mM	Luminol
0,2 mM	p-Cumarsäure
0,009% (v/v)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

## 6.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	B-Zell-Entwicklung. . . . .	7
Abbildung 2:	Molekulare Pathogenese des Multiplen Myeloms. . . . .	9
Abbildung 3:	Onkogenes Signaling im Multiplen Myelom. . . . .	11
Abbildung 4:	Proteinstruktur von RAL. . . . .	12
Abbildung 5:	Regulation der GTPase-Aktivität von RAL. . . . .	13
Abbildung 6:	Expression der RAL-Isoformen in Myelomzellen. . . . .	29
Abbildung 7:	<i>In situ</i> Expression der RAL-Isoformen in primären Myelomzellen. . . . .	30
Abbildung 8:	Zellüberleben von MM-Zelllinien nach RAL-Knockdown . . . . .	32
Abbildung 9:	Western Blot-Analyse der MAPK und AKT-Aktivierung nach RAL-Knockdown. . . . .	35
Abbildung 10:	Zellüberleben nach Behandlung von MM-Zelllinien mit dem RAL-Inhibitor RBC8. . . . .	36
Abbildung 11:	RAL-Aktivierung nach Behandlung von MM-Zellen mit dem RAL-Inhibitor RBC8. . . . .	37
Abbildung 12:	Zellüberleben nach Behandlung von MM-Zellen mit dem RAL-Inhibitor RBC8 in Kombination mit MAPK- bzw. PI3K/AKT-Inhibitoren. . . . .	38
Abbildung 13:	RAL-Aktivierung nach RAS-Knockdown. . . . .	39
Abbildung 14:	Anzahl differenziell exprimierter Gene nach onkogenem KRAS- bzw. RALA-Knockdown. . . . .	40
Abbildung 15:	Heatmap aus der Anreicherungsanalyse aller differenziell exprimierten Gene nach KRAS oder RALA-Knockdown in MM.1S-Zellen. . . . .	41
Abbildung 16:	Gencluster mit signifikant veränderten Anteilen differenziell exprimierter Gene nach KRAS und RALA-Knockdown. . . . .	42
Abbildung 17:	Stabile Expression von HA-markiertem RALA in MM.1S. . . . .	45
Abbildung 18:	Massenspektrometrische Analyse der RALA-Interaktionspartner . . . . .	46
Abbildung 19:	Kombination von RALA-Knockdown mit potentiellen und aktuellen MM-Therapeutika . . . . .	48
Abbildung 20:	Vektorkarte pSUPER shRALA 1. . . . .	68
Abbildung 21:	Vektorkarte pSUPER shRALB 1. . . . .	68
Abbildung 22:	Vektorkarte pSUPER shKRAS mut. . . . .	69
Abbildung 23:	Vektorkarte pSUPER shNRAS mut. . . . .	69
Abbildung 24:	Vektorkarte pSUS shRALA 2. . . . .	70
Abbildung 25:	Vektorkarte pSUS shRALB 2. . . . .	70
Abbildung 26:	Vektorkarte pSUSTER shKRAS mut. . . . .	71
Abbildung 27:	Vektorkarte pSUSTER shRALA. . . . .	71
Abbildung 28:	Vektorkarte pT2 HA-RALA. . . . .	72



---

## 6.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zielsequenzen der genutzten shRNA-Expressionsvektoren . . . . .	21
Tabelle 2:	Spannungen zur Elektroporation von HMCL . . . . .	22
Tabelle 3:	Primärantikörper für Western Blot-Analysen . . . . .	25
Tabelle 4:	Auswertung der RAL-Expression in immunhistochemischen Färbungen von normalen, MGUS und MM-Plasmazellen . . . . .	31
Tabelle 5:	Zellüberlebensraten von MM-Zelllinien nach RAL-Knockdown . . . . .	33
Tabelle 6:	Anreicherungsanalyse differenziell exprimierter Gene nach KRAS- bzw. RALA-Knockdown. . . . .	43

## 6.6 Publikationsliste

Seibold M., Stühmer T., Kremer N., Mottok A., Scholz C. J., Schlosser A., Leich E., Holzgrabe U., Brünnert D., Barrio S., Kortüm K. M., Solimando A. G., Chatterjee M., Einsele H., Rosenwald A., Bargou R. C., Steinbrunn T. RAL GTPases mediate multiple myeloma cell survival and are activated independently of oncogenic RAS. *Haematologica* October 2019: haematol.2019.223024; doi:10.3324/haematol.2019.223024

## Danksagung

Für den erfolgreichen Abschluss meiner Arbeit möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während dieser Zeit unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Ralf C. Bargou bedanken, der mir die Möglichkeit gab diese Arbeit am Institut für Translationale Onkologie durchzuführen. Ebenso möchte ich mich für die Übernahme des Erstgutachtens und die fachliche Unterstützung bedanken. Mein Dank gilt ebenfalls Prof. Dr. Hermann Einsele dafür, dass ich diese Arbeit am Universitätsklinikum durchführen konnte.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Thomas Dandekar bedanken, der sich freundlicherweise dazu bereit erklärt hat, das Zweitgutachten zu übernehmen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Dr. Torsten Steinbrunn für die Betreuung meiner Arbeit und die Unterstützung bei allen Fragen und Themen. Seine Einsatz hat wesentlich zur Weiterentwicklung und Qualität dieser Arbeit beigetragen.

Ebenso möchte ich Dr. Thorsten Stühmer für seinen Beitrag zur dieser Arbeit und seine stetige Hilfsbereitschaft bei jeglichen Fragen und Problem danken.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Manik Chatterjee und Dr. Daniela Brännert für die interessanten Diskussionen sowie ihre konstruktiven Beiträge bedanken.

Ein besonderer Dank geht an Nadine Kremer für die Einarbeitung in die Methodik, für jegliche Vorarbeiten und die unterstützende Zusammenarbeit.

Ich möchte mich auch bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Bargou für die freundliche und offene Arbeitsatmosphäre bedanken. Speziell möchte ich mich bei Steffi Kirner, Heike Schraud und Evelyn Brandt für ihre Mitarbeit und Hilfe bei der Arbeit an der Publikation in der Fachzeitschrift *Haematologica* bedanken.

Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Dr. Andreas Schlosser für die Durchführung der Massenspektrometrie-Analysen und die konstruktiven Vorschläge und Diskussionen.

Gleichermaßen möchte ich mich bei Dr. Claus-Jürgen Scholz für die Durchführung der RNAseq-Analysen und deren Auswertungen bedanken.

Auch bei Dr. Anja Mottok möchte ich mich für die Durchführung und Auswertung der immunhistochemischen Färbungen bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und allen Freunden für die Unterstützung und Hilfe zu jeder Zeit meiner Arbeit bedanken.