

**Programa de Doctorado del Departamento Biología Molecular**

***Tesis Doctoral:***

***Papel de las GTPasas Ral en la función linfoide  
y la citotoxicidad celular.***

Doctorando: **Jesús Sánchez Ruiz**

Directora de Tesis: **Ana María González García**

Departamento de Inmunología y Oncología

Centro Nacional de Biotecnología





# Índice

<b>SUMMARY</b>	7
<b>ABREVIATURAS</b>	9
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
⊙ Las GTPasas Ral, sus GEF y sus GAP	13
⊙ Regulación de las GTPasas Ral	16
⊙ Moléculas efectoras y funciones de las GTPasas Ral	18
⊙ Ras, Ral y Cáncer	21
⊙ Ras, Ral y el Sistema Inmune	22
⊙ La citotoxicidad celular	24
⊙ Linfocitos T citotóxicos y células Natural Killer	24
⊙ La sinapsis inmunológica	25
⊙ Los gránulos líticos	27
⊙ Mecanismos de secreción de los gránulos líticos	29
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	33
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	35
<b>RESULTADOS</b>	
- <b><i>Papel de las GTPasas Ral en la función de los linfocitos T</i></b>	
⊙ Ral se activa en linfocitos T en respuesta a la estimulación del TCR	43
⊙ Ral se concentra en la zona de contacto entre linfocito T:APC durante la presentación antigénica	45
⊙ Las alteraciones en los niveles y en la actividad de RalA y B modifican la expresión del marcador de activación CD69	47
⊙ Los ratones RalGDS <sup>-/-</sup> muestran defectos en la activación de Ral en respuesta a la estimulación del TCR	48

⊙ La ausencia de RalGDS no se traduce en defectos de poblaciones hematopoyéticas ni en bazo ni en nódulos linfáticos.	51
CD25/69 y proliferación en estimulación de linfocitos T naïve	51
- <b><i>Las GTPasas Ral en citotoxicidad celular</i></b>	
⊙ Ral A y RalB se activan en respuesta a estímulos inductores de citotoxicidad.	53
Ral A y RalB se encuentran en los gránulos líticos en células citotóxicas	56
⊙ La disminución de los niveles de RalA o RalB reduce la capacidad citotóxica de células YTS	58
⊙ Ral no regula la conjugación entre células YTS y sus dianas	60
⊙ RalA, pero no RalB, regula la polarización de la maquinaria de secreción a la zona de contacto	62
⊙ La interferencia con RalA y RalB altera la degranulación de las células YTS	64
⊙ La reducción de los niveles de Sec5 reduce la capacidad citotóxica	68
⊙ El exocisto regula la degranulación pero no la polarización de la maquinaria de secreción.	69
<b><i>DISCUSIÓN</i></b>	
- <b><i>Papel de las GTPasas Ral en la función del los linfocitos T</i></b>	73
- <b><i>Las GTPasas Ral en citotoxicidad celular</i></b>	77
<b><i>CONCLUSIONES</i></b>	87
<b><i>REFERENCIAS</i></b>	91
<b><i>ANEXO</i></b>	109







## Summary:

Ral GTPases are small monomeric G proteins that belong to the Ras superfamily. The two known isoforms, RalA and RalB, are widely distributed in mammals. Both isoforms are anchored to the plasma membrane and to intracellular vesicles. Ral GTPases are thought to be implicated in a broad spectrum of processes that comprise exo- and endocytosis, cell migration and transformation. Ral signalling is considered one of the three most important Ras effector pathways, together with the PI3K and Raf routes. Ras signalling is essential in the immune system, since it regulates T and B cell development as well as processes such as T cell activation after antigen-MHC recognition. GTP-bound Ras recruits and activates Ral guanine exchange factors including RalGDS or Rlf, which activate Ral; this suggests Ral involvement in immune response regulation.

Here we discuss the implication of Ral-GTPases in T cell activation via the T cell receptor (TCR). We show that Ral activity increases after TCR stimulation, and these GTPases relocate to the immunological synapse. Alterations in Ral activity or expression by mutation or shRNA transfection lead to impaired activation of the Jurkat CD4<sup>+</sup> T cell line, as measured by membrane expression levels of CD69. We also studied the effect of Ral activity downregulation in RalGDS<sup>-/-</sup> mice, which showed no obvious defect either in T cell development or in activation ability after TCR stimulation.

Ral GTPases regulate vesicular trafficking and polarized granule secretion in several cell types. The second part of our study focused on Ral regulation of polarized secretion of lytic granules by lytic cells. Using a human NK cell line, we show that both RalA and RalB isoforms are activated rapidly after target cell recognition. Silencing of RalA and RalB impaired NK cell cytotoxicity. RalA regulated granule polarization towards the immunological synapse and subsequent degranulation, whereas RalB regulated degranulation but not polarization of lytic granules. Analysis of the molecular mechanism indicated that Ral activation in NK cells leads to assembly of the exocyst, an octameric protein complex involved in polarized secretion and vesicle tethering. The assembly of this complex is required for degranulation, as interference with expression of the exocyst component Sec5 led to reduced degranulation and impaired cytotoxicity in NK cells, although it did not affect polarization. Our results thus identify a role for Ral in cell-mediated cytotoxicity, implicating these GTPases in lymphocyte function.





## ABREVIATURAS:

<b>AP-1:</b>	Proteína Activadora 1.		conversion de la proteína con dominios similares a los dominios de muerte asociada a Fas.
<b>AP-2:</b>	Complejo de la proteína adaptadora 2.	<b>fMPLP:</b>	N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
<b>Arf:</b>	Factor de ribosilación del ADP.	<b>GADS:</b>	O GRAP2, Proteína adaptadora relacionada con Grb2.
<b>Bcl:</b>	Proteína de linfoma B.	<b>GAP:</b>	Proteína activadora de la actividad GTPasa.
<b>SMAC:</b>	Grupo de activación supramolecular central.	<b>GDP:</b>	Guanosín difosfato.
<b>Ca<sup>2+</sup> :</b>	Ión de Calcio.	<b>GEF:</b>	Factor de intercambio de Guanosina.
<b>CD...:</b>	Grupo de diferenciación...	<b>GFP:</b>	Proteína fluorescente verde.
<b>CDK:</b>	Quinasa dependiente de ciclo.	<b>GPCR:</b>	Receptor acoplado a proteínas G.
<b>CMAC:</b>	7-amino-4-clorometilcoumarina	<b>Grb2:</b>	Proteína de unión al receptor de factor de crecimiento-2.
<b>CTL:</b>	Linfocito T Citotóxico.	<b>GST:</b>	Glutación-S transferasa.
<b>DAG:</b>	Diacilglicerol.	<b>GTP:</b>	Guanosín Trifosfato.
<b>DGK:</b>	Diacilglicerol Quinasa.	<b>GTPasa:</b>	Guanosín Trifosfatasa.
<b>DISC:</b>	Complejo señalizador de inducción de muerte.	<b>Munc13...:</b>	Proteína de rata homóloga a Unc13.
<b>DNA:</b>	Ácido Desoxirribonucleico.	<b>ICAM:</b>	Molécula de adhesión intercellular.
<b>Erb2:</b>	Homólogo 2 del oncogén de leucemia eritoblástica viral.	<b>IgG,M,...:</b>	Inmunoglobulina G, M...
<b>ERK:</b>	Quinasa regulada por señales extracelulares.	<b>IL2, 6...:</b>	Interleucina 2, 6... I
<b>Exo:</b>	Proteína relacionada con exocitosis.	<b>IP3:</b>	Inositol-1,4,5-trifosfato
<b>FADD:</b>	Dominio de muerte asociado a Fas.	<b>IRF3:</b>	Factor regulador del interferon 3.
<b>Fas:</b>	O CD95, miembro 6 de la superfamilia de receptores de TNF.	<b>ITAM:</b>	Motivo de activación basado en las tirosinas del inmunoreceptor.
<b>FHL:</b>	Linfocitosis hemofagocítica.	<b>ITIM:</b>	Motivo de inhibición basado en las tirosinas del inmunoreceptor.
<b>FITC:</b>	Fluoresceína isocianato.	<b>JAK:</b>	Quinasa activada por Janus.
<b>FLIP:</b>	Proteína inhibidora de la	<b>JNK:</b>	Quinasa N-terminal c-jun
		<b>kDa:</b>	Kilo-Dalton
		<b>KIR:</b>	Receptor de células asesinas similar a la inmunoglobulina.
		<b>Lamp1 y 2:</b>	Proteína asociada a la membrana del lisosoma 1 y 2.
		<b>LAT:</b>	Proteína de unión para la activación de células T
		<b>Lck:</b>	Quinasa específica de linfocitos.
		<b>LFA-1:</b>	Factor de activación linfocitaria 1.
		<b>LIF:</b>	Factor inhibidor de leucemia.
		<b>MAPK:</b>	Proteína quinasa activada por mitógenos.
		<b>MHC:</b>	Complejo mayor de

	histocompatibilidad.		
<b>mRNA:</b>	RNA mensajero.	<b>ROCK:</b>	Quinasa asociada a Rho con dominio coiled-coil.
<b>MTOC:</b>	Centro organizador de microtúbulos.	<b>SAP:</b>	Proteína asociada a SLAM.
<b>NAK:</b>	Quinasa asociada a Nef.	<b>Sec:</b>	Proteína relacionada con la secreción.
<b>NFκB:</b>	Factor nuclear κB.	<b>SEE:</b>	Enterotoxina E de <i>Staphylococcus</i> .
<b>NK:</b>	Célula asesina natural.	<b>Ser:</b>	Serina.
<b>PA:</b>	Ácido fosfatídico.	<b>SH2:</b>	Dominio de homología a Src 2.
<b>PAF:</b>	Factor activador de plaquetas.	<b>SH3:</b>	Dominio de homología a Src 3.
<b>PAK:</b>	quinasa activada por P21/Cdc42/Rac1.	<b>SHP:</b>	Fosfatasa con dominio SH2.
<b>PARP:</b>	Poli-ADP ribose polimerasa.	<b>shRNA:</b>	RNA de interferencia en bucle.
<b>PC:</b>	Fosfatidilcolina.	<b>siRNA:</b>	RNA de interferencia pequeño.
<b>PDK1:</b>	Piruvato deshidrogenasa quinasa 1.	<b>SLAM:</b>	Proteína de activación de la señalización linfocitaria.
<b>PH:</b>	Dominio de homología a plestrina.	<b>SLP76:</b>	Proteína de 76kDa de leucocitos que contiene un dominio SH2.
<b>PI3K:</b>	Fosfatidilinositol-3-quinasa.	<b>SNARE:</b>	Receptores de SNAP.
<b>PIP2:</b>	Fosfatidilinositol-bifosfato.	<b>SOS:</b>	Proteína hijo de sevenless.
<b>PLC:</b>	Fosfolipasa C	<b>Src:</b>	Proteína de sarcoma.
<b>PLD:</b>	Fosfolipasa D.	<b>STAT:</b>	Señal transductora y activadora de transcripción.
<b>PMA:</b>	Forbol-12-miristato-13-acetato.	<b>TBK1:</b>	Quinasa que se une a TANK.
<b>POB1:</b>	Proteína de la familia Boi 1.	<b>TC21:</b>	R-Ras.
<b>PP2A:</b>	Proteína fosfatasa 2A.	<b>TCR:</b>	Receptor de células T.
<b>Rab:</b>	Proteína relacionada con Ras en cerebro.	<b>TNF:</b>	Factor de necrosis tumoral.
<b>Rac:</b>	Proteína relacionada con Ras sustrato de la toxina botulínica C3.	<b>TRAIL:</b>	Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF.
<b>Raf:</b>	Factor asociado a Ras.	<b>Vamp8:</b>	Proteína de membrana asociada a vesículas 8.
<b>Ral:</b>	Proteína similar a Ras.	<b>WASP:</b>	Proteína del Síndrome de Wiskott Aldrich.
<b>RalBP1:</b>	Proteína de unión a Ral 1 .	<b>WB:</b>	Western Blot.
<b>RalGDS:</b>	Estimulador de la disociación de GDP de Ral.	<b>WIP:</b>	Proteína de interacción con Wasp.
<b>RalGPS:</b>	GEF de Ral con Dominio PH.	<b>WT:</b>	Silvestre.
<b>Rap:</b>	Proteína relacionada con Ras.	<b>ZAP70:</b>	Quinasa asociada a la cadena ζ, de 70kDa.
<b>Ras:</b>	Proteína de Sarcoma de Rata.	<b>ZO-1:</b>	Zonula occludens 1.
<b>RasGRP:</b>	Proteína liberadora de los nucleótidos de Guanina de Ras.	<b>ZONAB:</b>	Factor asociado a la caja Y de ZO-1.
<b>RBD:</b>	Dominio de unión a Ras/Ral.		
<b>REM:</b>	Dominio de intercambio de Ras.		
<b>Reps1:</b>	Proteína que contiene un dominio Eps asociado a RalBP1 1.		
<b>Rgl:</b>	Proteína parecida al factor de disociación de GDP.		
<b>Rgr:</b>	Factor relacionado con RalGDS.		
<b>Rho:</b>	Proteína homóloga de Ras.		
<b>Rlf:</b>	Factor parecido a RalGDS.		
<b>RNA:</b>	Ácido ribonucleico.		







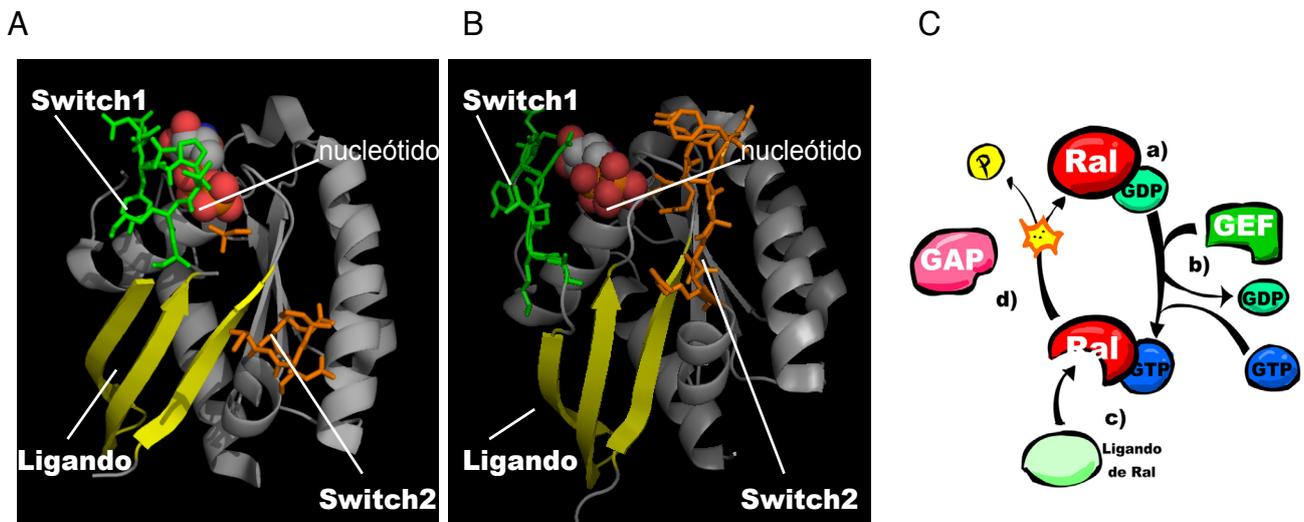
## Introducción:

### Las GTPasas Ral, sus GEFs y sus GAP:

Las GTP-asas Ral constituyen una de las ramas de la superfamilia Ras de GTPasas monoméricas, junto con H-, N- y K-Ras, Rap, TC21, M- y R-Ras. Fueron identificadas y aisladas

por su similitud con K, N y R-Ras<sup>(51)</sup>, aunque durante largo tiempo se supo bastante poco de ellas. Sin embargo, a partir del descubrimiento de que algunos de los factores intercambiadores de GTP de Ral (RalGEFs) eran efectores directos del oncogen Ras<sup>(266, 284, 245, 117)</sup>, han ido ganando una creciente notoriedad, especialmente en el campo de la oncología.

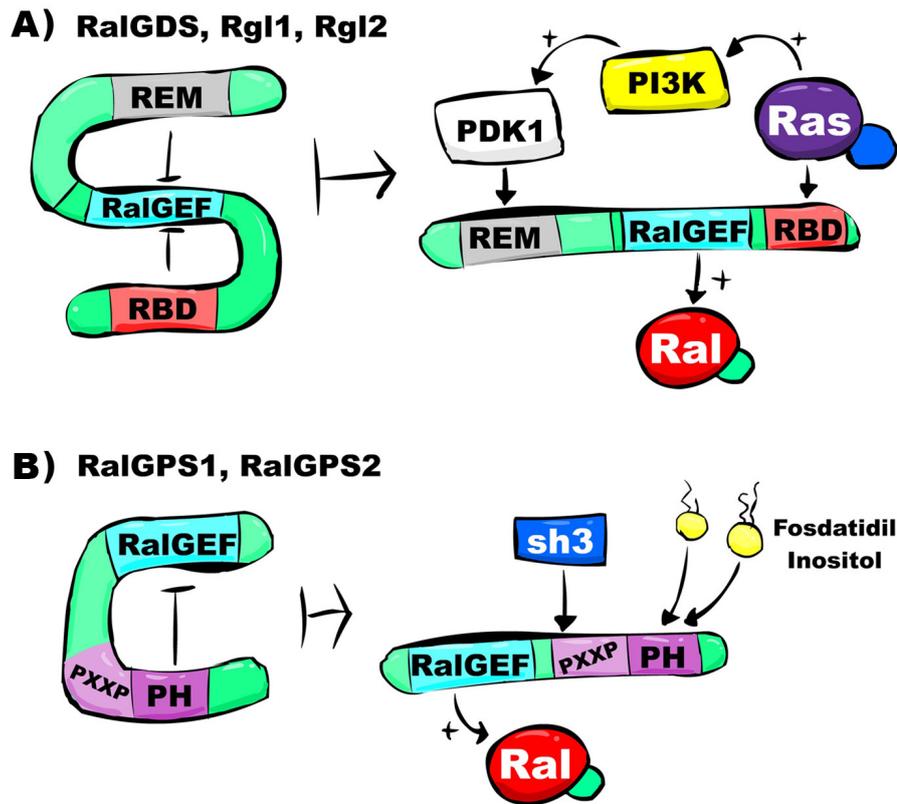
La familia de Ral está compuesta por dos únicas isoformas, RalA y RalB, que comparten una identidad del 82%. Estas proteínas se denominan GTP-asas porque son capaces de hidrolizar guanosín-trifosfato (GTP) a guanosín-difosfato (GDP)<sup>(82)</sup>. Esta propiedad les permite actuar como interruptores moleculares, ya que cuando están unidas a GTP se encuentran en una conformación activa que facilita la unión de estas proteínas a sus efectores (**Figura 11A y B**); el fosfato adicional del GTP consigue desplazar



**Figura 11:**

Las GTP-asas Ral ciclan entre un estado de unión a GDP, en el que permanecen inactivas, y uno de unión a GTP en el que están activas.

A y B) Modelo tridimensional de la GTPasa RalA unida a GDP, y por tanto en conformación inactiva (A) o unida a un análogo no hidrolizable de GTP, por lo que se encuentra en su conformación activa (B). El tercer grupo fosfato del GTP induce el desplazamiento de ciertos aminoácidos (p.ej Asp49), y la relocalización de dos regiones (switch1 y 2). Al ocurrir esto, la lámina  $\beta$  inferior izquierda resulta más accesible para la interacción con los efectores de Ral. La estructura original se publicó y describió en<sup>(98)</sup>. C) Esquema del ciclo GTPasa de Ral. a) Ral unido a GDP se encuentra en una conformación inactiva, de baja afinidad por sus ligandos. b) Los factores intercambiadores de nucleótido (GEF) facilitan la liberación y sustitución de nucleótidos unidos a Ral; dado que el GTP celular es mucho más abundante que el GDP, estas proteínas actúan como activadores. c) Al interactuar con GTP, se produce un cambio conformacional en Ral a un estado de gran afinidad por sus ligandos. d) Las GTP-asas pequeñas tienen actividad GTPasa intrínseca, por lo que eventualmente se inactivan ellas mismas. Esta actividad enzimática puede aumentarse varios órdenes de magnitud por proteínas GAP, que incrementan enormemente la velocidad de hidrólisis de GTP.



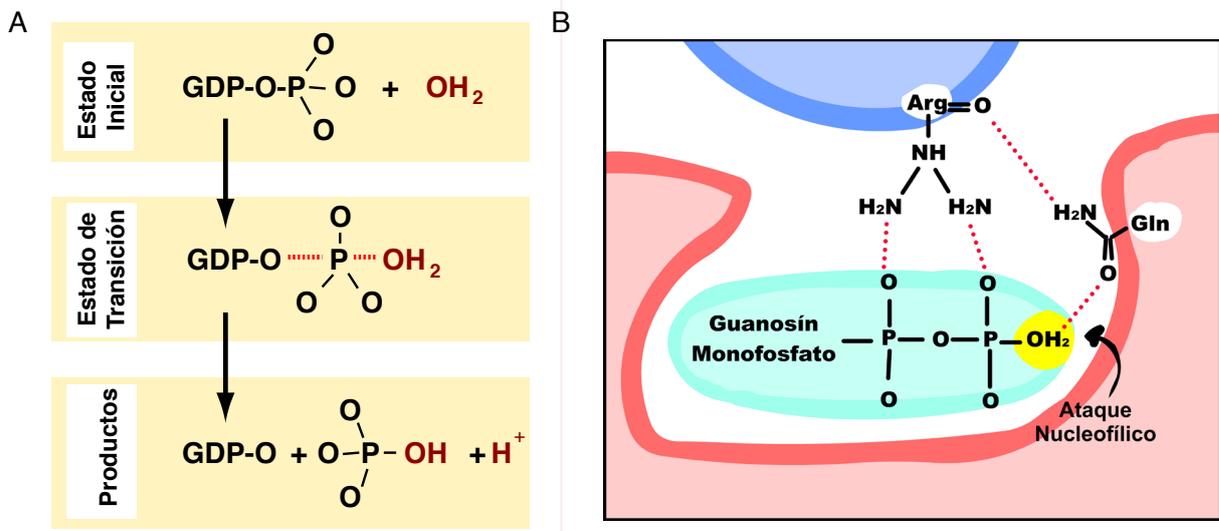
**Figura 12:**

Tipos de GEF de Ral y su regulación:

A) GEFs con dominio de unión a Ras (RBD). Estas proteínas se caracterizan por un dominio RBD (de *Ras Binding Domain*) y un dominio cdc25 de intercambio de nucleótidos, o RaIGEF. En condiciones basales, el dominio RBD y un dominio REM N-Terminal mantienen el GEF en una conformación inactiva; sin embargo, cuando Ras-GTP se une al RBD de estos GEF, el dominio RaIGEF queda libre y puede actuar sobre Ral, activando esta GTPasa. El dominio REM del GEF RalGDS puede ser a su vez liberado por la interacción del efector de PI3K PDK1. B) GEFs no regulados por Ras. Estos GEFs no dependen de la actividad de Ras. Se ha propuesto que su actividad puede ser regulada por interacciones con fosfatidil-inositoles a través de un dominio PH C-Terminal, o por interacción con proteínas con dominios SH3. Figura basada en <sup>(30)</sup>.

determinados residuos, que alteran la disposición espacial de dos regiones llamadas Switch1 (aminoácidos 40-48) y Switch2 (aminoácidos 70-78) y facilitan la interacción con sus efectores <sup>(98)</sup>. Cuando hidrolizan GTP a GDP pasan de nuevo a una conformación inactiva, en la cual no son capaces de unirse a sus ligandos. Este equilibrio está estrictamente regulado (**Figura IIC**), lo que demuestra la importancia de estas proteínas. Existe un grupo de proteínas que estimulan el intercambio de nucleótido de las GTPasas, los denominados GEFs (Guanosine exchanging factors). Al facilitar el intercambio de nucleótidos se favorece la unión de GTP a Ral y por tanto su activación, ya que las concentraciones de GTP en el citoplasma son mucho mayores que las de

GDP. En la **Figura 2** (basada en <sup>(30)</sup>) mostramos un esquema de los GEF más estudiados hasta el momento. La mayoría de GEF de Ral, como RalGDS, Rgl1 y Rgl2 (**Fig12 A**), contienen un dominio de unión a Ras-GTP (*Ras Binding domain*, o RBD) <sup>(3, 117, 137, 245, 283, 284)</sup>. Sin embargo, existen GEFs que carecen de este dominio y no son capaces de interaccionar con Ras, como RalGPS1 y RALGPS2 <sup>(50, 68, 221)</sup>, (**Fig12 B**). En la figura se aprecia que los RaIGEF se encuentran en una conformación cerrada inactiva, en la que los dominios N-terminal o el mismo RBD bloquean el dominio GEF de esta proteína (también denominado dominio cdc25), manteniéndola catalíticamente inactiva. En el caso del primer grupo de GEFs es la interacción con Ras seguida



**Figura 13:**

Funcionamiento de general de los GAP:

A) Reacción de hidrólisis de GTP a partir de un ataque nucleofílico de una molécula de H<sub>2</sub>O. B) Acción de un GAP (en azul) sobre una GTPasa monomérica (rosa). Los GAP estabilizan la orientación de la molécula de GTP a través de puentes de hidrógeno al introducirse parcialmente en el bolsillo catalítico, y hacen más favorable el ataque nucleofílico de una molécula de H<sub>2</sub>O sobre el fosfato-γ del GTP. El ejemplo dibujado se corresponde con el bolsillo catalítico de Ras y Rap, similar al de Ral, y está basado en <sup>(218)</sup>.

de la incorporación del efector de PI3K PDK1 la que libera los dominios inhibitorios y permiten la interacción con Ral. En el caso de las RalGPs, carentes del RBD, parece ser que la interacción del fosfatidil inositol PIP<sub>2</sub> con un dominio PH C-terminal facilitaría la acción de estos GEFs <sup>(50)</sup>, así como su correcta localización. De hecho, la eliminación de este dominio PH desemboca en una localización dispersa por el citoplasma <sup>(68)</sup>. Estos GEF son capaces también de unirse, a través de un motivo rico en prolinas PxxP, a dominos SH3 de proteínas como Grb2 o PLCγ, tanto *in vitro* como *in vivo* <sup>(50)</sup>. Esta unión favorece una localización específica en microdominios de membrana enriquecidos en PIP<sub>2</sub> <sup>(49)</sup>, ya que éstas están implicadas en la respuesta a diversos estímulos extracelulares.

Además de a través de GEFs que favorecen la unión a GTP de Ral, estas proteínas están también sujetas a otro mecanismo de regulación general de las GTPasas monoméricas, la acción de las proteínas activadoras de la actividad GTPasa, o GAP <sup>(32)</sup>. Estas proteínas, o en algunos casos complejos proteicos, estimulan la actividad GTP-hidrolasa intrínseca de las

GTPasas pequeñas, incrementándola en varios órdenes de magnitud. El mecanismo general de los GAP consiste en modificar el bolsillo catalítico de la GTPasa, favoreciendo el ataque nucleofílico de una molécula de agua al fosfato-γ del GTP <sup>(218)</sup> y por tanto la hidrólisis de este nucleótido. (**Fig 13**) De esta manera el equilibrio se desplaza hacia la unión a GDP y por tanto a una conformación inactiva. Hasta hace poco se sabía bastante poco de los GAPs de Ral; se había identificado un complejo de alto peso molecular con actividad GAP específica para Ral y no Ras, aunque no se describió en mayor detalle <sup>(82)</sup>. Recientemente se han descrito dos complejos heterodiméricos que se han denominado RalGAP1 y RalGAP2. Estos complejos están formados por una subunidad común p170 y, en función del tejido, una subunidad catalítica p220 o p240, lo que formaría respectivamente los complejos RalGAP1 y RalGAP2 <sup>(240)</sup>. La reducción de los niveles de p170 con RNA de interferencia provoca niveles anormalmente altos y sostenidos de Ral-GTP en respuesta a factores de crecimiento <sup>(240)</sup>, lo que muestra la relevancia de este tipo de proteínas.

Finalmente, la actividad de las GTPasas

pequeñas puede ser bloqueada por acción de GDIs (*GTP Dissociation Inhibitors*), que impiden el intercambio de nucleótidos y por tanto la activación de la GTPasa. En el caso de Ral no se ha identificado hasta el momento ningún factor que tenga esta actividad.

### **Regulación de las GTPasas Ral:**

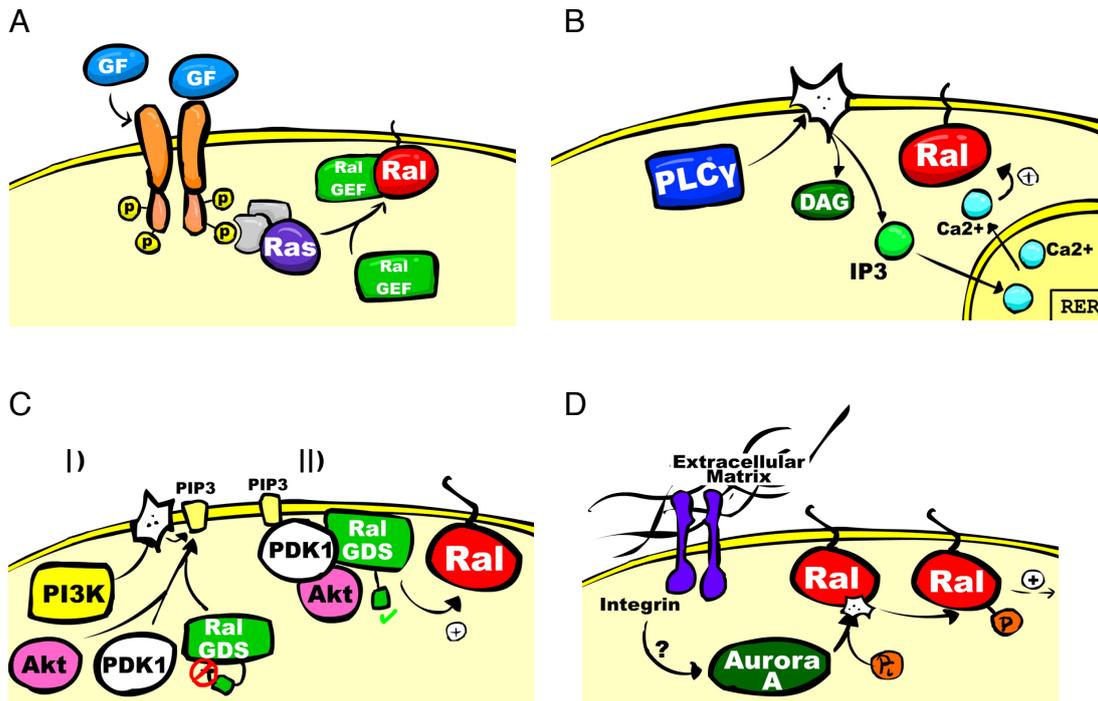
Hemos descrito hasta ahora los tipos de proteínas que controlan directamente la actividad de Ral. Pasamos ahora a introducir a Ral en el contexto de la señalización celular, y a discutir más extensamente las rutas celulares que regulan la actividad de Ral o de sus GEF.

En la mayoría de tejidos se ha encontrado a Ral asociado a la cara citosólica de diversas membranas, a la plasmática y sobre todo a vesículas intracelulares. Esto ocurre gracias a que el extremo carboxi-terminal de Ral contiene una secuencia CAAX (CCIL) y es susceptible de geranil-geranilarse <sup>(140)</sup>, lo cual facilita su asociación a membranas. Una vez allí, diversas vías de señalización son capaces de reclutar GEFs de Ral, y son estos los que estimulan la actividad de Ral. El mecanismo mejor descrito consiste en la activación de Ras en la membrana en respuesta a la estimulación de receptores acoplados a actividad tirosín-quinasa <sup>(141)</sup>. Como hemos comentado antes, Ras-GTP recluta a los RalGEFs que contengan un dominio RBD (como RalGDS, Rgl1, etc.) . Una vez en la membrana, estos GEFs activan a Ral (**Figura 14A**) <sup>(141, 177)</sup>. Se ha descrito que el RBD de los RalGEF como RalGDS o Rlf puede unirse in vitro a otras GTPasas de la familia de Ras, como Rap <sup>(245, 283)</sup> o TC21 <sup>(167, 228)</sup>, aunque por el momento no se ha descrito una función biológica clara para estas interacciones. El estudio de la activación de Ral utilizando mutantes dominantes negativos de Ras <sup>(287)</sup> sugiere que Ras predominaría por encima del resto de vías de estimulación de Ral. Sin embargo, un creciente número de publicaciones están poniendo de manifiesto otras vías de regulación de Ral que podrían resultar de gran importancia.

Ral contiene un dominio de unión a calmodulina que podría inducir su actividad en respuesta a incrementos en la concentración intracelular de calcio. Esta regulación ha demostrado ser esencial durante la secreción plaquetaria en respuesta a trombina y PAF (*platelet derived factor*) <sup>(286, 135)</sup>. También se ha observado que en respuesta a la activación del receptor de células B el incremento de calcio citosólico inducido por la acción de la PLC $\gamma$ 2 (**Figura 14B**) colabora en la activación de Ral <sup>(69)</sup>.

Recientemente se ha remarcado también la importancia de la señalización a través de PI3K como mecanismo adicional de regulación de la actividad de Ral. Buena prueba de esto es que la presencia del inhibidor de PI3K LY94002 inhibe la activación de Ral en células HEK293 estimuladas con factores de crecimiento <sup>(260)</sup>. Esta regulación ocurre a través del efector de PI3K PDK1. Esta quinasa es capaz de interactuar con RalGDS soluble y liberar un dominio REM autoinhibitorio, que bloquea su actividad catalítica y por tanto la activación de Ral, tal y como hemos comentado al hablar de los RalGEF (**Figura 14C I y II**) Esta interacción entre RalGDS y PDK1, además, facilita la fosforilación de Akt por parte de PDK1 <sup>(111)</sup>. Así pues, vemos que RalGDS es relevante en dos vías de señalización independientes, por un lado los efectos derivados de la activación de Ral y por el otro los de Akt fosforilado.

Gran cantidad de proteínas modulan su actividad a través de fosforilación, y Ral no es una excepción. La serín/treonín-quinasa Aurora-A, cuya sobreexpresión se ha correlacionado con anomalías en el huso mitótico <sup>(246)</sup>, transformación celular <sup>(275, 297)</sup> y el desarrollo de diversos tipos de cáncer humanos <sup>(100, 27)</sup>, fosforila a RalA en la serina 194 ; otra quinasa cuya naturaleza se desconoce es responsable de la fosforilación en la serina 183 <sup>(160, 233)</sup> (**Figura 14D**). Aurora-A se activa en respuesta a la unión de la célula a la matriz extracelular, y entre otros sustratos como proteínas motoras <sup>(28)</sup> o proteínas de la envoltura nuclear <sup>(211)</sup>, fosforila específicamente a RalA.



**Figura 14:**

**Mecanismos de activación de las GTPasas Ral:**

A) Activación a través de RasGTP. Ras se activa en respuesta a numerosos estímulos extracelulares, como por ejemplo factores de crecimiento, que se fosforilan en tirosinas; esto atrae una serie de proteínas adaptadoras que reclutan GEFs de Ras. Una vez activo, Ras recluta y activa a RalGEFs con un dominio RBD; de esta manera los GEFs acceden a Ral e inducen su activación. B) Activación de Ral por oleadas de calcio intracelular. Las fosfolipasas C (PLC) hidrolizan  $PIP_2$  en la membrana plasmática a DAG e  $IP_3$ . Este último induce liberación de los depósitos de calcio del retículo endoplásmico, y este calcio aumenta la fracción unida a GTP de Ral. C) Activación a través de PDK1. (I.) RalGDS tiene un dominio REM que inhibe su actividad GEF; el  $PIP_3$  formado por las PI3K recluta a PDK1, que al activarse (II.) interacciona con RalGDS liberando su dominio REM y permitiendo su acción GEF. D) Activación por fosforilación: Aurora A, cuya actividad se regula, entre otros, por unión a matriz extracelular, es capaz de fosforilar a Ral en la Serina 194, lo que incrementa la actividad de RalA hasta 6 veces.

Esta fosforilación está asociada a un incremento de hasta 6 veces en los niveles de Ral-GTP (290, 264). Esta fosforilación es capaz de inducir la relocalización de RalA desde la membrana plasmática a vesículas intracelulares (160) y podría estar relacionada con la capacidad transformante de esta GTPasa, de la que hablaremos más adelante. Consistente con la relación entre la fosforilación de Ral y transformación celular, la fosfatasa supresora tumoral PP2A $\beta$  se une y defosforila RalA en los sitios Ser194 y 183 (233). Curiosamente RalB no es un sustrato de Aurora-A. La región de RalA que es fosforilada difiere considerablemente de la de RalB a nivel de secuencia, lo que explica que RalB no sea sustrato de Aurora-A. Ahora bien, recientemente se ha publicado que RalB se fosforila en la S198

por PKC y que esta interacción es importante en el control de la motilidad celular y el crecimiento independiente del anclaje (271).

Otro mecanismo de regulación está relacionado con los receptores de 7 dominios transmembrana acoplados a proteínas G-triméricas (GPCRs). Se ha descrito que la actividad de Ral es importante en la reorganización de citoesqueleto previa a la migración de neutrófilos en respuesta a fMLP (23, 172). En este sistema, la  $\beta$ arrestina-1 mantiene a RalGDS en un estado inactivo en el citoplasma hasta que el receptor de fMLP es estimulado y recluta a  $\beta$ arrestina. En ese momento RalGDS se libera cerca de la membrana y puede activar a Ral. Esta activación de Ral no depende en absoluto de Ras, puesto

que la expresión de dominantes inactivos de Ras no impiden la reorganización de membrana motivada por fMLP <sup>(23)</sup>.

Por último, algunos estudios apuntan a que Ral puede regularse a nivel transcripcional. En células M1 de leucemia mieloide, la estimulación con LIF o IL6 induce activación de la quinasa v-src, que a su vez activa la ruta JAK/STAT3. Se ha demostrado que esta ruta, además de regular elementos relacionados con división celular y anti apoptóticos, como ciclinas D1/D2/D3/A, cdc25A, c-myc, pim-1, bcl-2, y bcl-x, también induce la expresión de RalGDS y un subsiguiente incremento en la actividad de Ral <sup>(236)</sup>.

### **Moléculas efectoras y funciones de las GTPasas Ral:**

Pasamos a continuación a describir las moléculas a través de las cuales Ral efectúa sus funciones. Como veremos, se trata de un conjunto de moléculas efectoras muy diverso que relaciona a Ral con un gran número de procesos celulares.

Una de las primeras moléculas que se identificó que podría mediar los efectos de Ral, especialmente en oncogénesis, fue la fosfolipasa D1, PLD1. Esta enzima hidroliza fosfatidilcolina (PC) generando el ácido fosfatídico (PA), que actúa de segundo mensajero. Su actividad se asocia a numerosos estímulos extracelulares, señales oncogénicas como Src y Ras, formación de fibras de estrés y transporte de vesículas <sup>(170, 232)</sup>. Por ejemplo, el PA producido por la PLD es necesario para la formación de vesículas y el transporte desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi <sup>(84)</sup>. Ral se une a PLD1 de manera constitutiva, independientemente de su estado GDP/GTP, y colabora en la unión de otra GTPasa, Arf, al complejo, que es la que activa a PLD1 <sup>(126, 138, 170)</sup>. Esta interacción ha demostrado ser crítica durante la secreción de gránulos densos de células PC12 <sup>(268)</sup>.

RalBP1 (también RIP1 o RLIP76) fue la primera molécula de la que se describió que

se unía exclusivamente a Ral activo <sup>(44, 208, 130)</sup>. Inicialmente llamó la atención por contener un potencial dominio GAP de cdc42, otra GTPasa monomérica fundamental en la dinámica del citoesqueleto de actina. Aunque no abundan los trabajos que demuestren la funcionalidad de este dominio *in vivo*, parece que la regulación de cdc42 a través de RalBP1 es importante en la dinámica de la actina durante la gastrulación de *Xenopus laevis* <sup>(31)</sup>. De todas maneras, la función principal que se le atribuye a RalBP1 se encuentra en el tráfico vesicular, principalmente en la regulación de la endocitosis <sup>(267)</sup>. RalBP1 interacciona con proteínas como POB1 <sup>(121)</sup> y Repl1 <sup>(193, 292)</sup> que lo vinculan a la endocitosis de receptores de factores de crecimiento. Además RalBP1 también interacciona con la subunidad  $\mu$ 2 del complejo AP2, implicado en la endocitosis mediada por clatrina de proteínas integrales de membrana <sup>(131)</sup>. A modo de curiosidad comentaremos que a RalBP1 también se le atribuyen funciones de transportador al medio extracelular de compuestos conjugados a glutatión <sup>(12)</sup>. Este hecho se ha relacionado con algunas resistencias a drogas quimioterapéuticas, por ejemplo en cáncer de hígado <sup>(243)</sup>, lo que ha convertido a RalBP1 en una potencial diana en el tratamiento del cáncer <sup>(11)</sup>.

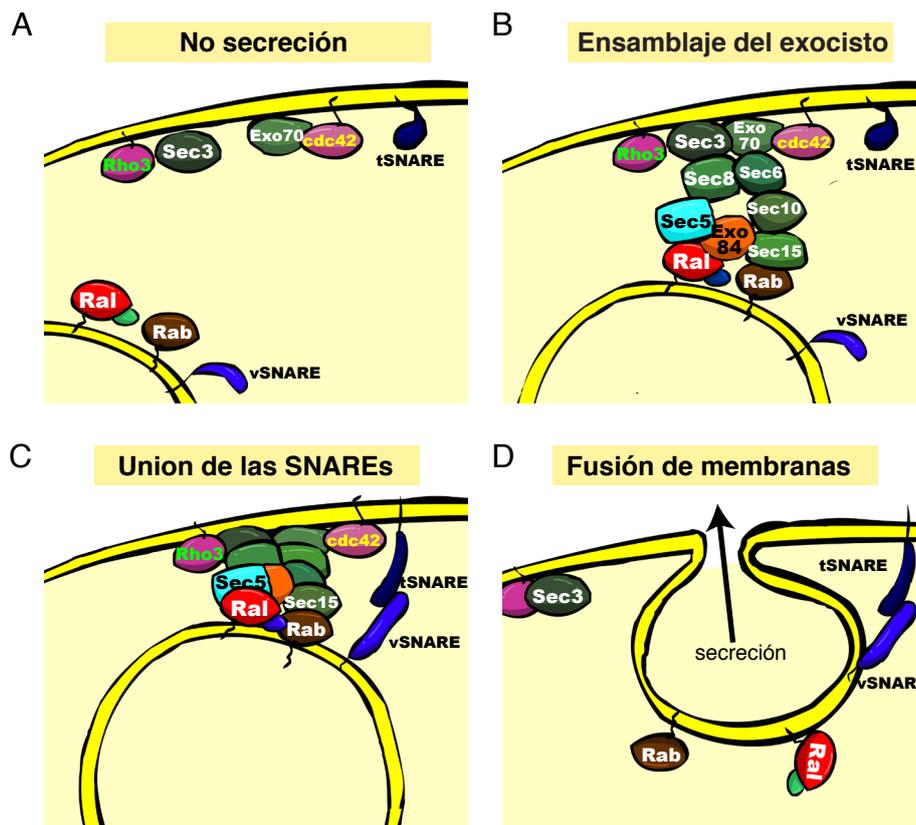
Ral ha demostrado ser también un importante regulador de la expresión génica durante la proliferación o en respuesta a factores de crecimiento. Una molécula que podría mediar estos efectos es ZONAB, un factor de transcripción que regula, entre otros, el proto-oncogen Erb-2 <sup>(16)</sup> que se ha demostrado que regula CDK4 y por tanto el ciclo celular <sup>(15)</sup>. De hecho, la reducción de los niveles de ZONAB retrasan el paso de fase G1 a S <sup>(15)</sup>. Se asocia a ZO-1, una proteína que interacciona con las uniones oclusivas en condiciones de alta densidad celular, o se encuentra en el núcleo junto a ZONAB cuando no se establecen uniones intercelulares <sup>(104)</sup>. Mientras está asociado a las uniones oclusivas, es decir, en situación en que se favorece la inhibición por contacto de la proliferación, ZO-1 retiene a ZONAB en el citoplasma evitando su actividad transcripcional. Por lo tanto, la función de ZONAB consiste en inducir genes proliferativos



e inhibir la diferenciación en condiciones de baja densidad celular <sup>(37, 162)</sup>. La actividad de Ral es en parte el responsable de esto. RalA interacciona con ZONAB al formarse las uniones oclusivas, y lo libera cuando la densidad celular es baja <sup>(91)</sup>, permitiendo la expresión de los factores de transcripción regulados por ZONAB. Éste último no es el único factor de transcripción regulado por Ral; aunque no interaccionan directamente con Ral activo, se ha demostrado, por ejemplo que c-fos podría estar regulado por Ral en respuesta a factores de crecimiento. La actividad de c-fos es mayor cuando Ral activo colabora con la ruta de MAPK <sup>(285)</sup>. Ahora bien, la actividad de Ral sí ha demostrado ser suficiente para la inducción de los promotores de NFκB y ciclina D1 en fibroblastos de ratón <sup>(83, 114)</sup>.

Otra proteína que ha demostrado ser efectora de Ral es la filamina, una proteína que contribuye al entrecruzamiento de las fibras de actina. Se ha demostrado que RalA-GTP es capaz de unirse a filamina y de inducir formación de filopodios en células NIH-3T3 <sup>(198)</sup>.

Finalmente hablaremos del efector de Ral más extensamente estudiado, el complejo del exocisto. Se trata de un complejo heterooctamérico que en mamíferos consta de las subunidades Exo70, Exo84, Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10 y Sec15 <sup>(56)</sup>, y principalmente regula el transporte polarizado de vesículas a membranas diana. Este complejo y sus funciones se habían estudiado previamente en levaduras <sup>(259)</sup>; en *Saccharomyces*



**Figura 15:**

Modelo de ensamblaje del exocisto durante la secreción polarizada:

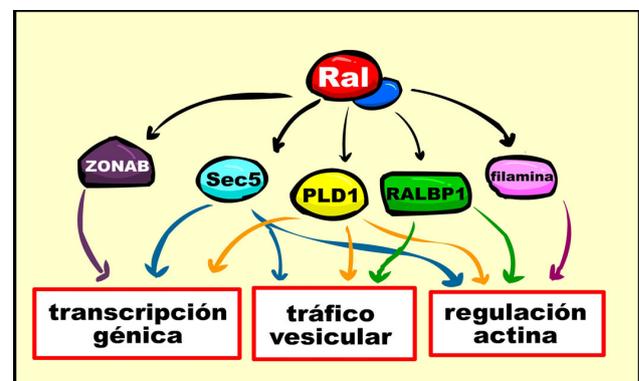
(A) Estado de reposo en el que no se produce secreción: Encontramos a Ral en su estado GDP (inactivo), y por tanto es incapaz de unirse a ninguna de las subunidades del exocisto. Las GTPasas pequeñas Rho3 y cdc42 mantienen en la membrana plasmática a Sec3 y Exo70, respectivamente. (B) Ensamblaje del exocisto: Cuando Ral es activado y se encuentra en su estado unido a GTP recluta y se une a Sec5 y Exo84, favoreciendo así el ensamblaje del exocisto. Algunas proteínas Rab también contribuyen a este proceso uniéndose a Sec15 desde la membrana de la vesícula. (C) La formación del exocisto favorecería la interacción entre t y v-SNAREs, lo que facilita el anclaje de la vesícula a la membrana diana. (D) Tras el anclaje se produce la fusión de membranas y la secreción del contenido de la vesícula.

*cerevisiae* se describió un complejo de ocho proteínas de tamaño entre 70 y 144KDa que aparecía durante la gemación. Más tarde se comprobó que este complejo regula el transporte de vesículas a la gema en formación, el sitio de exocitosis más activo en levaduras, por lo que se denominó al complejo exocisto <sup>(258)</sup>. Este complejo ha demostrado ser esencial en el transporte polarizado de vesículas y la exocitosis en numerosos sistemas, que comprenden desde la secreción específica al compartimento basolateral en epitelios polarizados <sup>(187)</sup> a neurosecreción <sup>(274)</sup> y secreción de gránulos densos en plaquetas <sup>(135)</sup>, pasando por la formación de filopodios <sup>(251)</sup>, lamelipodios <sup>(229)</sup> e incluso el surco de división durante mitosis <sup>(56)</sup>. Estos últimos procesos parecen requerir la acción del exocisto para proporcionar membrana a lugares muy específicos. La función del exocisto resulta tan esencial que la eliminación de alguna de sus subunidades desemboca en letalidad embrionaria <sup>(96, 6)</sup>. Las diferentes subunidades del complejo se encuentran en distintos compartimentos celulares que varían según el tipo celular, aunque algunas subunidades, como Sec3 o Exo70 siempre se encuentran asociadas a la membrana plasmática <sup>(44, 109)</sup>. El resto de subunidades pueden encontrarse solas o en hemicomplejos, dispersas por el citoplasma, alrededor del aparato de Golgi, o en la vesícula que debe ser secretada <sup>(44)</sup>. Cuando se requiere la función del exocisto, las diferentes subunidades se ensamblan formando el holocomplejo funcional que actúa como un parche entre la vesícula y la membrana diana; este ensamblaje se regula por diversas GTP-asas pequeñas de las familias Rho, Rab y Ral (**Figura 15**); por ejemplo, Rho3 y cdc42 interactúan con Sec3 y Exo70 en la membrana diana, mientras que Sec4p, de la familia Rab regula la localización del complejo desde la vesícula transportada <sup>(196)</sup>. Estudios en levaduras demuestran que Sec4 se asocia a moléculas del tipo SNARE, como Sro7 <sup>(107)</sup>. Los complejos SNARE actúan de puentes entre compartimentos específicos y son imprescindibles para el anclaje de vesículas <sup>(254, 125)</sup>, por lo que se propuso que una de las funciones del exocisto podría ser ayudar a localizar las vesículas y facilitar la interacción

entre SNAREs <sup>(289)</sup>.

Centrándonos en la regulación que Ral ejerce sobre el exocisto, ésta parece tener que ver con el ensamblaje de este complejo. Por ensayos de doble-híbrido se comprobó que en células de mamífero la forma activa de Ral se unía a dos de sus subunidades, Sec5 <sup>(187)</sup> y Exo84 <sup>(188)</sup> (**Fig 15**). Esta interacción resulta esencial, puesto que la inhibición de Ral impide que el ensamblaje del complejo ocurra correctamente <sup>(187)</sup>. De hecho, las funciones que hemos mencionado que se atribuyen al exocisto se ven seriamente afectadas cuando se bloquea la unión entre Ral y Sec5. Existe cierta controversia sobre si la unión de Ral a Exo84 y Sec5 es simultánea o no. Algunos trabajos muestran que los motivos de unión a Ral de Exo84 y Sec5 podrían ser parcialmente solapantes <sup>(128)</sup>, por lo que la interacción simultánea no sería probable, aunque existen autores que argumentan todo lo contrario <sup>(188)</sup>.

En la **Figura 16** mostramos un diagrama que resume los principales efectores de las GTPasas Ral y las funciones generales con los que han sido relacionados. Aunque las diversas funciones celulares de Ral se han dejado entrever mientras comentábamos sus rutas efectoras, las resumiremos a continuación. A través de su regulación de PLD1, Sec5 y ZONAB Ral es capaz de regular transcripción génica. Gracias también a Sec5, PLD1 y RALBP1 Ral controla también funciones relacionadas con el tráfico



**Figura 16:**

Principales efectores de Ral y sus funciones:

En la figura mostramos los efectores y funciones más comúnmente aceptados para RalA y RalB. El código de colores de las flechas indica las funciones específicas de cada molécula efectora.



vesicular, como endocitosis y exocitosis. Por otro lado, todas las rutas efectoras de Ral excepto ZONAB han sido relacionadas con la regulación del citoesqueleto de actina. Además de estas tres funciones generales, Ral ha demostrado también ser esencial en migración celular en diferentes sistemas. Por ejemplo, alteraciones en Ral afectan a la respuesta a quimioatrayentes como fMLP en células polimorfonucleares <sup>(23)</sup>; Ral también controla la generación de filopodios en respuesta a TNF $\alpha$  y IL-1 <sup>(250)</sup>. Además resulta esencial en la migración de mioblastos esqueléticos de ratón <sup>(251)</sup>, de células epiteliales del ovario de *Drosophila melanogaster* <sup>(155)</sup>, y de fibroblastos en respuesta a daño tisular <sup>(229, 256)</sup>.

Ahora bien, la función de las GTP-asas Ral que durante años ha sido sujeto de un mayor número de estudios es su regulación de los mecanismos oncogénicos, tal y como describimos a continuación.

### **Ras, Ral y cáncer:**

Cuando se descubrió que la ruta de los RalGEF era efectora directa de Ras activo <sup>(3, 117, 283, 245)</sup> se produjo un gran revuelo, al haber identificado un nuevo elemento que podría mediar los efectos de Ras, una molécula que está mutada en un 30% de los cánceres humanos. De hecho, la importancia clínica del descubrimiento se puso de manifiesto al comprobar que de las tres rutas efectoras de Ras (junto a Raf/MAPK y PI3K), la activación selectiva de los RalGEF es suficiente para inducir transformación oncogénica en células humanas <sup>(110, 159)</sup>. En células de origen murino la única ruta imprescindible en transformación es la de Raf/MAPK, pero la activación de RalGEF potencia intensamente la capacidad oncogénica de Raf <sup>(110)</sup>.

Existen diversas explicaciones de cómo Ral podría contribuir a la transformación celular. De manera general, como hemos visto antes, Ral influye en la expresión y activación de numerosas proteínas cuya desregulación puede desembocar en la aparición de tumores, como c-fos, NF $\kappa$ B o ciclina D1. Además, v-Ras y v-Src inducen la

expresión del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA) y metaloproteasas (MMPs), al parecer a través de Ral y PLD <sup>(2)</sup>. Esto resulta de gran relevancia en cáncer, ya que ambos tipos de proteasas son necesarias para la degradación de la matriz extracelular y la invasión.

A pesar de la gran similitud en secuencia entre las dos isoformas de Ral, éstas no siempre tienen funciones solapantes en el desarrollo del cáncer, sino que parecen controlar etapas diferentes de la transformación oncogénica. RalA ha demostrado ser necesario en las primeras fases de la transformación celular <sup>(159)</sup> y en la proliferación de células tumorales, concretamente de aquellas que han perdido la dependencia del anclaje a la matriz y son capaces de crecer en suspensión <sup>(41, 58, 161)</sup>. Se ha propuesto que esto podría deberse a Aurora A; esta quinasa está relacionada con el anclaje a la matriz, por lo que su actividad desregulada podría emitir una falsa señal de anclaje que además sobreactivase RalA <sup>(290)</sup>. Además parece que RalA podría regular la menor expresión de fibronectina y el incremento en el receptor de hialuronano CD44 asociados a transformación oncogénica de NIH-3T3 <sup>(150)</sup>.

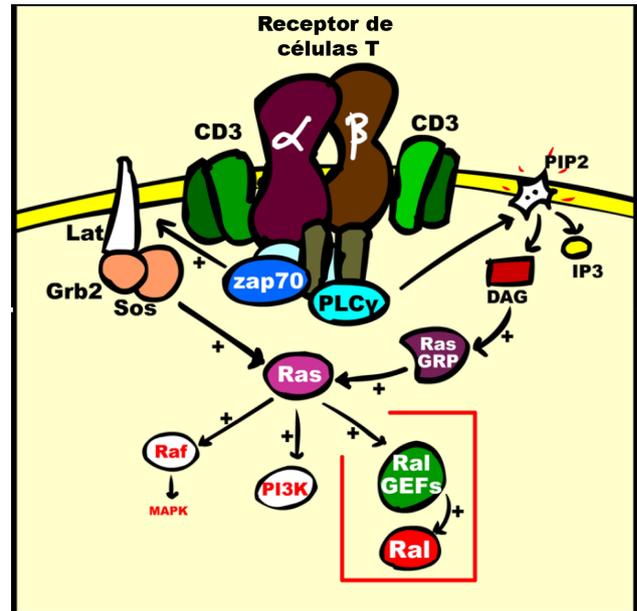
El papel de RalB, por el contrario, está relacionado con procesos distintos dentro del desarrollo del cáncer. En primer lugar, RalB regula la supervivencia de las células tumorales <sup>(58)</sup> y, a diferencia de RalA, es necesario para la migración metastática de estas células <sup>(161, 204)</sup>. RalB regula la supervivencia celular y la apoptosis a través de un complejo entre RalB/Sec5 y TBK1/NAK (Tank Binding Kinase 1/NF $\kappa$ B activating Kinase), que controla la supervivencia celular vía IRF3 <sup>(57)</sup>. Ral A no parece ser capaz de formar este complejo. TBK1/NAK también es necesario para la expresión de citoquinas y enzimas que inducen remodelación del tejido, por lo que RalB podría ser uno de los tan buscados nexos entre inflamación y cáncer <sup>(174)</sup>.

En resumen, la ruta de Ral es esencial en la transducción de señales relacionada con Ras y la mediación de los efectos de ésta en cáncer.

**Ras, Ral y el Sistema Inmune**

En vista de la relevancia de Ral al transducir señales transmitidas por Ras pensamos que Ral probablemente tenga también una gran importancia en el sistema inmune y en concreto en los linfocitos T. La razón de esto es que en el sistema inmunitario Ras es imprescindible para la función de las células B <sup>(112)</sup> y T. En linfocitos T las primeras fases de la maduración en el timo, especialmente la selección positiva <sup>(71, 253, 281)</sup> están reguladas por esta GTPasa, aunque los modelos recientes implican también a la señalización por Ras en la selección negativa <sup>(65, 215)</sup>. En linfocitos periféricos Ras es imprescindible para la expresión de IL2 en linfocitos periféricos, y por tanto para su proliferación <sup>(17)</sup>. Se ha demostrado además que la inhibición de Ras correlaciona con la aparición de linfocitos T anérgicos <sup>(89)</sup>. Hasta el momento muchas de funciones mediadas por Ras han sido atribuidas a la ruta de las proteín-quinasas activadas por mitógeno (MAPK) <sup>(92)</sup> o a las fosfoinosítido 3-quinasas (PI3K) <sup>(125, 199)</sup>. Por ejemplo, los ratones deficientes en ERK1 recapitulan los defectos en selección positiva observados con la introducción de la variante inactiva de H-Ras en linfocitos T <sup>(203, 251)</sup>. No obstante el papel de la ruta Ras-RalGEF en el sistema inmune y los linfocitos T continúa siendo una incógnita (**Figura 17**). Sin embargo existen algunos indicios que nos llevan a pensar que las GTPasas Ral pueden tener un papel relevante en la biología linfoide. Para empezar no todos los efectos de Ras en expresión génica y activación de los linfocitos T se pueden explicar por la vía de MAPK: En linfocitos T CD4 estimulados con péptido, la activación constitutiva de Ras puede inducir expresión de marcadores de activación y síntesis de citoquinas, de manera independiente de Raf <sup>(64)</sup>. También apoya la existencia de vías alternativas a Raf/ERK el hecho de que el anticuerpo OX-35, estimulador de la subunidad Cd3ε del TCR, sea capaz de inducir la producción de IL2 de manera independiente de la vía de MAPK <sup>(151)</sup>.

Las publicaciones que relacionan a Ral



**Figura 17:** Posible función de Ral en la transducción de señales del TCR mediadas por Ras:

En la figura resumimos las diversas rutas de señalización que se originan en el TCR que llevan a la activación de la GTPasa Ras. De las rutas efectoras de Ras se ha estudiado en profundidad el papel en sistema inmune y activación linfocitaria de la ruta Raf-MAPK, y también, aunque en menor grado, de PI3K. Sin embargo, la contribución de la vía RalGEF/Ral a la activación de los linfocitos T es casi por completo desconocida. El estudio de esta contribución es parte del interés de esta tesis doctoral.

y el sistema inmune son escasas; en relación con el tema que nos ocupa, la activación de los linfocitos T, quizá una de las más significativas sea, paradójicamente, la que describe ciertos experimentos realizados en células B. De manera análoga a las células T, Ras controla tanto el desarrollo y maduración de los linfocitos B <sup>(122, 191)</sup>, como su proliferación tras estimular el BCR <sup>(63)</sup>; recientemente se ha descrito que Ral se activa en las líneas B DT40 y RAMOS en respuesta a la estimulación del BCR con anticuerpos contra IgM, y que esta activación es en gran medida dependiente de Ras <sup>(69)</sup>. En estas condiciones, el bloqueo de la actividad de Ral reduce la expresión de NFAT, c-fos y c-jun, con lo que podría derivar en una activación defectuosa de estas células. En estos experimentos se pone de manifiesto, además, la relevancia que puede tener la ruta de



PLC $\gamma$ 2-DAG-RasGRP-Ras y los incrementos en la concentración de calcio a la hora de activar Ral.

Otra indicación de que Ral puede tener relevancia en activación linfocitaria es el hecho de que una variante truncada de Rgr, un RalGEF con alta identidad con RalGDS, aparece en numerosas líneas de linfoma T, así como en muestras de pacientes con estas patologías <sup>(156)</sup>. Al examinar los timos de ratones que sobre-expresan Rgr en linfocitos T se observa un bloqueo en selección positiva y un fenotipo muy activado de los linfocitos que llegan a diferenciarse <sup>(127)</sup>. Esta variante carece del dominio C-terminal, con lo que no está sujeta a la regulación por Ras ni al control de su dominio inhibitorio REM, que también se encuentra en esta región.

### **La citotoxicidad celular:**

Una de las características principales de la respuesta inmune adquirida mediada por linfocitos T es su direccionalidad y polarización. Es necesario que la respuesta de estas células se limite a la zona de contacto entre la célula T efectora y la célula presentadora o diana, con el fin de conseguir una respuesta específica y efectiva. De esta manera se minimizan los efectos colaterales sobre las células vecinas; en resumen, se trata de una respuesta altamente polarizada. Aunque la polarización de la respuesta efectora se observa tanto en la secreción de citoquinas por células CD4<sup>+</sup> como en la secreción de factores líticos por células CD8<sup>+</sup> <sup>(119)</sup>, es en este último proceso donde los mecanismos de la direccionalidad de la secreción se han estudiado en mayor profundidad.

La citotoxicidad celular está mediada por las células T citotóxicas (de ahora en adelante CTLs) y las células natural killer (NK), que constituyen una defensa fundamental contra infecciones virales y contra la aparición de células tumorales <sup>(26, 263)</sup>. Ambos tipos celulares tienen sistemas para reconocer células que requieren ser eliminadas, unirse a ellas e inducir su destrucción. Esto lo hacen a través de dos mecanismos diferentes; en primer lugar, mediante la expresión de las moléculas de la familia TNF FasL (CD178) <sup>(244, 270)</sup> y TRAIL <sup>(52, 282)</sup>, que son reconocidos por los llamados receptores de muerte en la célula a eliminar. Estos receptores son Fas <sup>(53, 296)</sup> y TRAIL-R1 y TRAIL-R2 <sup>(207, 269)</sup> respectivamente, y su estimulación inicia programas apoptóticos al reclutar, a través de dominios FADD (*Fas Associated Death Domain*), el complejo DISC, que actúa sobre pro-caspasa 8 y desencadena la muerte celular <sup>(157)</sup>. El otro mecanismo por el cual los linfocitos pueden eliminar células consiste en la secreción de gránulos líticos que inducen la muerte de la célula diana. Nuestro trabajo se centra principalmente en este último mecanismo. Introduciremos brevemente las células especializadas en este proceso, describiremos cómo se desarrollan la secreción de los gránulos

y finalmente plantearemos los argumentos para un posible papel de Ral en este proceso.

### **Linfocitos T citotóxicos y células Natural Killer:**

Los linfocitos T citotóxicos son linfocitos CD8<sup>+</sup> diferenciados que identifican específicamente a sus dianas mediante su TCR. Éste reconoce un péptido específico presentado en la célula diana en contexto del MHC de clase I <sup>(22, 216)</sup>. Los linfocitos T adquieren esta especificidad contra antígenos ajenos al organismo durante su maduración; cada una de estas células sufre recombinación somática de los genes que codifican sus receptores (recombinación VDJ) <sup>(145, 197, 235)</sup>, adquiriendo en última instancia un receptor único que reconoce específicamente un péptido presentado en una molécula de MHC. El hecho de que cada célula reordene independientemente los genes que codifican su TCR confiere una enorme diversidad al conjunto de células T a la hora de reconocer antígenos. Solamente prosperan las células capaces de reconocer un péptido en contexto de MHC de clase I, en un proceso que se conoce como selección positiva <sup>(242)</sup>. Es importante además evitar que estas células se activen en respuesta a la presentación de antígenos propios, por lo que en el proceso denominado selección negativa se eliminan las células autorreactivas <sup>(224)</sup>.

Las células NK sin embargo, no poseen un receptor específico ni reorganizan los genes de sus receptores para aumentar su variabilidad <sup>(190)</sup>; en realidad, más bien su actividad responde a un balance entre señales que inhiben citotoxicidad y otras que la inducen <sup>(99)</sup>. Un ejemplo de receptores inhibitorios serían los que reconocen MHC de clase I, como las familias de CD94/NKG2A, KIR (presente sólo en humanos) o la de Ly49 (presente sólo en ratones) <sup>(99)</sup>. Las células infectadas por virus o las células tumorales frecuentemente disminuyen su expresión de MHC-I en membrana <sup>(165)</sup>; ante una célula de este tipo, una célula NK recibiría una señal inhibitoria menor y el equilibrio de señales se

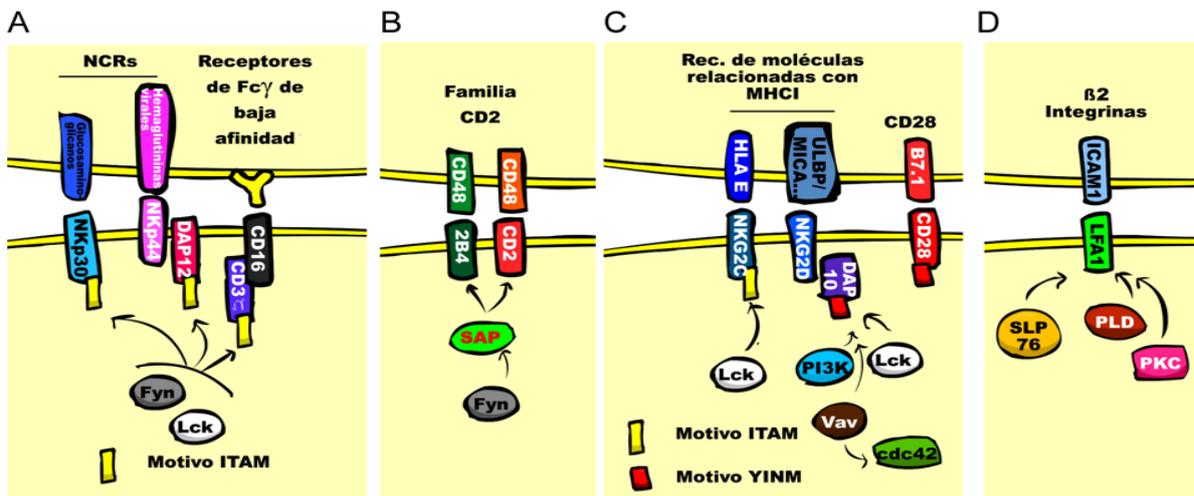


desplazaría hacia la eliminación de esta célula. Además existen toda una serie de receptores activadores o de combinaciones de receptores que inducen citotoxicidad. Estos suelen reconocer elementos que se expresan tras la infección de ciertos virus, como Ly49H, que reconoce un péptido de citomegalovirus <sup>(7)</sup>. Otros reconocen elementos que se expresan ectópicamente o en mayor medida de lo normal, como las familias de NKG2D, NKP46, NKp44 o NKp30 <sup>(186)</sup>. También existen receptores, como el receptor de baja afinidad de IgG FcγRIIIA, o CD16, que reconoce células recubiertas de anticuerpos, lo que las identifica como células que requieren ser eliminadas <sup>(59, 36)</sup>. Además de los receptores que se consideran activadores, algunas moléculas de superficie generalmente consideradas de adhesión (como la αβ2 integrina LFA-1) o de coestimulación (como 2B4 o CD28) también pueden desencadenar citotoxicidad <sup>(19, 36, 54)</sup>. Se ha demostrado que la ausencia de LFA-1 lleva a severos defectos en este proceso que incluso se han asociado con inmunodeficiencias <sup>(67, 142)</sup>.

**La sinapsis inmunológica:**

Pese a lo diferentes que pudieran parecer los mecanismos de activación de un CTL o de una célula NK, la maquinaria que lleva a la eliminación de la célula diana es muy parecida en ambos tipos celulares <sup>(158)</sup>. Al contactar, se establece un macrocomplejo señalizador denominado sinapsis inmunológica, que pone en marcha los mecanismos intracelulares que llevan a la eliminación de la diana. En CTLs la estimulación del TCR provoca la fosforilación en tirosinas de unos motivos llamados ITAM (*Inmunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*), que reclutan una serie de moléculas señalizadoras que incluye quinasas como ZAP70 e Itk y de la familia Src como Lck, <sup>(276)</sup> adaptadoras como LAT o SLP76 <sup>(231)</sup> y GEFs como SOS <sup>(178)</sup>, RasGRP <sup>(80)</sup> y Vav <sup>(1, 276)</sup>. Además, se acumula Cdc42 activa y se inicia polimerización de actina vía WASP (*Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*), que estabiliza la propia sinapsis <sup>(25)</sup>.

La maquinaria de las células NK es mucho más variada, pero concluye en la activación de



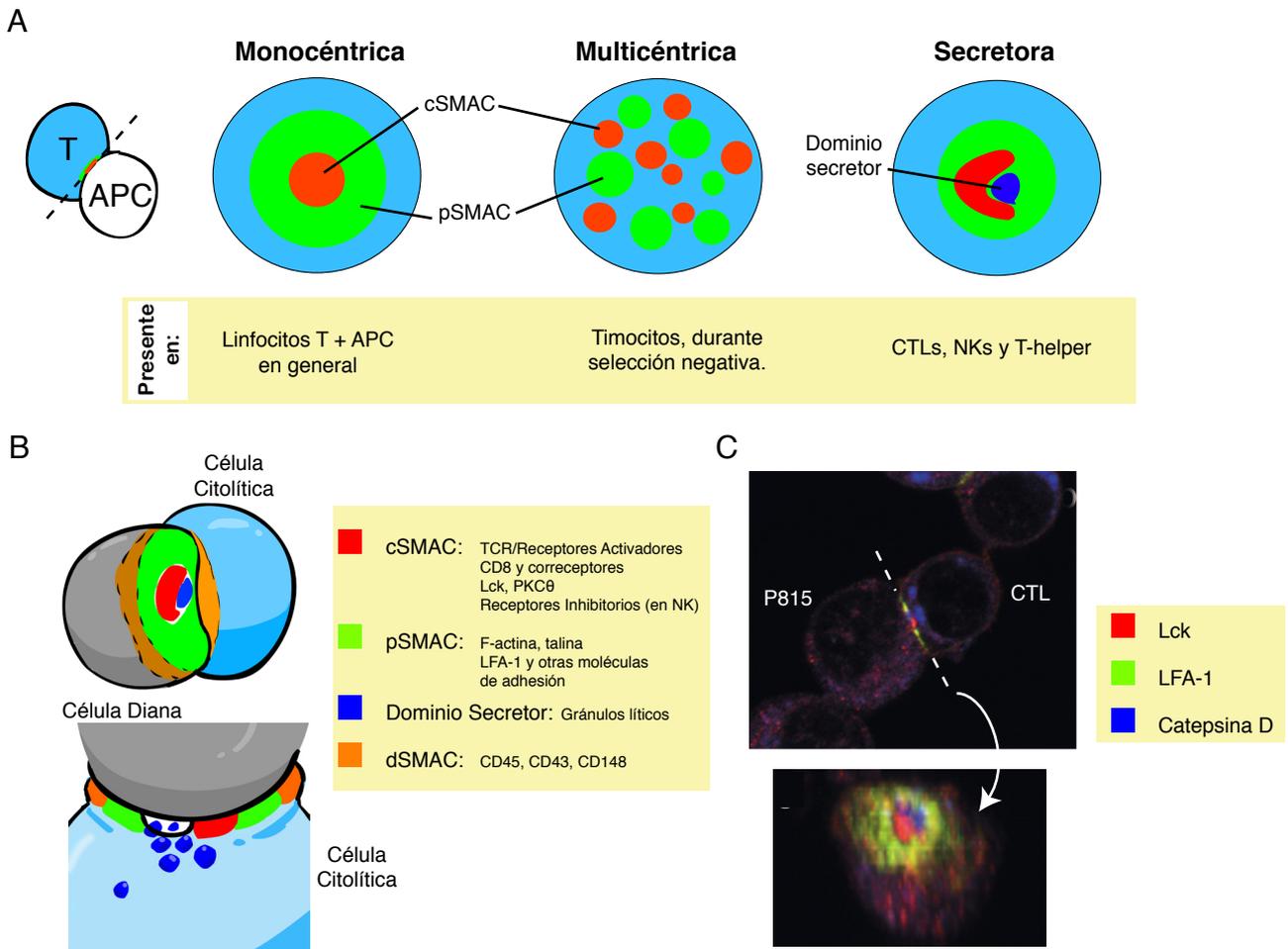
**Figura 18:** Receptores activadores de células NK humanas y cómo inician su transducción de señales: La figura recapitula algunos miembros de las familias más importantes de receptores activadores de las células NK. A) Miembros de las familias de NCR (por *Natural Cytotoxicity Receptor*) y CD16, que o bien contienen ITAMs propios o se asocian con moléculas que los tienen, por lo que pueden señalizar a través de Lck o Fyn. B) Las moléculas de la familia CD2 como 2B4 o CD2, cuando se unen a sus ligandos, reclutan a SAP (*Slam Associated Protein*), que a su vez atrae a Fyn. C) Receptores de moléculas relacionadas con el MHC. NKG2C contiene motivos ITAM, mientras que NKG2D se asocia a Dap10, que al igual que CD28, contiene un motivo YINM que se fosforila en tirosinas y señaliza a través de Lck y PI3K. D) La β2 integrina LFA-1 es capaz de señalizar a través de SLP76, PKC, PLD y Ras, aunque los detalles moleculares permanecen oscuros.

las mismas moléculas (**Figura 18**). Algunas moléculas receptoras como CD16 se asocian a elementos que contienen motivos ITAM, como CD3 $\zeta$ . Otras moléculas, como DAP12, se asocian a otros receptores activadores de NKs y cuentan con sus propios dominios ITAM <sup>(79)</sup>. Por otro lado, receptores de la familia SLAM como 2B4 acaban reclutando proteínas de la familia Src como Fyn a través de SAP, que además también parece inducir aumentos en la actividad de cdc42 a través de PAK <sup>(108)</sup>. La relevancia de SAP es en células NK enorme, ya que deficiencias en esta proteína desencadenan inmunodeficiencias muy severas como XLP (*X-linked proliferative syndrome*) <sup>(153, 194)</sup>. El receptor NKG2D por su parte se asocia con DAP10, que cuenta con un motivo YINM similar al de CD28, por el que se recluta a PI3K y Lck <sup>(79)</sup>. Vemos pues, que el abanico de moléculas de señalización que se ponen en marcha tras la activación de receptores activadores de células NK es similar al de las células T cuando se estimula el TCR <sup>(59)</sup>. Por el contrario, los receptores inhibitorios de las células NK, suelen contar con dominios V/IxYxxL, o ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif*), que al fosforilarse reclutan la fosfatasa SHP-1, que contribuye a inactivar la respuesta <sup>(39)</sup>. Así pues, lo que en suma acaba determinando si un estímulo es activador o represor de la citotoxicidad en una célula NK, no deja de ser un balance entre reclutamiento de quinasas y fosfatasa <sup>(79)</sup>. En la **Figura 18** resumimos las rutas de señalización que se ponen en marcha en las células NK <sup>(59)</sup>.

Se han observado diversas organizaciones de las sinapsis inmunológicas según el tipo de células que estén interaccionando y según su función. Existen sinapsis relativamente poco organizadas y con múltiples centros de señalización, como parece ser el caso de los timocitos durante la selección negativa <sup>(222)</sup>, pero por lo general suelen mostrar una agrupación y segregación muy definidas de receptores, moléculas de adhesión y proteínas señalizadoras. La sinapsis inmunológica de las células líticas es una estructura que define una zona muy específica donde los gránulos serán secretados

<sup>(177)</sup>. Ésta está organizada de la siguiente manera, común para células NK y CTLs: el receptor de antígeno, moléculas asociadas como CD28 <sup>(5)</sup> y CTLA4 <sup>(81)</sup>, correceptores <sup>(147)</sup> como CD8 en el caso de los CTLs, y los receptores activadores en el caso de las células NK, forman el cSMAC (*central supramolecular activation cluster*), aproximadamente en el centro de la sinapsis. Asociadas a esta estructura encontramos moléculas señalizadoras como Lck y PKC $\theta$  <sup>(247)</sup>. Es importante señalar que los receptores inhibitorios en las células NK también forman un cSMAC <sup>(79)</sup>. Alrededor del cSMAC se forma un anillo de actina cortical, talina y moléculas de adhesión, entre ellas LFA-1. Esta región se denomina pSMAC (*peripheral supramolecular activation cluster*) <sup>(182)</sup>. Finalmente, se habla de un dSMAC, que constituye el lamelipodio que contacta con la célula diana. Está definido por una región rica en CD45 <sup>(94)</sup>, una familia de fosfatasa <sup>(134)</sup> esenciales en la regulación de la señal del TCR <sup>(144)</sup>. En esta región también se ha descrito la presencia de otra familia de fosfatasa, CD148, y de la sialoforina CD43 <sup>(73, 163)</sup>.

Hasta este punto, la sinapsis de las células líticas es similar a la de una célula CD4<sup>+</sup>. Sin embargo existen diferencias muy notables (**Figura 19**); la sinapsis de células líticas, aparte de los cSMAC y pSMAC, presenta un espacio muy restringido libre de actina que permite el acceso de los gránulos a la membrana celular, en el llamado dominio de secreción. En este punto se forman puentes entre la membrana de la célula diana y la citotóxica, formando una hendidura entre las dos. Es aquí específicamente donde se secreta el contenido lítico <sup>(33, 247)</sup>. Además de esta gran diferencia con la sinapsis de una célula no lítica, a los CTLs y a las células NK les basta un contacto relativamente transitorio (menos de 20 minutos) para secretar su contenido y eliminar a sus dianas, mientras que una célula CD4<sup>+</sup> puede mantener sus contactos durante 24 horas <sup>(216)</sup>.



**Figura 19:**

La sinapsis inmunológica de células citolíticas:

A) Tipos de sinapsis inmunológica según su organización. Las sinapsis muestran regiones claramente diferenciadas que se han denominado SMACs (por *Supramolecular Activation Cluster*). En rojo mostramos el SMAC central o cSMAC, mientras que en verde mostramos el SMAC periférico o pSMAC. En azul oscuro se muestra el dominio secretor de las células líticas. La parte inferior del apartado indica el tipo de células que realizan cada tipo de sinapsis. B) Estructura y composición de la sinapsis citolítica. En este tipo de sinapsis, el SMAC periférico, o pSMAC, mantiene una zona libre de actina entre esta región y el SMAC central o cSMAC. En esta región tan específica, llamada dominio secretorio, es donde se concentran y anclan los gránulos líticos para ser secretados. El recuadro muestra las moléculas asociadas a cada una de las regiones que compone este tipo de sinapsis. C) Imágenes de inmunofluorescencia donde se muestra una sinapsis lítica; se observa los gránulos líticos, en azul, concentrarse y secretarse en un espacio muy concreto definido entre el cSMAC, marcado con anticuerpo contra Lck, y el pSMAC, marcado con anticuerpos contra LFA-1. El detalle de debajo es una reconstrucción del plano definido entre la célula citolítica y su diana. Imágenes de microscopía confocal de <sup>(247)</sup>.

### Los Gránulos Líticos:

Pasamos ahora a describir los mecanismos por los cuales los gránulos líticos inducen la muerte de la célula diana. La citotoxicidad mediada por gránulos es un proceso complejo, que requiere el encadenamiento de una serie de eventos cuyo fin último es liberar el contenido de estos gránulos

en el lugar donde la célula lítica y la diana están contactando. Estas vesículas electrondensas, de entre 700nm a 5 $\mu$ m, en realidad son lisosomas especializados, que además de su función en tráfico celular y degradación de proteínas, son capaces de secretar su contenido <sup>(38, 248)</sup>. De hecho, en la membrana que los delimita se pueden detectar marcadores lisosomales, como la

proteína asociada a la membrana lisosomal 1 y 2 (Lamp1 y 2) y CD63<sup>(212)</sup>. CTLs y NKs no son los únicos tipos celulares con lisosomas modificados, mastocitos y eosinófilos también tienen lisosomas secretores<sup>(29, 210)</sup>. Otros tipos celulares, como las células endoteliales y melanocitos, contienen gránulos que comparten biogénesis con lisosomas, los cuerpos densos de Weibel-Palade y los melanosomas, respectivamente<sup>(72)</sup>. Sin embargo en estos dos casos, estos cuerpos relacionados con los lisosomas no los llegan a sustituir funcionalmente, sino que presentan funciones específicas. Lo que convierte en característico a los gránulos líticos es su contenido, un compendio de elementos que inducen la muerte en la célula diana con una rapidez sorprendente, pero que permanecen inactivos mientras están en el gránulo. Uno de los primeros elementos que se identificó en este cóctel letal es la citolisina o perforina, una proteína con homología con el componente C9 del complemento<sup>(238)</sup> que al igual que éste, actúa ensamblándose entre sí y formando poros en la célula diana. Las células citolíticas sin perforina son incapaces de eliminar a sus dianas<sup>(90)</sup>. Inicialmente se pensaba que estos poros alteraban la permeabilidad de la célula diana e inducían su necrosis<sup>(113)</sup>; sin embargo, las células diana mueren muy rápidamente y

se observa fragmentación de su DNA, signo de que algún elemento de los gránulos está induciendo apoptosis. En realidad la función de la perforina, pese a que sigue siendo motivo de controversia, parece que consiste en facilitar la entrada en la célula diana de unas serín esterases, las granzimas; éstas proteolizan gran cantidad de elementos de la célula a eliminar, por ejemplo de la ruta de las caspasas, a las que activan e inducen así apoptosis<sup>(192)</sup>. Algunos experimentos apuntan a que los granzimas se unen al receptor de Manosa-6-fosfato (MPR)<sup>(189)</sup>, son endocitados y la perforina distorsiona la membrana endosomal<sup>(97)</sup>, de manera que las granzimas son liberadas en la célula diana. Existen muchos tipos de estas serín-esterasas en los gránulos líticos (A, B, C, D, E, F, G, H, K y M) con diferentes dianas. Granzima B, por ejemplo, activa la ruta de las caspasas actuando sobre Caspasa 3<sup>(66)</sup> y la DNasa activada por caspasa (CAD), aunque también degrada la matriz nuclear de lamina y elimina sensores PARP de daño al DNA<sup>(158)</sup>. Granzima A, por su parte, además de proteolizar lamina e Histona H1, parece provocar cortes en una de las cadenas del DNA. Existen otros otros componentes característicos de estos gránulos, que resumimos en la **Tabla 1**:

<b>Perforina</b>	Distorsiona la membrana de la célula diana y permite la acción de las granzimas <sup>(90, 238, 113)</sup> .
<b>Granzimas (A, B, C, D, E, F, G, H, K y M)</b>	Serín-Esterasas que proteolizan numerosos elementos de la célula diana, incluyendo elementos de la vía de las caspasas. <sup>(192, 97, 158, 189)</sup>
<b>Granulisina</b>	Enzima citolítica frente a tumores y bacterias, pero cuyo mecanismo aún está por esclarecer <sup>(146)</sup> .
<b>Calreticulina</b>	Une calcio e inactiva la perforina, evitando autólisis <sup>(78)</sup> .
<b>Catepsina B</b>	Degrada la perforina desde la membrana de la célula citotóxica, protegiéndola de la autólisis <sup>(14)</sup> .
<b>FLIP</b>	De <i>Fas associated death domain Like interleukin1β converting Inhibitory Protein</i> , evita la apoptosis inducida por receptores de muerte interaccionando por ejemplo con Fas-L. Impide la muerte de la célula lítica <sup>(134)</sup> .
<b>Serpinas</b>	Inhibidores de proteasas que inhiben la acción de las granzimas <sup>(115)</sup> .
<b>Serglicina</b>	Proteoglicano de membrana resistente a serín esterases y por tanto a granzimas <sup>(180)</sup> .

**Tabla 1:**  
Contenido de los gránulos líticos y función de cada uno de sus componentes.

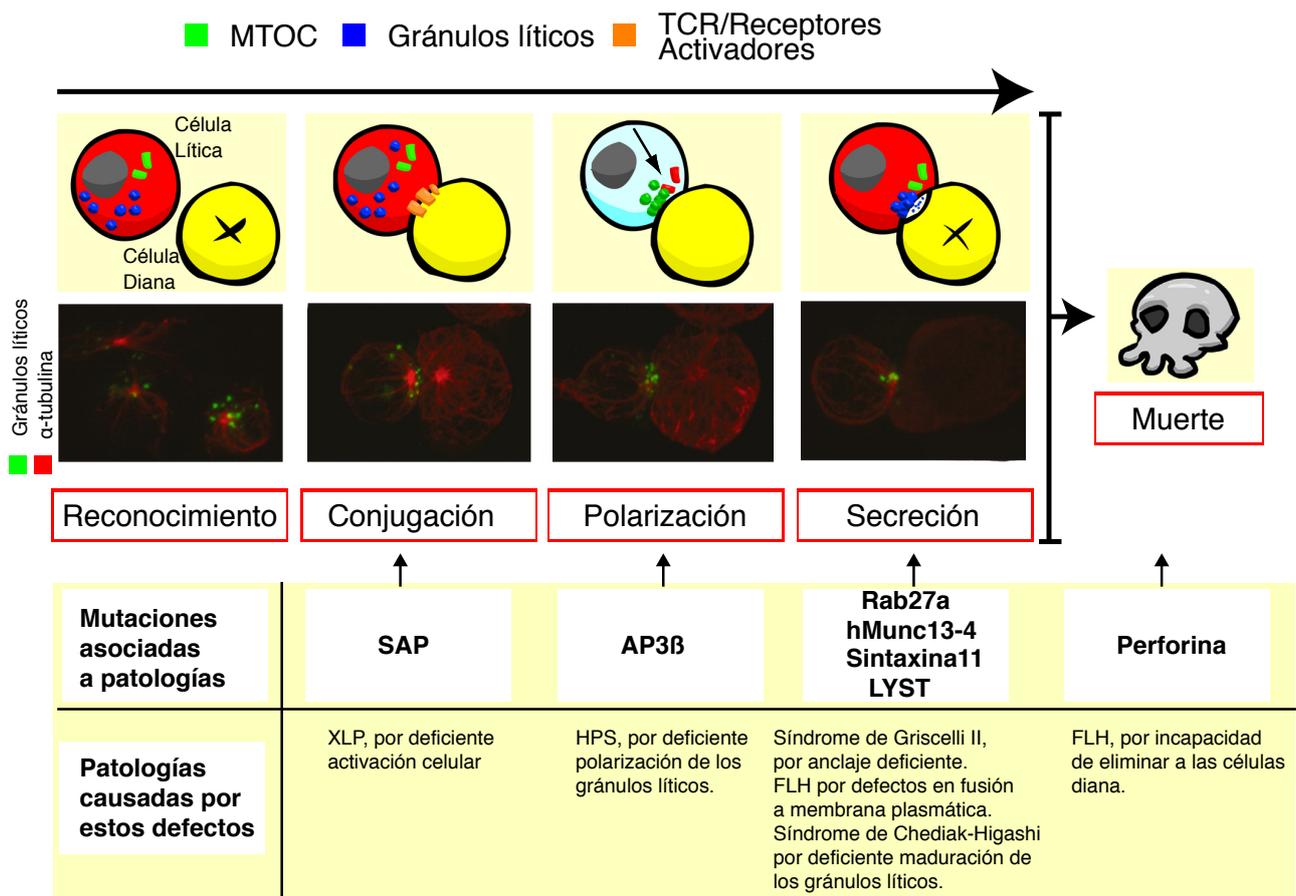


**Mecanismos de secreción de los gránulos líticos:**

A continuación describiremos los detalles de las vías que llevan a la correcta secreción de los gránulos líticos. En la **Figura I10** se muestran los diferentes subprocesos necesarios para la eliminación de la célula diana.

Una vez ha contactado con la célula a eliminar, la célula citolítica inicia la polarización de toda su maquinaria secretora hacia la sinapsis. Esto es esencial por dos razones. En primer lugar, la perforina es un enzima muy inestable y pierde actividad con mucha facilidad, por lo que

es imprescindible que el ambiente de secreción sea reducido y muy controlado<sup>(262)</sup>. De hecho, las moléculas de adhesión de la sinapsis crean un bolsillo hermético que facilita que el contenido de los gránulos no se disperse<sup>(247)</sup>. La segunda razón es que este mismo espacio hermético protege a la célula lítica de su propio contenido, porque allí se concentran elementos del gránulo que impiden la acción lítica de la perforina y las granzimas sobre la membrana de la célula secretora y de las células colindantes. La polarización de la maquinaria secretora requiere por lo tanto polimerización de actina mediada por Cdc42 y Rac1<sup>(248)</sup>; se forma un frente de avance (*leading edge*) en la sinapsis y se estabiliza la unión a través de integrinas que se anclan al citoesqueleto de actina con ayuda



**Figura I10:** Subprocesos requeridos para la eliminación de una célula diana mediante gránulos líticos: En la parte superior de la figura esquematizamos los diversos eventos que llevan a la eficiente eliminación de la célula diana. Las imágenes del bloque inferior son inmunofluorescencias correspondientes a cada uno de los pasos en el proceso citotóxico. La célula lítica debe reconocer a una célula; identificarla como diana a través de las señales emitidas a través del TCR o al equilibrio entre receptores activadores/inhibidores en una célula NK; polarizar la maquinaria secretora; y finalmente, concentrar, anclar y secretar los gránulos líticos en la sinapsis inmunológica. Las imágenes de inmunofluorescencia han sido obtenidas de<sup>(248)</sup>.

de talina<sup>(42)</sup>. Además se capturan y estabilizan los extremos + de los microtúbulos. De esta manera los microtúbulos se anclan, y el MTOC puede moverse en dirección a la zona de contacto<sup>(25)</sup>. Otra proteína que podría estar implicada en este proceso es WASP, que contribuye al entrecruzamiento de la actina y también se acumula en el la sinapsis, en el pSMAC; su ausencia se traduce en menos polimerización de actina en la sinapsis, y menos estabilidad de esta, lo que culmina en una peor polarización de la célula y defectos en la secreción<sup>(201, 102)</sup>. Se ha sugerido que esto puede ser regulado a través de su efector WIP, que se encuentra en los gránulos líticos. De hecho, la eliminación de WIP inhibe dramáticamente la citotoxicidad<sup>(148)</sup>. Aún así, algunos trabajos sugieren que el MTOC puede viajar a la zona de contacto independientemente de la actividad del citoesqueleto de actina<sup>(42)</sup>, y que el único desencadenante que necesita es la fosforilación de ciertos ITAMs. Otro posible participante en este complejo proceso es la subunidad  $\beta$  de la proteína adaptadora del lisosoma AP3, cuya función se asocia a la biogénesis de los lisosomas. La ausencia de esta proteína se ha asociado a Síndrome de Hermansky Pudlak tipo II, que además de albinismo parcial y defectos en la función plaquetaria, presenta células líticas incapaces de polarizar los gránulos y por tanto severos defectos en citotoxicidad<sup>(61, 280)</sup>.

Aunque el mecanismo preciso que desencadena los eventos de polarización no está claro en absoluto, existen publicaciones que muestran la necesidad de acumulación de diacilglicerol en la zona de la sinapsis<sup>(217)</sup> y de la actividad de ERK2<sup>(54)</sup>. También parece importante la integración de señales de los receptores que están induciendo la citotoxicidad; de hecho se ha comprobado que la polarización y la secreción de gránulos se regulan independientemente y un proceso puede ocurrir sin que ocurra el otro, al menos en células NK<sup>(106)</sup>. Por ejemplo, en células NK preactivadas con IL2 la estimulación de CD16 es suficiente para inducir degranulación pero no polarización del MTOC, a diferencia de LFA-1, que no induce secreción pero sí la reubicación del MTOC<sup>(36)</sup>. Por lo tanto, para una citotoxicidad

eficaz se requiere la colaboración de señales que induzcan polarización del MTOC y secreción.

La relocalización del MTOC moviliza toda la maquinaria secretora hacia la zona de contacto, incluyendo el aparato de Golgi, endosoma tardío, el endosoma de reciclaje y los gránulos líticos<sup>(179)</sup>, aunque solamente estos últimos llegan a alcanzar la membrana plasmática; los detalles de este transporte permanecen oscuros, aunque algunos autores<sup>(261)</sup> sugieren que Rab7, implicada en transporte de lisosomas en células no líticas a través de su efector RILP<sup>(43)</sup>, podría ser la responsable de este proceso. Se ha observado también por microscopía electrónica, que los gránulos líticos son transportados a la zona de la sinapsis a través de los microtúbulos, pero es el propio MTOC el que los orienta al dominio de secreción de manera independiente de estos<sup>(249)</sup>.

Una vez en la zona de la sinapsis, los gránulos se anclan y fusionan a la membrana, secretando su contenido. La correcta degranulación requiere la interacción de diversos compartimentos intracelulares, ya que los gránulos de por sí no son capaces de fusionarse a la membrana. Los gránulos parecen ser defectivos en determinadas moléculas que colaboran en el anclaje y la fusión, y sólo la interacción con otros compartimentos les permite adquirirlos. El endosoma de reciclaje, por ejemplo, interacciona con los gránulos líticos e incorpora hMunc13-4 a estos<sup>(179)</sup> una proteína que facilita la acción de complejos SNARE en el anclaje y la fusión<sup>(21)</sup>. El endosoma tardío, por su parte parece proporcionar de la misma manera Rab27a, que ha demostrado ser imprescindible en el anclaje de los gránulos a la membrana<sup>(179)</sup>. La estricta regulación de este proceso es crítica; de hecho muchas inmunodeficiencias severas aparecen por defectos en proteínas que median estos últimos pasos de la secreción. Un ejemplo de esto es el Síndrome de Griscelli 2, que aparece por ausencia de Rab27a, o la linfocitosis hemofagocítica familiar (FHL) por defectos en hMunc13-4<sup>(90)</sup>.

Aunque profundizaremos en los detalles



en el apartado de resultados, existen numerosas sugerencias en la literatura de que Ral podría estar regulando la citotoxicidad mediada por gránulos. En primer lugar, como hemos visto previamente, Ral regula a través de varios de sus efectores (como PLD1, RalBP1, filamina y el exocisto) la reorganización del citoesqueleto de actina en diversos sistemas. Esta reorganización resulta imprescindible tanto para la formación de la sinapsis inmunológica y un conjugado estable con la célula diana, como para generar el dominio de secreción. También hemos hablado de la necesidad de polarizar la maquinaria secretora y del correcto ensamblaje y fusión de los gránulos para que la lisis ocurra correctamente; Ral ha demostrado ser crítico en diferentes sistemas de secreción polarizada, como hemos explicado con anterioridad. Así pues, al inicio de este trabajo contábamos con abundantes evidencias que nos indujeron a estudiar el papel de Ral en la citotoxicidad celular mediada por gránulos líticos.





## Hipótesis y Objetivos:

### **Papel de las GTPasas Ral en la función del los linfocitos T:**

Las GTPasas Ral representan una de las tres rutas efectoras del oncogén Ras, junto con la de la MAPK y la de PI3K. La señalización a través de Ras es esencial en el desarrollo de los linfocitos B y T, así como en la respuesta de estas células ante la presentación de un antígeno. Por este motivo teníamos razones para suponer una función de las GTPasas Ral en la activación de las células T a través de su receptor de antígeno. Estructuramos nuestro estudio en función de los siguientes objetivos:

1. Estudio de la actividad y localización de Ral en linfocitos T.
2. Estudio *in vitro* de la activación de linfocitos T en los que se ha modificado la actividad de Ral.
3. Extrapolación de los datos obtenidos al estudio del ratón RalGDS<sup>-/-</sup> :
  - a. Estudio general de las poblaciones del sistema inmune de estos animales.
  - b. Estudio de la activación de linfocitos T RalGDS<sup>-/-</sup>.

### **Las GTPasas Ral en citotoxicidad celular:**

Para que la función de los linfocitos B y T sea eficiente se requiere que sus respuestas sean direccionales y polarizadas, y que se localicen específicamente en la zona de contacto entre el linfocito y su célula presentadora de antígeno. Un claro ejemplo de esto son las células citotóxicas como los CTLs y las células NK, que sólo son capaces de inducir lisis eficientemente en la célula diana si sus gránulos líticos se secretan en la zona de la sinapsis inmunológica. Debido a que las GTPasas Ral controlan procesos de tráfico vesicular y secreción polarizada en diversos sistemas, quisimos comprobar si estas proteínas regulaban la secreción de gránulos líticos en células citotóxicas. Para confirmar la validez de esta hipótesis utilizamos distintas aproximaciones experimentales que nos permitieron abordar los siguientes objetivos:

1. Estudio de la actividad de Ral en células con capacidad citolítica.
2. Estudio de la localización de Ral en células líticas.
3. Efecto de la disminución de los niveles de Ral en la capacidad citotóxica de una línea de células NK.
4. Análisis de los mecanismos moleculares que llevan a los posibles defectos observados.





## Materiales y Métodos:

### Cultivo celular:

Las células de linfoma CD4<sup>+</sup> Jurkat y las células Raji se cultivaron en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Lonza) + 10% FBS, 20mM Glutamina 1mM HEPES y 100U/ml Penicilina/Streptomycin.

La línea tumoral YTS, derivada de un linfoma NK, y la línea B-linfoblastoide 721.221, carente de HLA-I, fueron cultivadas en RPMI (Lonza) suplementado con 10% FBS. Las células Schneider de Drosophila SC2-B7.1/ICAM1 y SC2-ICAM.1<sup>(36)</sup> las mantuvimos en medio Schneider, con 2mM de L-Glutamina y 10%FBS. La expresión de los ligandos transfectados se indujo mediante incubación durante 24h con 1 mM CuSO<sub>4</sub>.

Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de ratón OT-1 fueron extraídos de bazo de ratones OT-1<sup>(118)</sup> que fueron disgregados y se les lisó los eritrocitos con tampón hipotónico (NH<sub>4</sub>Cl 8,3 gr/l, Tris Base 20,6gr/l, pH 7.2). Los linfocitos CD8<sup>+</sup> positivos fueron aislados por selección negativa con Dynabeads cubiertas de estreptavidina (Invitrogen) acopladas a anticuerpos biotinilados contra Gr1, CD4 y B220 (ver tabla de anticuerpos).

Generamos linfocitos T citotóxicos de ratón (mCTLs) específicos contra OVA incubando esplenocitos de ratones OT1 con esplenocitos pretratados con mitomicina (SIGMA, 1 mg/

ml durante 90 min) y preincubados con 1µg/ml de péptido OT-1 (SIINFEKL). A las 24h se suplemento el cultivo con 100U/ml de IL2 que se repuso cada día durante un periodo de diferenciación de 6 días.

Las mediciones de la celularidad se realizaron mediante un contador CasyCounter (Roche Innovatis) siguiendo las especificaciones del fabricante.

### Activación celular:

Antes de ser activadas, las células mCTL y las YTS se privaron de suero (2horas) en RPMI con BSA libre de endotoxina (SIGMA) al 0.1%. Las células Jurkat se privaron en DMEM con BSA libre de endotoxina (SIGMA) al 0.1%.

Para activar las células YTS con células Schneider de Drosophila SC2, las incubamos junto a SC2-B7.1/ICAM o SC2-ICAM en proporción 1:1, en un baño a 37°C durante los tiempos indicados. Inmediatamente antes de introducir las muestras en el baño, se centrifugaron (30s, 4°C, 500rpm) para facilitar la interacción. Para activar las células YT con anticuerpos contra CD28 humano, tras la privación de suero las células se incubaron con este anticuerpo (1µg/ml, 4°C, 20min) y se lavaron abundantemente con RPMI sin suero y frío. A continuación se procedió al entrecruzamiento de los anticuerpos con anti-IgG de hámster armenio y sirio (1µg/ml) durante los tiempos indicados a 37°C.

En el caso de las activaciones utilizando inhibidores de PI3K o PLC, las células YT se privaron normalmente y a continuación se incubaron con 20µM LY294002 (Sigma Aldrich), 10µM de U73221 (cedido generosamente por el laboratorio de Isabel Mérida), o el volumen equivalente de DMSO como control de disolvente (30min, 37°C). Tras esta incubación se lavó las células con RPMI sin suero y se procedió a la activación como se ha indicado anteriormente.

Los ensayos de activación de células YT con células linfoblastoides 721.221 se realizaron privando ambos tipos celulares de suero en

medio RPMI con BSA libre de endotoxina (SIGMA) al 0.1%. Para los experimentos usando células 721.221 fijadas, previamente a la activación se centrifugaron las células 721.221, se incubaron con PFA (4%, 5 minutos) y se lavaron abundantemente con RPMI sin suero. A continuación se incubó ambos tipos celulares en proporción 1:1, en un baño a 37°C durante los tiempos indicados. En este caso las muestras también se centrifugaron brevemente (30s, 4°C, 500rpm) antes de introducir las en el baño.

Las células Jurkat se activaron de diversas maneras; para su activación con anticuerpos se incubaron con anticuerpo anti-hCD3 $\epsilon$  (clon UCHT1, 1 $\mu$ g/ml, 20min, 4°C) o con éste junto a anticuerpo anti-hCD28 (0.5 $\mu$ g/ml); para inducir entrecruzamiento de receptores se incubaron las células a 37°C con anticuerpo anti-IgG de ratón (1 $\mu$ g/ml) durante los tiempos señalados. La activación con PMA o ionomicina se realizó añadiendo 50nM y 1 $\mu$ M respectivamente e incubando las células en un baño a 37°C los tiempos indicados.

Los CTLs se activaron mediante incubación con anticuerpo anti-mCD3 $\epsilon$  (1 $\mu$ g/ml, 20min, 4°C) y posterior entrecruzamiento con anti-IgG de hámster armenio y sirio (1 $\mu$ g/ml) durante los tiempos indicados a 37°C.

Tras la activación, las células se lavaron con PBS frío y se lisaron como se describe a continuación.

### ***Experimentos de Pull-down de Ral e inmunoprecipitación:***

Para los ensayos de pull-down de Ral se lisaron las células durante 20min en PBS con 1% Triton-X 100, 5 mM NaF, 1 mM NaVO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF, 1 mg/ml aprotinina y 1 mg/ml leupeptina (30min, 4°C). Se incubó 500 $\mu$ g de la proteína resultante con esferas de agarosa recubiertas de glutatión (GE-Healthcare) conjugadas con GST-RalBP1 RBD<sup>(286)</sup> (1h, 4°C). A continuación lavamos las esferas con el tampón de lisis descrito antes y dos veces con 25 mM TrisHCl (pH=7.2);

finalmente las muestras se prepararon para análisis por Western Blot, en el que utilizamos anticuerpos contra RalA (BD Biosciences) o RalB (Upstate).

Los ensayos de pull-down de Ras se llevaron a cabo de manera análoga, con la única diferencia de que las esferas de agarosa recubiertas de glutatión fueron conjugadas a GST-Raf RBD.

Las muestras destinadas a inmunoprecipitación se lisaron con 20mM TrisHCl pH 7.5, 200mM NaCl, 0.1mM DTT, 1% Tritón X100 y 10% glicerol (30min, 4°C). Se utilizó 500mg del extracto de proteína por punto, e inmunoprecipitamos con 2 $\mu$ g de los anticuerpos indicados y esferas de sefarosa acopladas a Proteína A (GE-Healthcare) (4h, 4°C). Tras esto se lavaron las muestras una vez con tampón de lisis y tres con 50mM TrisHCl pH 7.5, se hirvieron y analizaron por Western Blot con los anticuerpos utilizados.

### ***Electroporación y nucleofección:***

Para la electroporación de células Jurkat se recogieron 12 x 10<sup>6</sup> de éstas y se lavaron con DMEM sin suero. Se resuspendieron en 400 $\mu$ l de éste medio y se les añadió 20 $\mu$ g del DNA de interés. Se trasladó la mezcla a una cubeta de electroporación de 0.4mm y se electroporaron a 975 $\mu$ Fa y 270V mediante un Biorad Gene Pulser II. Cada punto se resuspendió a continuación en 10ml de DMEM completo y se dejó reposar las células 48h antes del experimento.

Introducimos los siRNA en células YTS mediante nucleofección, utilizando el Amaxa Nucleofector System (Lonza), el kit de nucleofección de linfocitos humanos (Lonza) y el programa predefinido U-14. Seguimos el protocolo recomendado por el fabricante, que describimos brevemente: para cada punto recogimos 5 x 10<sup>6</sup> células YTS, las lavamos con RPMI sin suero y las resuspendimos en 100 $\mu$ l del tampón de nucleofección, al que añadimos el siRNA de interés (3 $\mu$ g de siRalA, 10 $\mu$ g de siRalB y siSec5). A continuación se nucleofectaron en las cubetas proporcionadas por el fabricante, se



resuspendieron en 1ml de RPMI completo y se dejaron reposar 24h a 37°C, momento en el que añadimos otros 4ml de RPMI. Los experimentos se llevaron a cabo 48h después de la transfección.

### **Plásmidos y construcciones:**

Para el clonaje de las diversas variantes mutantes de RalA y RalB en pEGFP-BOS, partimos de las proteínas silvestres clonadas en el vector pRK5. Se utilizó un kit de mutagénesis dirigida, el Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene), para inducir las mutaciones 28N y 72L en RalA, y 28N y 23V en RalB. Los vectores con las variantes de RalA fueron digeridos con EcoRI (New England Biolabs) y SmaI (New England Biolabs). Para estos insertos el vector pEGFP-BOS fue digerido con HindIII (New England Biolabs), relleno con la polimerasa Klenow (New England Biolabs) y digerido nuevamente con EcoRI. Los insertos se ligaron en el vector abierto mediante T4 DNA ligasa (New England Biolabs). Los insertos de RalB se extrajeron de pRK5 digiriendo previamente con HindIII, relleno con Klenow y digiriendo nuevamente con EcoRI. En este caso, previo a la ligación con T4 DNA ligasa, se abrió el vector pEGFP-BOS con XbaI y se relleno el extremo cohesivo con Klenow.

### **siRNA y shRNA:**

Se utilizaron los siguientes siRNAs sintéticos (Dharmacon): RalA, RalB y Sec5, cuyas secuencias se muestran en la **tabla siRNA**.

Las líneas de YTS que expresaban establemente shRNAs contra RalA o RalB se generaron por infección con vectores lentivirales (pLKO.1-puro, Sigma Aldrich) que codifican los shRNAs RalA1, RalA2, RalB1 y RalB2, cuyas secuencias se muestran en la **tabla shRNA**.

Tras la infección, las células que expresaban la construcción fueron seleccionadas con 2µg/ml de puomicina (SIGMA).

### **Citometría de Flujo:**

Para los análisis poblacionales de bazos

y nódulos linfáticos de ratón se sacrificó a los animales y se les diseccionaron los mencionados órganos, se disgregaron y se les lisaron los eritrocitos mediante un tampón hipotónico (NH<sub>4</sub>Cl 8,3 gr/l, Tris Base 20,6gr/l, pH 7.2). Para cada tinción de citometría se utilizaron 10e6 células, se concentraron en el fondo del pocillo y se tiñeron con anticuerpos específicos (**ver tabla**) conjugados con fluoróforos, disueltos en PBS + 5mM EDTA, 0.5% BSA a la concentración recomendada por nuestro servicio de citometría. Las muestras se analizaron mediante un citómetro XL Four Color Cytometer (Beckman Coulter).

### **Inmunofluorescencia:**

Se plaquearon las células en cubreobjetos pretratados con poli-L-lisina (10min, 37°) y se fijaron con metanol al 100° preenfriado a -20°C. Se bloqueó las muestras con PBS + 0.5% BSA + 0.1% TX-100, 10% suero de cabra inactivado (30°, RT).

Las tinciones se realizaron con los anticuerpos primarios indicados; a continuación se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromos (ver tabla anticuerpos). Se lavó los cubreobjetos con PBS y se montaron en portaobjetos con PBS + 50% glicerol. Las muestras se analizaron con un microscopio confocal Olympus FlowView.

### **Inducción de contactos en células**

#### **Jurkat:**

Previamente al experimento se cargaron células Raji con el superantígeno SEE (1ng/ml, Toxin Technology) en combinación con el colorante vital CMAC (1µl/ml) durante 1h a 37°C. A continuación se lavaron las células 2 veces con DMEM completo. Las células presentadoras se marcaron incubándolas previamente con el colorante vital CMAC siguiendo las especificaciones del fabricante.

Se incubaron 5 x 10<sup>5</sup> células Jurkat en proporción 1:1 con células Raji cargadas o no con SEE (15min, 37°C). Finalmente las células se plaquearon en cubreobjetos como se describe

en el apartado anterior.

### ***Ensayos de conjugación, degranulación y polarización en células YTS:***

En los ensayos de conjugación se tiñó células YTS con el colorante verde PKH67 Green Fluorescent Cell Linker (Sigma-Aldrich), y las 721.221 con el colorante rojo PKH26 Red Fluorescent Cell Linker (Sigma-Aldrich), según las especificaciones del fabricante. Se incubaron las células YTS y 721.221 en una proporción de 1:2 durante diferentes periodos de tiempo, tras los cuales se fijaron las células con paraformaldehído al 4%. Las muestras se analizaron por FACS, donde se cuantificó como conjugados los eventos positivos para verde y rojo. El porcentaje de conjugación se evaluó como [(YTS conjugadas/YTS totales)x100].

En los ensayos de degranulación se tiñeron las células YTS con PKH26 y se incubaron en una proporción de 1:2 en presencia de 4nM monensin y anticuerpo anti- CD107a (BD Pharmingen) humano o un control de isotipo. Las muestras se analizaron por citometría de flujo.

La polarización de la maquinaria secretora se analizó incubando células YTS con 721.221 en proporción de 1:4 durante 15min a 37°C. A continuación se prepararon los cubreobjetos como se ha descrito anteriormente. Los contactos fueron analizados y cuantificados con un microscopio confocal Olympus Fluoview.

### ***Ensayos de Citotoxicidad:***

En los ensayos de Alamar Blue <sup>(195)</sup> se incubaron  $5 \times 10^3$  células 721.221 con diferentes proporciones de células YTS, en RPMI + 10% Alamar blue (Invitrogen) (16h, 37°C). Las muestras se analizaron mediante un CytoFluor 2350 (Millipore), utilizando una longitud de onda de excitación de 530nm y leyendo a una longitud de onda de 590nm. El porcentaje de citotoxicidad específica se calculó como:  
[(Células 721.221 en reposo) – [(Células YTS + Células 721.221) – (Células YTS en reposo)]]x100/ (Células 721.221 en reposo) <sup>(195)</sup>.

### ***Líneas de ratones:***

Los ratones RalGDS<sup>-/-</sup> fueron diseñados por Ana González García en el laboratorio de Chris Marshall <sup>(103)</sup>.

La línea de ratones transgénicos del TCR OT1 fueron proporcionados gentilmente por el laboratorio de Carlos Ardavín.

Todos los experimentos con ratones se realizaron en conformidad con todas las guías nacionales y europeas, y con la aprobación del Comité de Ética Animal del Centro Nacional de Biotecnología.

### ***PCR Cuantitativa:***

Se obtuvo RNA mensajero de las células indicadas por centrifugación y purificación del mRNA mediante el kit de purificación RNeasy Protect (Quiagen). El ADN copia se obtiene mediante retrotranscripción con el kit de Applied Biosystems “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit”, siguiendo el protocolo dictado. El análisis de PCR cuantitativa se realiza con oligonucleótidos específicos para cada caso, empleando la sonda SYBR® Green y el kit “Fluocycle SYBR© Green mix for real-time PCR”, de EuroClone–Genycell. La PCR se hizo con ABI PRISM 7900HT de Applied Biosystems, software SDS v2.2.2, con las siguientes condiciones: 10’ a 95°C, y 40 ciclos de 15’’ a 95°C y 60’’ a 60°C. En todos los casos los resultados se refieren al gen ubicuo 18S y a la actina.

Los cebadores utilizados para la PCR cuantitativa se muestran en la ***tabla QPCR:***

### ***Cuantificaciones y Análisis estadístico:***

Las bandas en los Western Blot se cuantificaron utilizando el software Imagen (Wayne Rasband, NIH) para medir la intensidad media de un área determinada.

Se realizó un test t de Student de dos colas utilizando GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software). A menos que se indique lo contrario, los datos muestran las medias  $\pm$  SD. Se consideró estadísticamente significativo un valor de



**Tablas Anticuerpos:**

<b>WESTERN BLOT</b>		
RalA	BD Biosciences	Monoclonal Ratón
RalB	Upstate	Monoclonal Ratón
$\beta$ -actina	Cell Signaling	Monoclonal Ratón
Pan-Ras	Oncogene Research P.	Monoclonal Ratón
pERK	Cell Signaling	Policlonal Conejo
ERK	Cell Signaling	Policlonal Conejo
pAKT	Cell Signaling	Monoclonal Ratón
AKT	Cell Signaling	Monoclonal Ratón
Perforina	Kamiya Biomedical	Monoclonal Rata
Sec5	Proteintech	Conejo
Sec8	BD Biosciences	Monoclonal Ratón
Sec10	AbCam	Conejo

<b>INMUNOFLUORESCENCIA</b>		
RalA	BD Biosciences	Monoclonal Ratón
RalB	Upstate	Monoclonal Ratón
Perforina	Kamiya Biomedical	Monoclonal Rata
pERK	Cell Signaling	Policlonal Conejo
$\alpha$ -tubulina	Calbiochem (DM1A)	Monoclonal Ratón
Rab11	Cell Signaling	Polclonal Conejo
Rab11	BD Pharmingen	Monoclonal Ratón
CD107b (Lamp2)	AbCam	Policlonal Conejo
IgG de Ratón - Cy3	Jackson Immunotech	Policlonal Cabra
IgG de Conejo-Alexa488	Molecular Probes	Policlonal Cabra
IgG de Rata - Biotina	Jackson Immunotech	Policlonal Ratón
IgG de Rata - Cy5	Jackson Immunotech	Policlonal Ratón
IgG de Rata - Cy3	Jackson Immunotech	Policlonal Ratón
Estreptavidina - Cy5	Jackson Immunotech	
IgG de Conejo - Cy3	Jackson Immunotech	Policlonal Cabra

<b>ACTIVACIÓN CELULAR</b>		
$\alpha$ -tubulina	Calbiochem (DM1A)	Monoclonal Ratón
mCD3 $\epsilon$	BD Pharmingen	Hámster Armenio
mCD28	BD Pharmingen	Hámster Sirio
hCD3 $\epsilon$ OKT3	eBiosciences	Monoclonal Ratón
hCD3 $\epsilon$ UCHT1	BD Pharmingen	Monoclonal Ratón
IgG Ratón	Jackson Immunotech	Policlonal Cabra
IgG de Hámster Sirio y Armenio	BD Pharmingen	Policlonal

<b>Citometría</b>		
mCD3ε	BD Biosciences	145-2C11
mCD4	Pharmlngen	6K1.5
mCD8	Pharmlngen	53-5.8
mB220	Beckman Coulter	RA3-6B2
mCD69	Pharmlngen	H1.2F3
mCD25	Pharmlngen	7D4
mCD44	Pharmlngen	IM7
mCD62L	Pharmlngen	MEL-14
mGr1	Pharmlngen	RB6-8C5
mCD11b	Pharmlngen	M1/70
mF480	Ebiosciences	BM8
mIgM	Beckman Coulter	11E10
mCD21	Pharmlngen	766
mCD23	Pharmlngen	B3B4
mIgD	Pharmlngen	IA62
hCD56PE	Immunotech	N901
hCD11aFITC	Immunotech	2531
hCD80FITC	Immunotech	MAB104
hCD28PE	Beckman coulter	CD28.2
hCD54FITC	Immunotech	84H10
hCD69PE	Immunotech	TPI 553
Vα2	Pharmlngen	B20.1
avidina-SPRD	Beckman Coulter	
CD107a-FITC	BD Pharmlngen	H4A3

**Tablas Oligonucleótidos:**

<b>siRNA</b>	
RalA	G.A.C.A.G.G.U.U.U.C.U.G.U.A.G.A.A.G.A.dT.dT
RalB	G.G.U.G.A.U.C.A.U.G.G.U.U.G.G.C.A.G.C.dT.dT
Sec5	G.G.U.C.G.G.A.A.A.G.A.C.A.A.G.G.C.A.G.A.U.dT.dT

<b>QPCR</b>	
hRalA - left	TGTGTCACCATTGTGTGGTGT
hRalA-right	TGAAATTATGTCCCAAGTAGCA
hRalB - left	CCATCCTTCGTTTTGAACTACA
hRalB-right	GGGAGGGCATCTTACTCCAC

<b>shRNA</b>	
RalA1	CCGGCGAGCTAATGTTGACAAGGTACTCGAGTACCTTGTC AACATTAGCTCGTTTTT
RalA2	CCGGCGATGAGTTTGTGGAGGACTACTCGAGTAGCTCCTCCACAAACTCATCGTTTTT
RalB1	CCGGCAAGGTGTTCTTTGACCTAATCTCGAGATTAGGTCAAAGAACACCTTGTTTTTG
RalB2	CCGGCCTTTACAGCAACTGCCGAATCTCGAGATTGGCAGTTGCTGTAAAGGTTTTTG







## Resultados

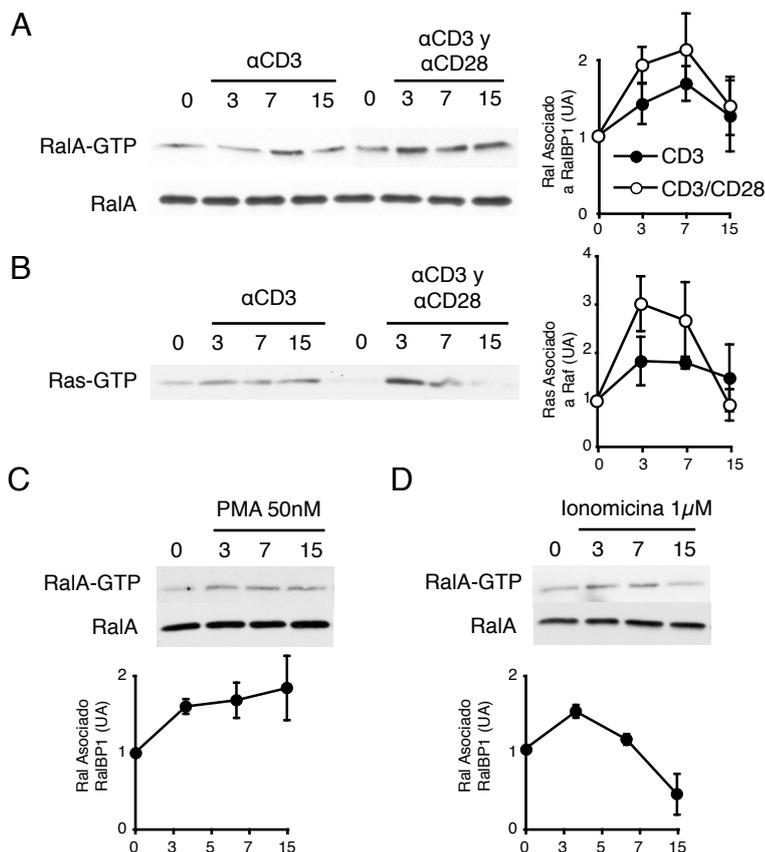
### 1. Papel de las GTPasas Ral en la función de los linfocitos T:

#### Ral se activa en linfocitos T en respuesta a la estimulación del TCR.

Para estudiar la función de Ral en las células T utilizamos una línea celular que nos permitió una aproximación sencilla, las células Jurkat, una línea CD4<sup>+</sup> immortalizada derivada de un linfoma T<sup>(101)</sup>. Estas células se transfectan fácilmente, lo que nos permite el estudio de Ral mediante la introducción de mutantes y RNAs de

interferencia.

El receptor de antígeno de las células T pone en marcha numerosas vías de señalización, muchas de las cuales podrían estar potencialmente reguladas por la acción de Ral. Para comprobar si en células Jurkat Ral se activa en respuesta a la estimulación del TCR, las incubamos con anticuerpos contra la subunidad CD3 $\epsilon$  de este receptor, sólo o en combinación con un anticuerpo anti-CD28, receptor necesario para una activación completa de los linfocitos T. A continuación analizamos la fracción activa de Ral mediante ensayos de pulldown, utilizando como cebo el dominio de unión a Ral de su molécula efectora RalBP1 unida a GST<sup>(286)</sup>. RalBP1 únicamente se une a Ral-GTP, así que al purificar RalBP1-GST arrastraremos solamente Ral activo. En la



#### Figura R1:

Las GTP-asas Ral se activan en respuesta a estímulos inductores de citotoxicidad celular:

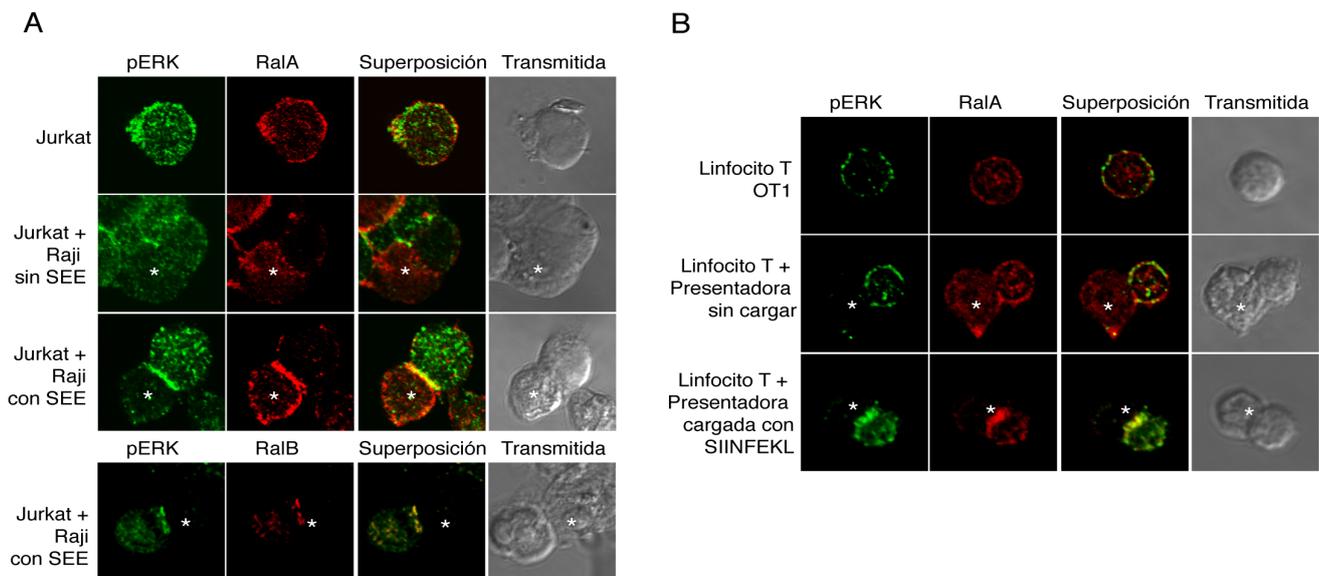
(A) Estimulamos células Jurkat durante los tiempos indicados con anticuerpos anti-hCD3 $\epsilon$  (1 $\mu$ g/ml) o una combinación de anti-hCD3 $\epsilon$  y anti-hCD28, y a continuación con 1 $\mu$ g/ml de anticuerpo anti IgG de ratón. Lisamos las células y utilizamos 500 $\mu$ g del extracto proteico de estos lisados para detectar la fracción activa de Ral mediante ensayos de pulldown utilizando RalBP1-GST como cebador, seguidos de Western Blot usando anticuerpos contra RalA. Mostramos a la derecha una cuantificación de la intensidad de la señal correspondiente a RalGTP, en unidades arbitrarias. Los valores corresponden a la media  $\pm$ DE de 3 experimentos. (B) Incubamos lisados de células sometidas a la misma activación que en el apartado anterior, con Raf-GST, para detectar la fracción activa de Ras. La cuantificación de la derecha se realizó de la misma manera que en el anterior apartado. (C y D) Realizamos estimulaciones de células Jurkat con 50nM de PMA y 1 $\mu$ g de ionomicina, respectivamente. Los lisados se sometieron a ensayos de pulldown y se cuantificaron como en los apartados anteriores.

**Figura R1A** observamos un fuerte incremento de RalGTP cuando estimulamos células Jurkat con anti-CD3 $\epsilon$  o con la combinación de anti-CD3 $\epsilon$ /CD28. La estimulación completa induce una señal más fuerte, y rápida, mientras que cuando utilizamos sólo anti-CD3 $\epsilon$  RalA parece inducirse ligeramente más tarde. Esta inducción de la actividad de Ral correlaciona con el incremento de la fracción unida a GTP de la GTPasa Ras (**Fig R1 B**), medida a través de su unión a Raf-GST. Esto sugiere, teniendo en cuenta la literatura, que Ras podría ser, al menos en parte, responsable de la activación de Ral en este modelo, como ocurre en líneas de linfocitos B <sup>(69)</sup>.

Los niveles de Ras GTP en linfocitos T están regulados por dos vías mayoritarias, la acción de su GEF SOS, que se recluta al complejo señalizador del TCR a través de SLP76 y Grb2 <sup>(231, 143, 178)</sup> y otro GEF, RasGRP que se activa por unión al segundo mensajero DAG <sup>(80, 76, 226)</sup>. Este DAG proviene de la acción de fosfolipasas como PLC $\gamma$ 1 en la membrana, que libera DAG e IP $_3$  <sup>(169)</sup>. Publicaciones recientes apoyan que, aunque ambas rutas son necesarias, la activación mayoritaria de Ras en linfocitos T podría ser a través de RasGRP <sup>(226)</sup>, por lo que quisimos comprobar si esta fracción de Ras activo era capaz de inducir un aumento de RalGTP. Para examinar esta posibilidad incubamos células Jurkat con un éster de forbol análogo al DAG, el PMA (del inglés *Phorbol 12-myristate 13-acetate*) y observamos una rápida y sostenida activación de Ral (**Fig R1C**), de una intensidad parecida a la obtenida tras la estimulación del TCR con anticuerpos específicos. La PLC $\gamma$  también genera IP $_3$ , que induce la liberación de los reservorios del calcio intracelular, y en líneas de células B ya se ha demostrado que este Ca $^{2+}$  provoca que Ral se active. Examinamos si esto también sucedía en células Jurkat cuando las incubamos con ionomicina (**Fig R1D**), un ionóforo que aumenta las concentraciones intracelulares de Ca $^{2+}$ . En estas condiciones detectamos también un incremento de RalGTP, aunque menos notable que lo que habíamos observado con otros tipos de estimulación. En conjunto, estos datos muestran que la estimulación del TCR provoca un aumento en la actividad de Ral a través de varias vías, con lo cual es razonable pensar que esta proteína juega un papel relevante en la señalización de las células T.

**Ral se concentra en la zona de contacto entre linfocito T:APC durante la presentación antigénica.**

Las GTPasas Ral se encuentran generalmente asociadas a membranas, tanto a la plasmática como a membranas vesiculares. Es en estas membranas donde son activadas por sus GEF y donde reclutan a sus efectores para ejercer sus funciones. Quisimos analizar la localización de Ral en células T, para lo cual utilizamos técnicas de microscopía confocal. Incubamos células Jurkat con células de la línea linfoblastoide Raji, presentando o no en membrana la enterotoxina de *Staphylococcus aureus* SEE, un superantígeno que induce una fuerte estimulación en las células Jurkat cuando se les presenta por una APC. Estas células se tiñeron con anticuerpos contra RalA y fosfo-ERK1/2 (**Fig R2A**). Utilizamos este último anticuerpo porque la fosforilación de ERK en la zona de contacto es señal de que la plataforma de señalización que arranca del TCR está en marcha, y por tanto la sinapsis es efectiva. En células Jurkat aisladas observamos que Ral se encuentra mayoritariamente tanto en la membrana celular como en el citoplasma, con un patrón punteado que sugiere vesículas intracelulares (panel superior). Cuando una célula Jurkat contacta con una célula Raji que no está presentando SEE, el patrón de distribución de Ral no parece cambiar ostensiblemente. Ahora bien, cuando las células Raji han sido preincubadas con el superantígeno, RalA se transloca a la membrana plasmática en la interfase entre la célula Jurkat y la célula presentadora. Lo mismo ocurre con RalB (**Fig R2A**, panel inferior), que también se relocaliza a la misma zona. Esta relocalización no parece ser solamente una cuestión propia de células Jurkat ni de células CD4 $^{+}$ , puesto que realizamos la misma tinción con linfocitos primarios de ratones transgénicos OT1, que sobrepresan la variante del TCR V $\alpha$ 2 $\beta$ 5. Este TCR reconoce específicamente un péptido de ovoalbúmina presentado en el contexto de MHC-I <sup>(118)</sup>. Preincubamos células B murinas con el péptido de OVA SIINFEKL y las expusimos a células CD8 $^{+}$  de ratones OT1, y como podemos comprobar en el apartado **B** de la **Figura R2**, los resultados de la tinción de RalA son similares a los obtenidos en células Jurkat. Por lo tanto, la inducción del TCR no sólo estimula la actividad de Ral sino que lo recluta a la membrana para ejecutar ahí sus funciones, concretamente a la



**Figura R2:**

RalA y B se encuentran en la membrana plasmática y en vesículas intracelulares, pero se relocalizan a la zona de contacto en respuesta a la estimulación del TCR:

Analizamos la localización de las GTPasas Ral mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos de las isoformas de Ral y anticuerpos contra fosfo-ERK. Las células presentadoras se identificaron incubándolas previamente con el colorante vital CMAC siguiendo las especificaciones del fabricante, y están marcadas con (\*). (A) Se incubaron células Jurkat solas, con células Raji, o con células Raji preincubadas con SEE (1ng, 1h 37°C). En los paneles superiores se utilizó anticuerpos contra RalA, mientras que el panel inferior corresponde a anticuerpos contra RalB. (B) Se incubaron células CD8<sup>+</sup> de ratones OT1 solas, con esplenocitos totales, y con esplenocitos totales preincubados con el péptido OT1 (1µg/ml, 1h, 37°C) y se tiñeron con anticuerpos contra RalA y fosfo-ERK.

zona de la sinapsis inmunológica.

**Las alteraciones en los niveles y en la actividad de RalA y B modifican la expresión del marcador de activación CD69.**

El aumento de la fracción de Ral unida a GTP y su relocalización tras la estimulación del TCR nos indujo a hipotetizar que Ral podría estar participando en la transducción de señales que llevan a la correcta activación de una célula T. La actividad de Ral ha sido relacionada con la expresión de diversos factores de transcripción, algunos de ellos relevantes en la activación y proliferación de estas células, como NFAT, AP-1 y NFκB<sup>(69, 114, 234)</sup>.

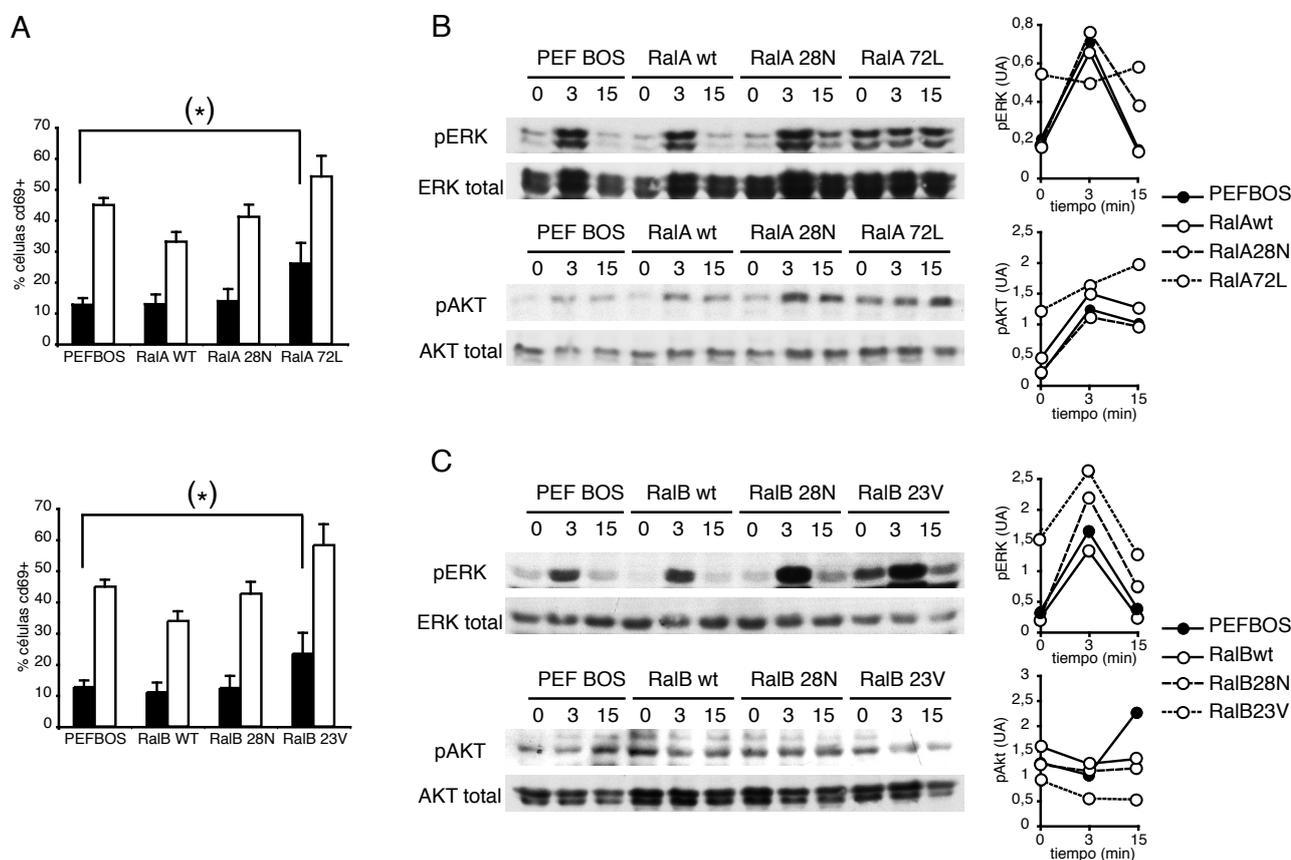
Para comprobar de manera sencilla si la alteración en la actividad de Ral pudiera influir en la correcta activación de las células T, transfectamos células Jurkat con diferentes variantes de RalA o RalB. Utilizamos para este experimento proteínas

silvestres (que denominaremos RalAWT y RalBWT), los dominantes negativos RalA28N y RalB28N, unas variantes que se unen a sus GEF pero son incapaces de unirse a sus efectores<sup>(85)</sup>, y los mutantes activos RalA72L y RalB23V, cuyo bolsillo catalítico está mutado y no pueden hidrolizar GTP, con lo que se encuentran siempre en la conformación activa<sup>(93)</sup>. Una vez transfectadas, estimulamos las células Jurkat con anticuerpos anti-CD3ε y medimos por citometría de flujo la expresión del marcador de activación temprana CD69. CD69 es una lectina que apenas se expresa en linfocitos no activados, y que aparece en la membrana plasmática muy rápidamente tras la estimulación del TCR<sup>(48)</sup>. Su expresión, además, se regula principalmente por jun/jun o jun/fos, es decir, AP-1<sup>(47)</sup> y por miembros de la familia de NFκB<sup>(168)</sup>, ambos putativamente bajo regulación de Ral, como hemos comentado.

En la **Figura R3 A y B** observamos los niveles de CD69 en células Jurkat transfectadas con estos mutantes de Ral antes y después de

estimularlas. Cuando examinamos las células que expresan un plásmido vacío (pEGFP-BOS, basado en <sup>(181)</sup>) en condiciones basales observamos muy pocas células positivas para este marcador; sin embargo, cuando estimulamos las células con anticuerpos contra CD3ε vemos como las células Jurkat pasan a expresar CD69 en la membrana plasmática. La introducción de las variantes activas tanto de RalA (RalA72L) como de RalB (RalB23V) sin embargo, incrementa significativamente los niveles basales de CD69, aunque los niveles de expresión no se acrecientan excesivamente tras la estimulación del TCR. Curiosamente no apreciamos diferencias significativas al transfectar las células Jurkat con

las variantes silvestres o dominantes negativas. Por lo tanto, parece ser que la actividad alterada de RalA lleva a la alteración de marcadores de activación. Quisimos comprobar si los datos de FACS reflejaban un incremento en el estado de activación general de la célula, o estábamos ante un efecto específico sobre la expresión de CD69. Para ello examinamos por Western Blot los niveles de fosfo-ERK y fosfo-AKT en estas mismas células. (**Fig R3C y D**). Los datos son consistentes con los niveles de CD69, y muestran que las diferencias más notables las encontramos con las variantes constitutivamente activas tanto de RalA como de RalB. Los niveles de fosforilación de ERK y AKT son considerablemente más altos que con



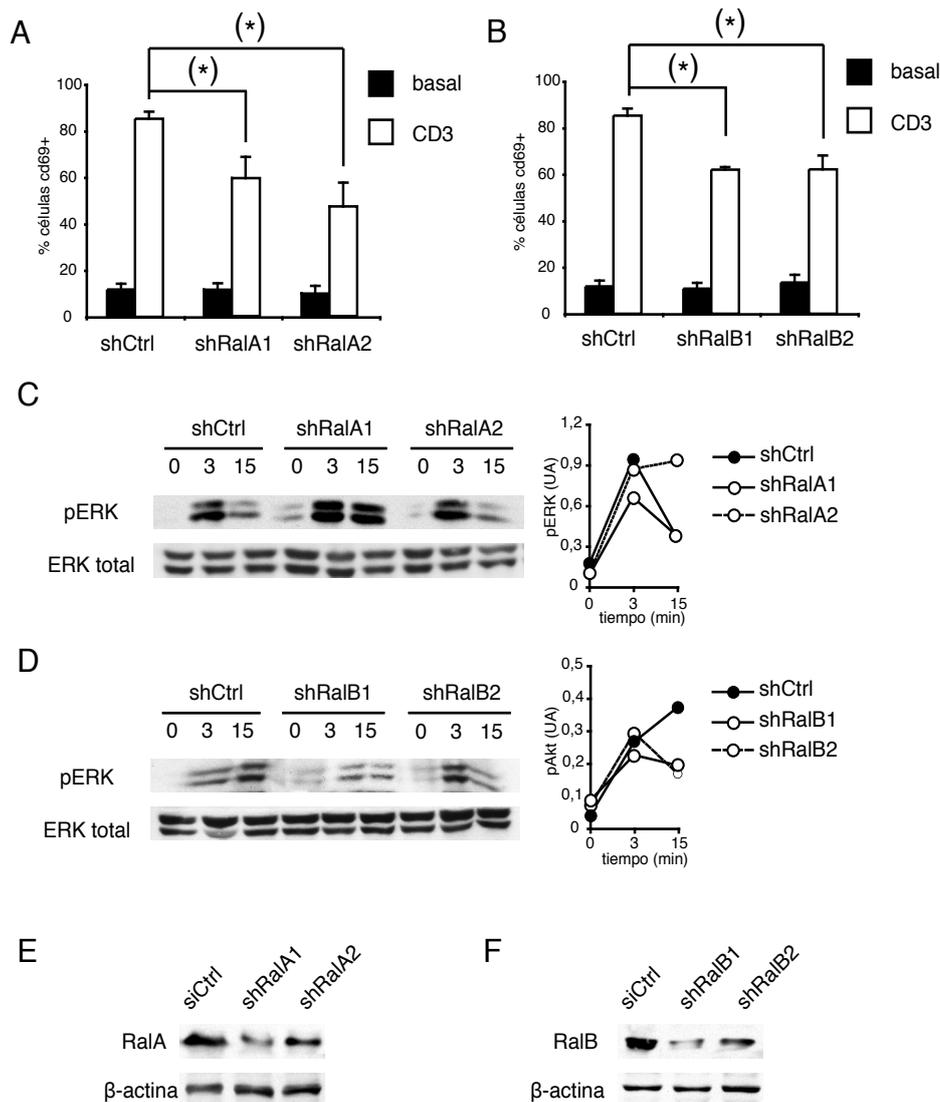
**Figura R3:**

Las variantes constitutivamente activas de RalA y RalB alteran los niveles de activación de las células Jurkat: Electroporamos células Jurkat con el plásmido PEF-BOS expresando las variantes silvestre (WT), dominante negativa (28N) y mutante activa (72L o 23V) de RalA (A y B) y RalB (C y D). (A y C) Se estimularon las células transfectadas en placas tapizadas con anticuerpos contra hCD3ε (6h, 37°C) y se midieron los niveles de CD69 mediante citometría de flujo. Los histogramas muestran las medias ±DE de 3 experimentos independientes.  $p < 0.01$ , por el test t- de Student de dos colas. (B y D) Se estimularon las células transfectadas con anticuerpos anti-hCD3ε (1µg/ml), y a continuación con 1µg/ml de anticuerpo anti IgG de ratón durante los tiempos indicados. Los lisados se utilizaron para análisis por Western Blot de los niveles de fosfo ERK y ERK total, en los paneles superiores, y fosfo-AKT y AKT, en los paneles inferiores. A la derecha mostramos la cuantificación de los niveles de fosfo-ERK y fosfo-AKT respecto a los niveles totales de estas proteínas, en unidades arbitrarias.



el vector vacío en ambos casos en condiciones de reposo, y se inducen peor cuando se estimula la célula con anticuerpos, especialmente en el caso de RalA72L. Esto sugiere que la célula se encuentra en un alto estado de activación que la hace relativamente refractaria a la estimulación con anticuerpos contra CD3ε.

Las variantes dominantes negativas de Ral no nos habían mostrado el resultado esperado, y no presentaban ningún fenotipo obvio. Las variantes mutantes activas y dominantes negativas de las GTPasas pequeñas no siempre se comportan como se espera <sup>(84)</sup>; por esta razón,



**Figura R4:**

La reducción de los niveles de RalA y RalB mediante shRNAs reduce la expresión de CD69 en respuesta a la estimulación del TCR:

Electroporamos células Jurkat con shRNAs contra RalA, shRalA1 y shRalA2 (A y B) y RalB, shRalB1 y shRalB2 (C y D). (A y C) Se estimularon las células transfectadas con anticuerpos contra hCD3ε (6h, 37°C) y se midieron los niveles de CD69 mediante citometría de flujo. Los histogramas muestran las medias ±DE de 3 experimentos independientes.  $p < 0.05$ , por el test t- de Student de dos colas. (B y D) Se estimularon las células transfectadas con anticuerpos anti-hCD3ε (1µg/ml), y a continuación con 1µg/ml de anticuerpo anti IgG de ratón durante los tiempos indicados. Los lisados se utilizaron para el análisis por Western Blot de los niveles de fosfo ERK y ERK total. A la derecha mostramos la cuantificación de los niveles de fosfo-ERK respecto a los niveles totales de esta proteína, en unidades arbitrarias. (E y F) Niveles de RalA y RalB respectivamente en las células Jurkat transfectadas con los distintos shRNAs.

para asegurarnos de los efectos de la disminución de la actividad de Ral, introdujimos shRNAs contra las dos isoformas de Ral en células Jurkat, y repetimos los experimentos anteriormente mencionados. Observamos que la expresión de dos shRNAs diferentes para cada isoforma de esta GTPasa reduce la expresión de CD69 en respuesta a la estimulación del TCR (**Fig A4**), con respecto a las células transfectadas con un shRNA control. Sin embargo, a diferencia de lo observado al utilizar los mutantes activos, esto no parece reflejarse de una manera especialmente notable en la fosforilación de ERK1/2.

En cualquier caso, la actividad de RalA y B parece estar influyendo en la inducción de la expresión de CD69, y por tanto, en la activación de las células Jurkat en respuesta a la estimulación del TCR.

**Los ratones *RalGDS*<sup>-/-</sup> muestran defectos en la activación de Ral en respuesta a la estimulación del TCR.**

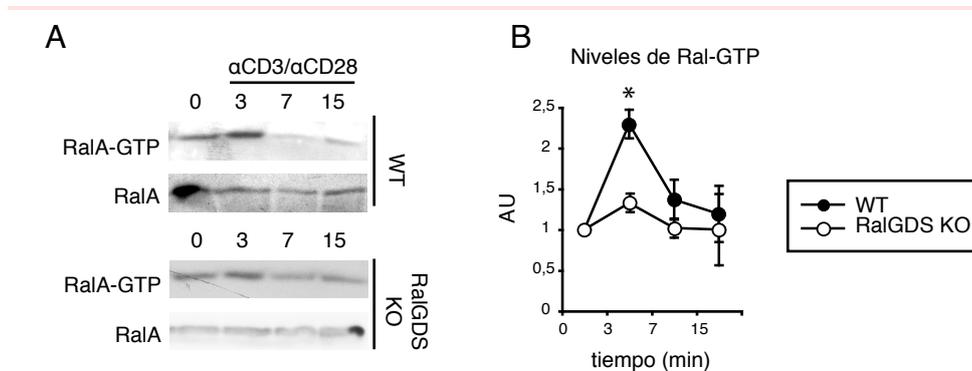
Existen pues indicios suficientes como para sospechar un papel relevante de Ral en la función linfoide. En el laboratorio contamos con un modelo animal que nos permite el estudio de la función de Ral en linfocitos primarios, los ratones *RalGDS*<sup>-/-</sup> (103). Como se mencionó en la introducción, *RalGDS* es uno de los GEFs de Ral mejor estudiados; se activa a través de su interacción con Ras-GTP y su delección se traduce en menor actividad de Ral en diversos sistemas

(103, 225). Resulta pues, una buena herramienta de trabajo para comprobar *in vivo* los efectos de una disminución de la actividad de Ral en el sistema inmune.

Para cerciorarnos de que en linfocitos T realmente ocurre esta disminución de la actividad de Ral, analizamos ésta en linfocitos T de bazo de Ratones WT o *RalGDS*<sup>-/-</sup>, mediante la estimulación del TCR con anticuerpos anti-CD3ε (**Fig R5**). Comprobamos que mientras que las células WT muestran una cinética de activación de Ral similar a la que habíamos obtenido con células Jurkat, los linfocitos *RalGDS*<sup>-/-</sup> no parecen ser capaces de inducir la activación Ral correctamente en respuesta al TCR. Aún cuando no pierden por completo la capacidad de activar Ral en linfocitos, vemos una disminución en esta, así que decidimos utilizar este modelo para el estudio de la función de nuestra GTPasa en linfocitos.

**La ausencia de *RalGDS* no se traduce en defectos de poblaciones hematopoyéticas ni en bazo ni en nódulos linfáticos.**

El eje *RalGDS*-Ral es una de las rutas efectoras del oncogén Ras. Se ha descrito anteriormente en otros modelos, concretamente en cáncer, que algunas de las funciones y efectos celulares de Ras pueden inhibirse al eliminar la actividad de Ral (110, 220).



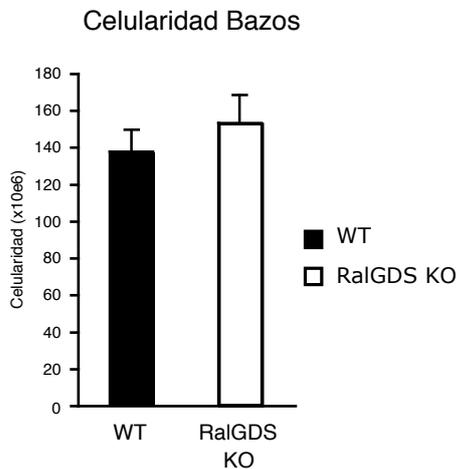
**Figura R5:**

Los linfocitos T de ratones *RalGDS*<sup>-/-</sup> muestran menores niveles de activación de Ral en respuesta a la estimulación del TCR. Estimulamos esplenocitos extraídos de ratones WT y *RalGDS*<sup>-/-</sup> con anticuerpos anti-CD3ε (1µg/ml), y a

continuación con 1µg/ml de anticuerpo anti-Armenian and Syrian Hamster IgG durante los tiempos indicados. Se lisaron las células y el extracto se usó en ensayos de pulldown utilizando GST-RalBP1 RBD. Se muestran los experimentos de Western Blot con anticuerpos contra RalA, en el experimento de pulldown y en el lisado total. El gráfico representa la media ± DE de la señal de RalA-GTP respecto a los niveles totales de Ral, a diferentes tiempos; las unidades (UA) representan la inducción respecto al t=0 (N=4).



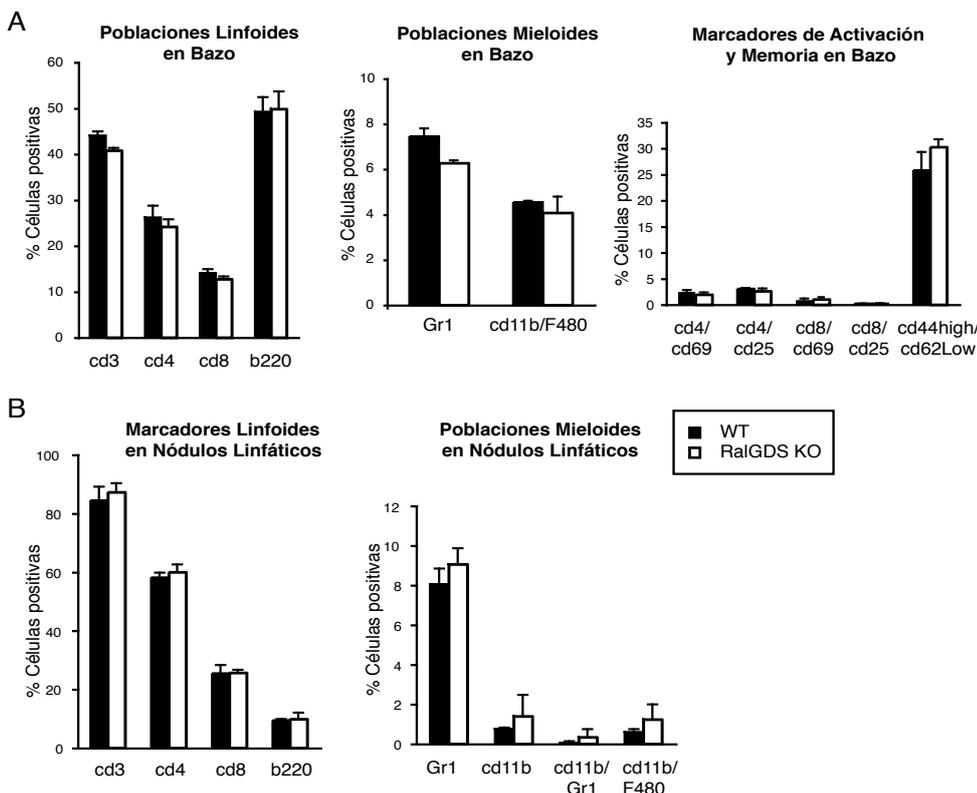
Teniendo en cuenta que tanto en el sistema inmune en general y en los linfocitos en particular, Ras es esencial tanto en su desarrollo como en su función, la ausencia de actividad de Ral podría traducirse en defectos importantes.



**Figura R6:**  
Los ratones RalGDS<sup>-/-</sup> no presentan alteraciones en el tamaño y celularidad del bazo:  
 Para cuantificar el número total de células de cada bazo se disgregó cada bazo individualmente, se lisaron los eritrocitos y se contaron el resto de células. El histograma muestra las medias ± EE de celularidad de 25 ratones de cada grupo.

Analizamos por tanto las poblaciones de origen hematopoyético en bazos y nódulos linfáticos de ratones adultos control y RalGDS<sup>-/-</sup>, haciendo hincapié en los linfocitos T. No detectamos alteración alguna en el tamaño ni en la celularidad de los bazos de estos animales (**Fig R6**). Ni en bazo ni en nódulos observamos diferencias significativas al utilizar marcadores de poblaciones linfoides o mieloides (**Fig R7 A y B; D y E**); sin embargo, y en contra de lo esperable, tampoco detectamos alteraciones en marcadores de activación o de memoria (C).

Los animales usados en los experimentos anteriores eran jóvenes, de pocos meses de edad. Pudiera ocurrir que los ratones RalGDS<sup>-/-</sup> presentasen algún defecto en la correcta terminación de la respuesta inmune, en ese caso, a lo largo del tiempo se irían acumulando alteraciones en las poblaciones hematopoyéticas y podría revelarse una alteración inicialmente enmascarada. Asimismo, alteraciones en la actividad de Ras se han correlacionado con desórdenes autoinmunes, por lo que podría ser que los RalGDS<sup>-/-</sup> mostrasen defectos similares<sup>(185)</sup>. Por ello estudiamos los mismos marcadores que en el experimento anterior en ratones envejecidos, de 2 años de edad (**Fig R8**). Tampoco en esta



**Figura R7:**  
Las poblaciones hematopoyéticas de los ratones RalGDS<sup>-/-</sup> no presentan ningún defecto aparente:  
 Extrajimos bazos y nódulos linfáticos axilares de ratones WT y RalGDS<sup>-/-</sup>, lisamos los eritrocitos, y teñimos las células con combinaciones de anticuerpos específicos acoplados a fluoróforos para analizar las poblaciones hematopoyéticas por citometría de flujo. Los histogramas muestran el porcentaje de células positivas para cada marcador respecto al total de células, en bazo (A) y en nódulos linfáticos (B).

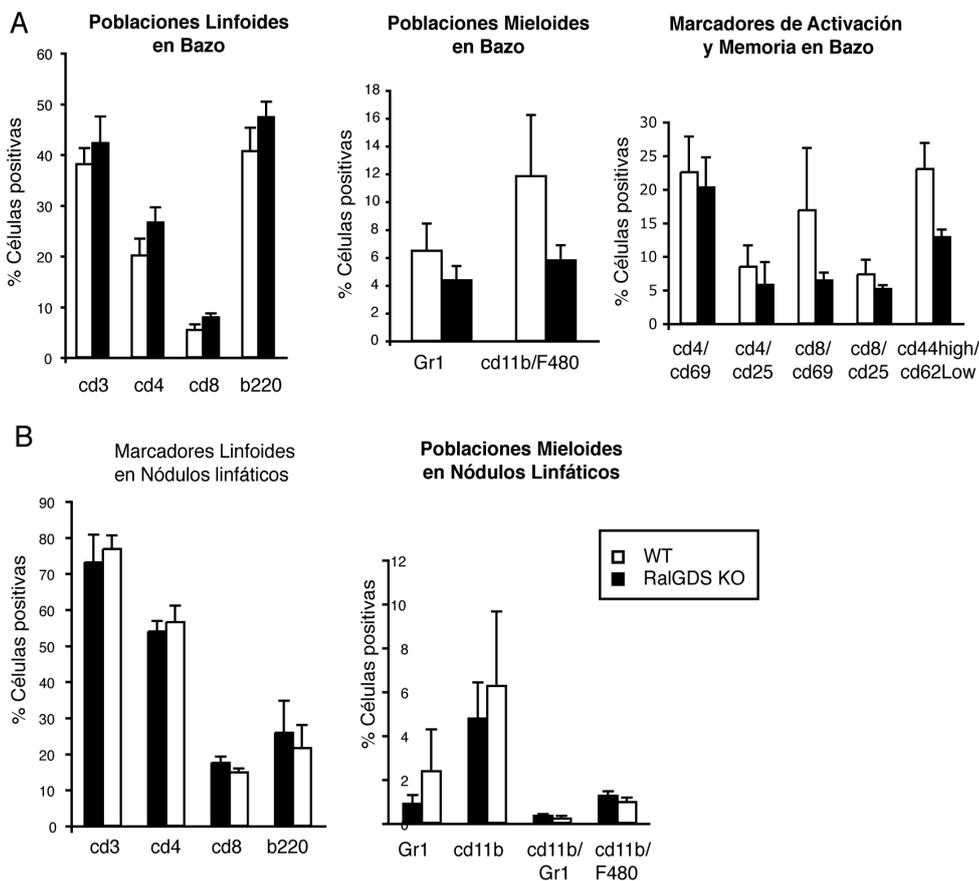
ocasión apreciamos ningún cambio notable; aunque podría intuírse un defecto en las células T de memoria CD44<sup>high</sup>/CD62L<sup>low</sup>, la diferencia no es estadísticamente significativa.

Hay que tener en cuenta que los animales viven en un ambiente libre de patógenos, por lo que es posible que existan defectos funcionales que no estemos detectando porque los animales no han sufrido ningún estrés provocado por infecciones. Así pues estudiamos la activación de linfocitos T de ratones RalGDS<sup>-/-</sup> y WT aislados y activados *ex vivo*.

**CD25/69 y proliferación en estimulación de linfocitos T naïve.**

Ral podría tener algún papel en la transducción de señales que llevan a una completa activación de la célula T. Tal y como mencionamos anteriormente, Ral ya ha sido relacionado con transcripción génica; se ha publicado que podría regular NFκB en fibroblastos<sup>(114)</sup> y AP-1 y NFAT en líneas de células B<sup>(69)</sup>. Aislamos linfocitos T de Ratones WT y RalGDS<sup>-/-</sup> y los estimulamos

en placas tapizadas con anticuerpos anti-CD3ε o -CD3ε y -CD28. Estudiamos a diferentes tiempos tanto la proliferación de estas células, un parámetro que nos indica la eficiencia de la activación, como la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD25 (**Fig R9**). Una manera sencilla de medir la proliferación consiste en medir la incorporación de <sup>3</sup>H-Timidina por linfocitos activados; este nucleótido tritiado se incorpora al DNA a medida que se sintetizan nuevas cadenas durante el ciclo celular y su medición nos indica el grado de proliferación celular. Sin embargo, los linfocitos T de ratones RalGDS<sup>-/-</sup> no presentan alteraciones notables en la proliferación cuando estimulamos el TCR de diversas maneras (**Fig R9A**). También analizamos la expresión en membrana de marcadores de activación como CD69 (**Fig R9B y D**) o la subunidad α del receptor de interleuquina 2 CD25 (**Fig R9C y E**) en presencia (**B y C**) o en ausencia de IL2 (**D y E**) suplementada en el medio de cultivo. Estudiamos la expresión de marcadores de activación en ausencia de interleuquina 2 para comprobar si existía algún defecto en la secreción de IL2 en los linfocitos RalGDS<sup>-/-</sup>. Sin embargo, en ninguno

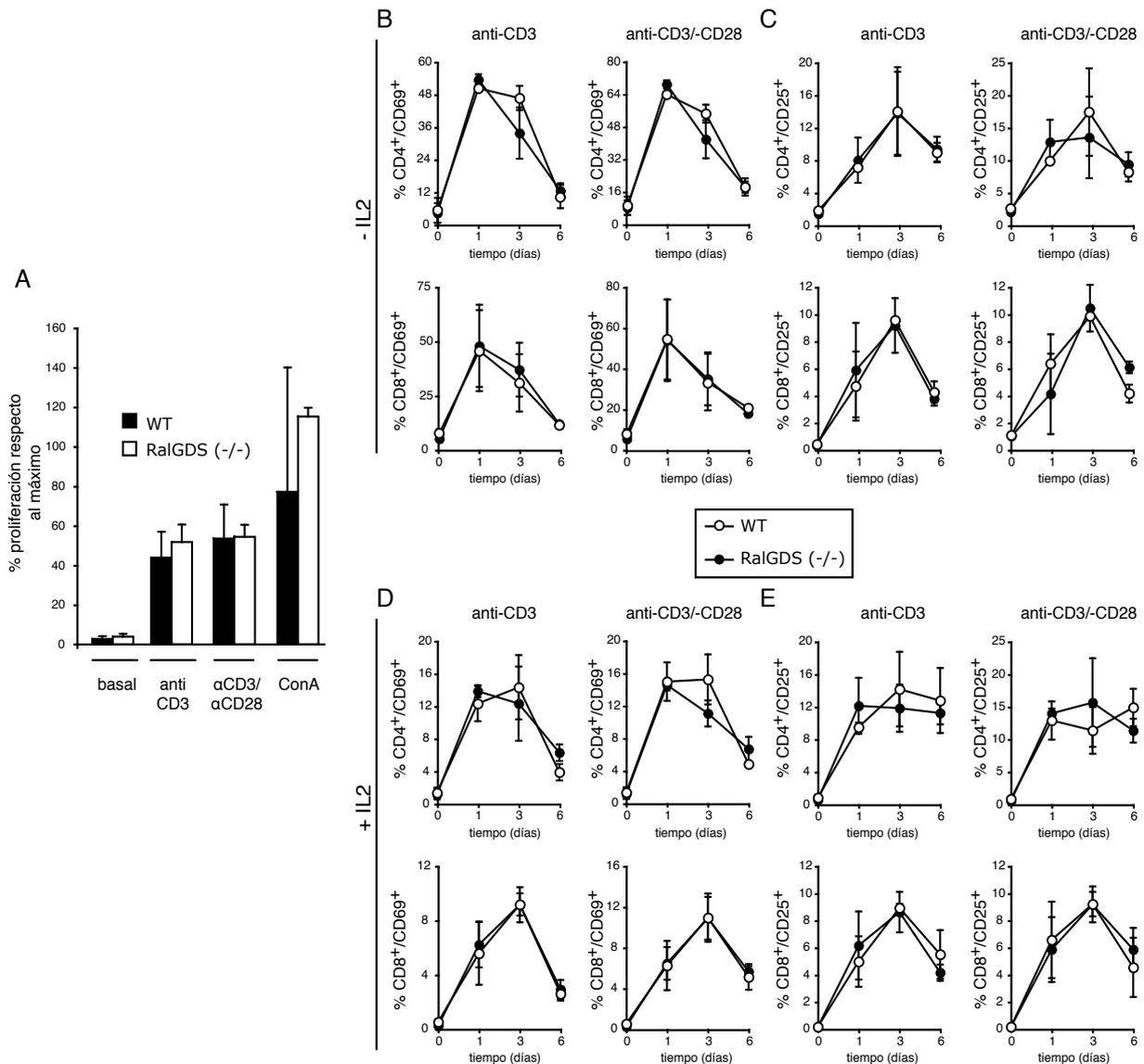


**Figura R8:** Los ratones RalGDS<sup>-/-</sup> envejecidos no presentan alteraciones en las poblaciones hematopoyéticas. Extrajimos bazos y nódulos linfáticos axilares de ratones WT y RalGDS<sup>-/-</sup> de dos años de edad, lisamos los eritrocitos, y teñimos las células con combinaciones de anticuerpos específicos acoplados a fluoróforos para analizar las poblaciones hematopoyéticas por citometría de flujo. Los histogramas muestran el porcentaje de células positivas para cada marcador respecto al total de células, en bazo (A) y en nódulos linfáticos (B).



de los casos analizados observamos diferencia alguna con respecto a los ratones silvestres. Por tanto a pesar de que en los linfocitos T Ral se expresa, se activa y relocaliza a la interfase APC-linfocito T, la reducción de su actividad mediante la eliminación de RalGDS no parece tener un gran

impacto en la activación y proliferación de estos, ni en el desarrollo de las diferentes poblaciones hematopoyéticas y linfoides. En la **Figura R5** se observa, aunque leve, incremento en RalGTP en respuesta a la estimulación del TCR en linfocitos RalGDS<sup>-/-</sup>, probablemente gracias a la acción



### Figura R9:

Los linfocitos T de los ratones RalGDS<sup>-/-</sup> no presentan defectos en marcadores de activación ni en proliferación en respuesta al estímulo de su TCR:

Extrajimos esplenocitos de bazos de ratones WT y ratones RalGDS<sup>-/-</sup> y los sembramos en placas tapizadas con anticuerpos contra CD3ε o CD3ε y CD28 durante los tiempos indicados en los histogramas y gráficos. (A) Medición de la proliferación celular de los linfocitos T por incorporación de <sup>3</sup>H-Timidina. Los histogramas muestran en cada condición las medias del porcentaje de proliferación respecto al máximo en cada experimento, +DE. N=3. (B y D) Se recogieron las células a los tiempos indicados y se tiñeron con anticuerpos específicos contra CD69 y CD4 o CD8. En B las células no se suplementaron con IL2 adicional, mientras que en D se añadieron 100U/ml de IL2. (C y E) Se recogieron las células a los tiempos indicados y se tiñeron con anticuerpos específicos contra CD25 y CD4 o CD8. En C las células no se suplementaron con IL2 adicional, mientras que en E se añadieron 100U/ml de IL2.

de otros GEFs de Ral. Es posible que este leve incremento en la actividad sea suficiente para los efectos biológicos de Ral y que esta sea la razón por la que no observamos alteraciones notables en los ratones RalGDS<sup>-/-</sup>.

Muchas de las funciones de Ral descritas hasta el momento tienen que ver con reorganizaciones del citoesqueleto, polarización celular y secreción en compartimentos específicos; la direccionalidad de la respuesta de los linfocitos T es esencial en la función del sistema inmune, tanto en células CD4<sup>+</sup> como en CD8<sup>+</sup>. Es crítico que los linfocitos CD4<sup>+</sup> secreten citoquinas hacia las células B o macrófagos con los que interactúan; de igual modo, los linfocitos T citotóxicos y las células NK secretan su contenido lítico en un espacio muy restringido entre ellas mismas y la célula diana, evitando la autólisis o dañar otras células. La citotoxicidad mediada por gránulos líticos presenta numerosas analogías con procesos de secreción que son regulados por Ral, como la secreción neuronal <sup>(24, 274)</sup> o la secreción plaquetaria de gránulos densos <sup>(135)</sup>. Decidimos, por tanto estudiar si las GTPasas Ral regulan la citotoxicidad mediada por gránulos líticos.



## 2. Las GTPasas Ral en citotoxicidad celular:

**Ral A y RalB se activan en respuesta a estímulos inductores de citotoxicidad.**

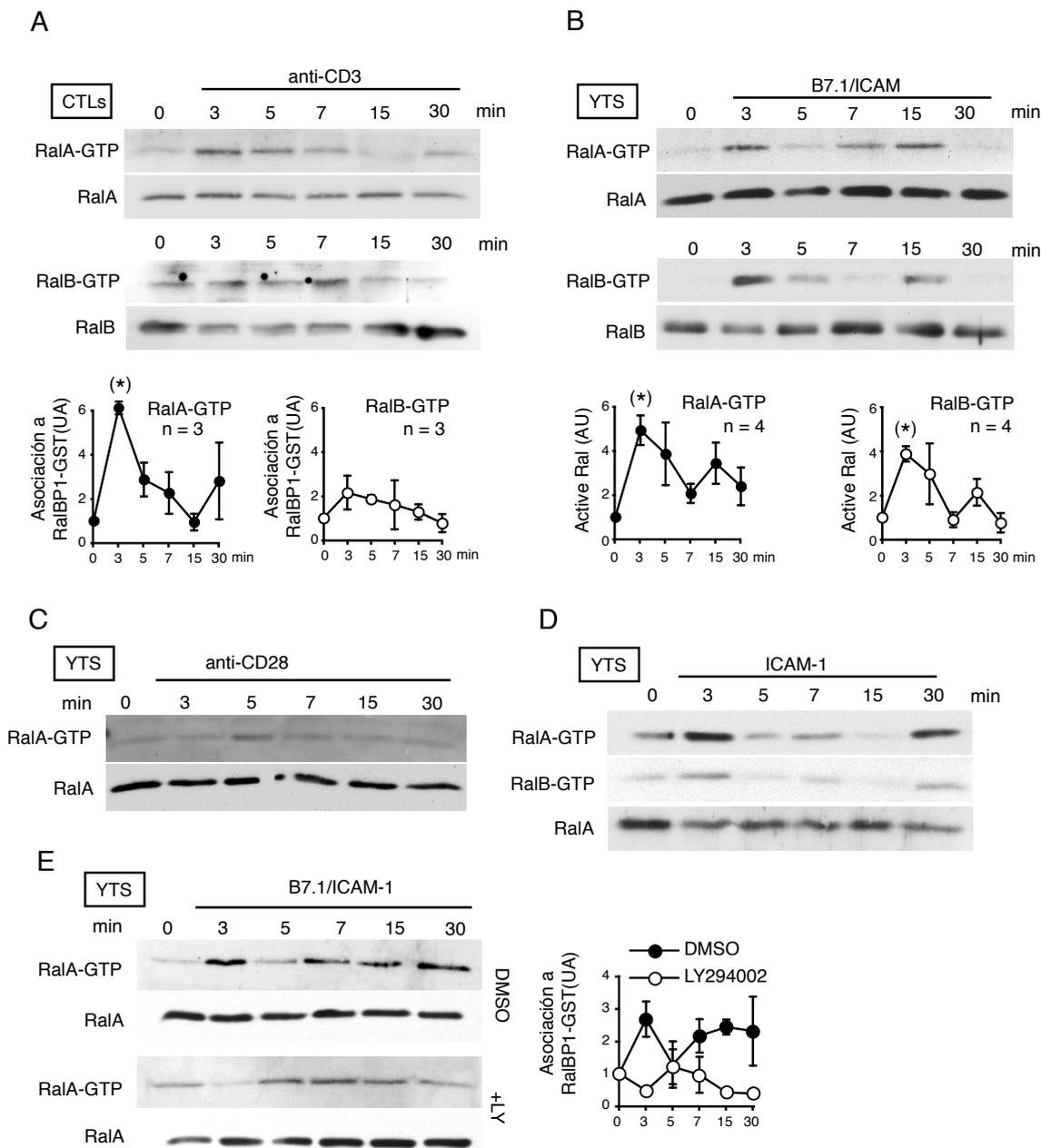
Para analizar el papel de las GTPasas Ral en citotoxicidad celular, nos pareció lógico estudiar en primer lugar si Ral se activa durante este proceso. Existen numerosas vías de señalización que intervienen durante el desarrollo de los eventos que llevan a la lisis de una célula diana; las GTPasas Ral han demostrado estar relacionadas en otros sistemas con varias de estas rutas, como Ras, PLC $\gamma$ , y Ca<sup>2+</sup>. Los mecanismos que llevan a una célula a descargar su contenido lítico sobre otra requieren en primer lugar el reconocimiento de la célula objetivo a través de una serie de receptores específicos; en CTLs esto ocurre a través de la estimulación del TCR. Para cuantificar la actividad de Ral en respuesta a la estimulación del TCR, diferenciamos linfocitos T citotóxicos (CTLs) a partir de linfocitos CD8<sup>+</sup> de ratones OT1 y los incubamos con anticuerpos contra la subunidad CD3 $\epsilon$  del TCR. Analizamos la actividad de Ral por ensayos de Pulldown en células en CTLs en los que aislamos la fracción de Ral unida a GTP. Incubamos un lisado celular, como hemos hecho anteriormente, con el dominio de unión a Ral de RBP1 fusionado a Glutación-S-transferasa (GST), y purificando el complejo Ral-GTP/RBP1-GST con esferas de sefaroza recubiertas de Glutación-S. Como vemos en la **Figura R10A**, la estimulación de CTLs con anticuerpos anti-CD3 $\epsilon$  se traduce en un fuerte incremento de la fracción activa de RalA a partir de los 3 minutos. Este incremento no es tan claro en el caso de RalB, en todo caso parece más tenue, tal como se aprecia en la cuantificación del panel inferior.

Para determinar si la activación de Ral es un fenómeno común en las células citotóxicas y no sólo de CTLs, realizamos un experimento similar en células YTS, una línea celular de NK derivada de un linfoma tímico. En células NK el proceso de activación es más complejo, ya que la puesta en marcha de los mecanismos citolíticos está controlada por un balance de señales inductoras de citotoxicidad y de otras inhibitorias. Sin embargo se ha determinado

que la señal mínima que requieren las células YTS para desencadenar su actividad citotóxica de manera completa, requiere la estimulación de la integrina LFA1 y del correceptor CD28<sup>(36, 13)</sup>. Así pues, analizamos los niveles de Ral-GTP tras incubación a diferentes tiempos células YTS con células Schneider 2 de *Drosophila melanogaster* (SC2) expresando de forma estable los ligandos de CD28 y LFA-1, B7.1 y ICAM-1.1 respectivamente (**Figura R10B**). Las células SC2 resultan de por sí arreactivas para una célula YTS, pero como son fácilmente transfectables, se pueden utilizar como plataformas de expresión de ligandos de membrana. Son muy útiles, por tanto para estudiar la respuesta celular a interacciones concretas ligando-receptor, en unas condiciones relativamente fisiológicas y menos artefactual que mediante el uso de anticuerpos. Esto ha convertido las células SC2 en un sistema ampliamente utilizado en el estudio de los requerimientos moleculares para la inducción de citotoxicidad.

Tal y como podemos ver en la **Figura R10B**, tanto RalA como RalB se activan a tiempos muy cortos, parecen perder transitoriamente actividad y luego vuelven a activarse. A diferencia de lo que ocurre en los linfocitos T citotóxicos, las cinéticas de activación de las dos isoformas son muy parecidas, como podemos ver en la cuantificación del panel inferior.

El hecho de que Ral se induzca en células YTS en respuesta a la estimulación de CD28 y LFA1 resulta interesante, además de por el hecho de que confirma que Ral se activa en diversos tipos de células citotóxicas, porque introduce a Ral en las vías de señalización de estas dos moléculas de superficie que hasta ahora no se habían relacionado con esta GTP-asa. Por ello, aunque nuestro interés principal se centraba en cómo podría regular Ral los mecanismos que llevan a citotoxicidad, decidimos comprobar si la activación de Ral depende mayoritariamente de uno u otro de estos receptores; estimulamos células YTS con anticuerpos anti-CD28 o con células SC2 expresando de manera estable ICAM1.1 y analizamos la inducción de Ral-GTP por pulldown. Las **Figuras R10C y D** muestran que en ambos casos se produce activación de Ral, así que es posible que sea relevante para la señalización de ambos receptores. En cualquier caso, el modo por el cual Ral llega a ser activado



**Figura R10:**

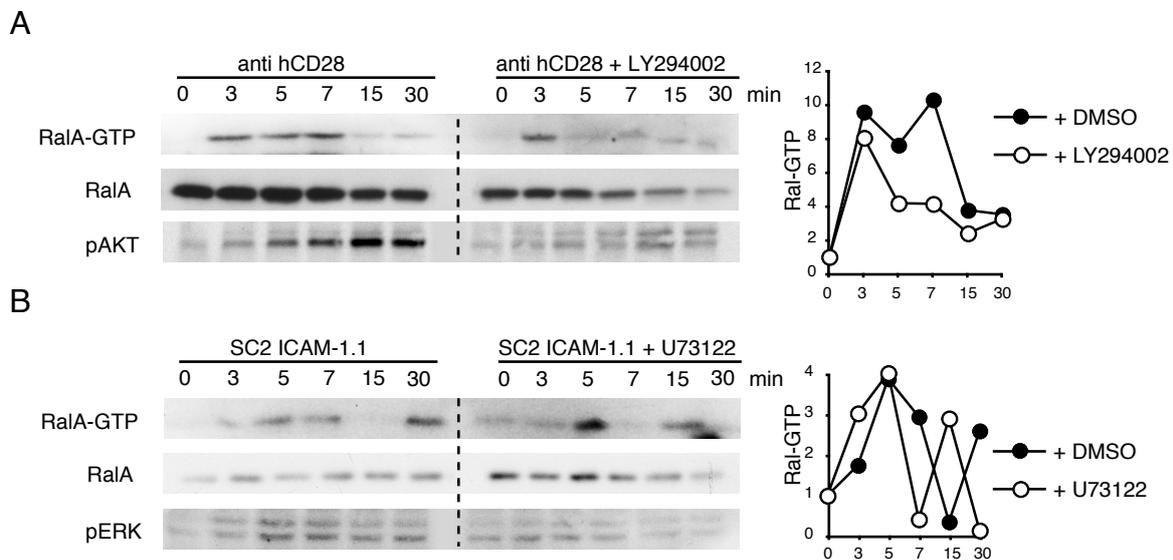
Las GTP-asas Ral se activan en respuesta a estímulos inductores de citotoxicidad celular:

Sometimos diferentes tipos celulares a estímulos que inducen mecanismos citolíticos, lisamos las células y utilizamos 1mg del extracto proteico de estos lisados para detectar la fracción activa de Ral mediante ensayos de pulldown utilizando RalBP1-GST como cebador, seguidos de Western Blot usando anticuerpos contra RalA o RalB (A) Estimulamos CTLs de ratón OT1 con anticuerpos anti-CD3ε (1µg/ml) y a continuación con 1µg/ml de anticuerpo anti-Armenian and Syrian Hamster IgG. El gráfico representa la media ± EE de la señal de RalA o B, a diferentes tiempos; las unidades (UA) representan la inducción respecto al t=0 (N=2). (B). Se incubó la línea de NK YTS con células Schneider SC2 expresando B7.1/ICAM-1.1, en proporción 1:1 durante los tiempos indicados. Se cuantificaron las señales como en el apartado anterior (N=4) (C) Estimulación de células YTS con anticuerpo anti-CD28 (1µg/ml), pulldown y WB contra RalA. (D) Estimulación de células YTS con células Schneider SC2 expresando ICAM-1.1, pulldown y WB contra RalA y RalB. (E) Se trataron células YTS con LY294002 o DMSO (vehículo), se estimularon con células Schneider SC2 expresando B7.1/ICAM-1.1, en proporción 1:1. A continuación se realizó un pulldown con RalBP1-GST y WB contra RalA. La cuantificación se realizó como anteriormente.



al estimular CD28 o LFA-1 no resulta obvio. En el caso de LFA-1, podría ser que la activación de Ral dependiese del eje PLD-DAG-RasGRP-Ras o PLC $\gamma$ 1-DAG-RasGRP-Ras, pues ambas vías de señalización parecen transducir las señales de “fuera a dentro” de LFA-1 (183, 132, 139); en el caso de CD28 la cuestión nos resulta menos clara. Como dato adicional sobre los mecanismos implicados en la estimulación de Ral-GTP, pudimos comprobar que existe una considerable contribución por parte de la señalización a través de PI3K (**Figura R10E**); realizamos una estimulación completa (utilizando SC2+B7.1 y ICAM1.1) de células YTS en ausencia y en presencia de LY294002, un inhibidor reversible de la actividad catalítica de las PI3K. Comprobamos cómo la inhibición de la actividad de PI3K impide en gran medida la activación de RalA, que no llega a estimularse de manera notable en ningún momento. Refinamos éste experimento estimulando las células YTS solamente con anticuerpos contra CD28, preincubando las células con DMSO o con LY294002 (**Fig R11A**), y comprobamos que la

activación de RalA en presencia del inhibidor de PI3K resulta mucho más transitoria. Realizamos también un Western Blot contra Akt fosforilado como control de que el inhibidor de PI3K estaba funcionando. Como dijimos en la introducción, se ha descrito una interacción de PDK1, un efector de PI3K, con RalGDS, uno de los GEFs de Ral; esta interacción estimula la actividad de RalGDS al inducir un cambio conformacional que libera un dominio inhibitorio en su N-Terminal. Tanto PI3K como PDK1 están implicados en la correcta respuesta a CD28 (277), así que esto podría explicar la activación de Ral. Por último, y para cerciorarnos de que como pensábamos, el responsable de la activación de Ral por LFA-1 es Ras, incubamos las células YTS con el inhibidor general de las PLC U73221 y las activamos con células SC2 expresando ICAM1.1 en membrana (**Fig R11B**). El inhibidor de PLC impediría la estimulación de RasGRP por DAG, y por tanto la activación de Ras, por lo que si Ral depende de esta ruta, su actividad debería verse afectada. Sin embargo, comprobamos que las cinéticas de activación, en



### Figura R11:

Análisis de los mecanismos de activación de RalA en respuesta a CD28 o LFA-1.

(A) Las células YTS fueron deplecionadas durante 2h y a continuación se incubaron 30min en presencia de 20 $\mu$ M LY294002 o DMSO como control del disolvente. Las células se lavaron y se incubaron con anticuerpos contra CD28 humano durante los tiempos indicados. Las muestras se lavaron, lisaron y sometieron a ensayos de pulldown, que se analizaron por Western Blot. El panel de la derecha muestra la cuantificación de RalA-GTP en unidades arbitrarias. (B) Las células YTS fueron deplecionadas durante 2h y a continuación se incubaron 30min en presencia de 10 $\mu$ M U73122 o DMSO como control del disolvente. Tras lavarlas, se incubaron con células Schneider SC2 que expresan ICAM-1.1, en proporción 1:1 durante los tiempos indicados. Las células se lisaron y se utilizaron los extractos proteicos para ensayos de pulldown de la misma manera que en (A).

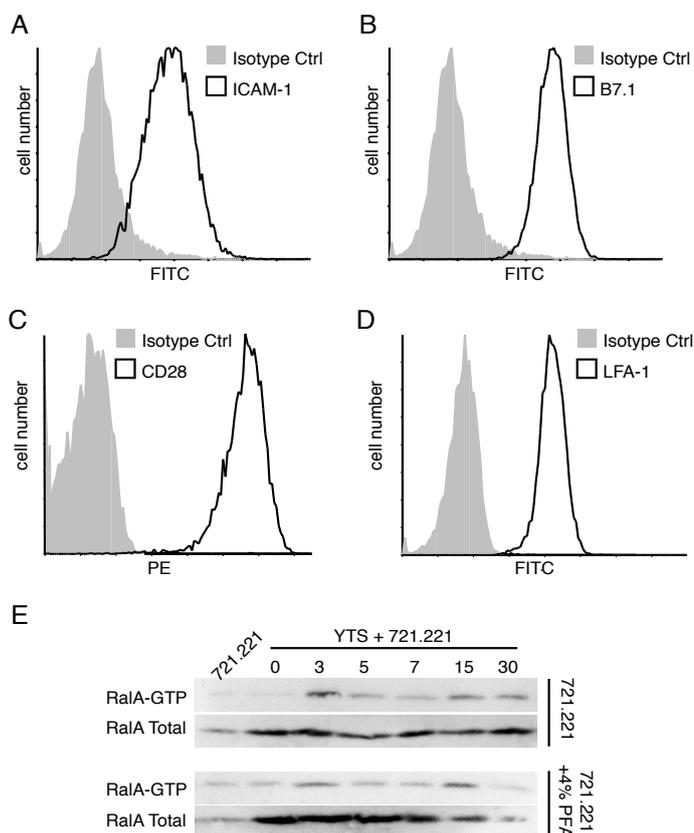
presencia o en ausencia de U73221, son bastante parecidas a pesar de que se aprecia una notable disminución en el ERK fosforilado. Esto sugiere que LFA-1 está activando a Ral de una manera no dependiente de Ras. Será interesante estudiar en el futuro en mayor profundidad los mecanismos concretos que llevan a la activación de Ral por LFA-1.

**Ral A y RalB se encuentran en los gránulos líticos en células citotóxicas.**

Una vez determinada la actividad de Ral en nuestro modelo experimental quisimos determinar el compartimento celular donde se encuentran estas GTPasas; por esta razón teñimos RalA y B en células YTS tanto en estado de reposo como expuestas a células diana de origen linfoblastoide 721.221, ampliamente utilizadas en experimentos con YTS (55, 200, 279). No sólo carecen de MHC-I, algo que comparten con otras células diana como las K562, sino que además expresan B7.1 y estimulan CD28 en la célula efectora. Aún así, para comprobar que los datos sobre la activación de Ral obtenidos en células SC2 son

extrapolables a las células 721.221, comprobamos la expresión de ICAM1.1 y B7.1 en estas células (Fig R12A y B). Determinamos también por citometría los niveles de expresión de CD28 y LFA-1 en nuestras células YTS (FigR12Cy D). También nos cercioramos, a través de ensayos de pulldown, de que Ral se estimula en células YTS en respuesta a la incubación con células 721.221 (Fig R12E). Teniendo en cuenta que las células 721.221 son humanas y que nuestros anticuerpos reconocen Ral humano, decidimos incubar las células YTS con células 721.221 sin tratar o fijadas previamente con paraformaldehído al 4%. De esta manera nos aseguramos de que el Ral activo observado en el ensayo de pulldown corresponde a las células YTS. En la Figura R12C vemos como Ral se activa de manera muy similar a cuando las células YTS son incubadas con células SC2, tanto fijando como sin fijar las células diana 721.221. Por lo tanto los resultados obtenidos en los experimentos de activación usando SC2+B7.1 y ICAM1.1 son extrapolables a los experimentos funcionales con 721.221 que discutiremos en adelante.

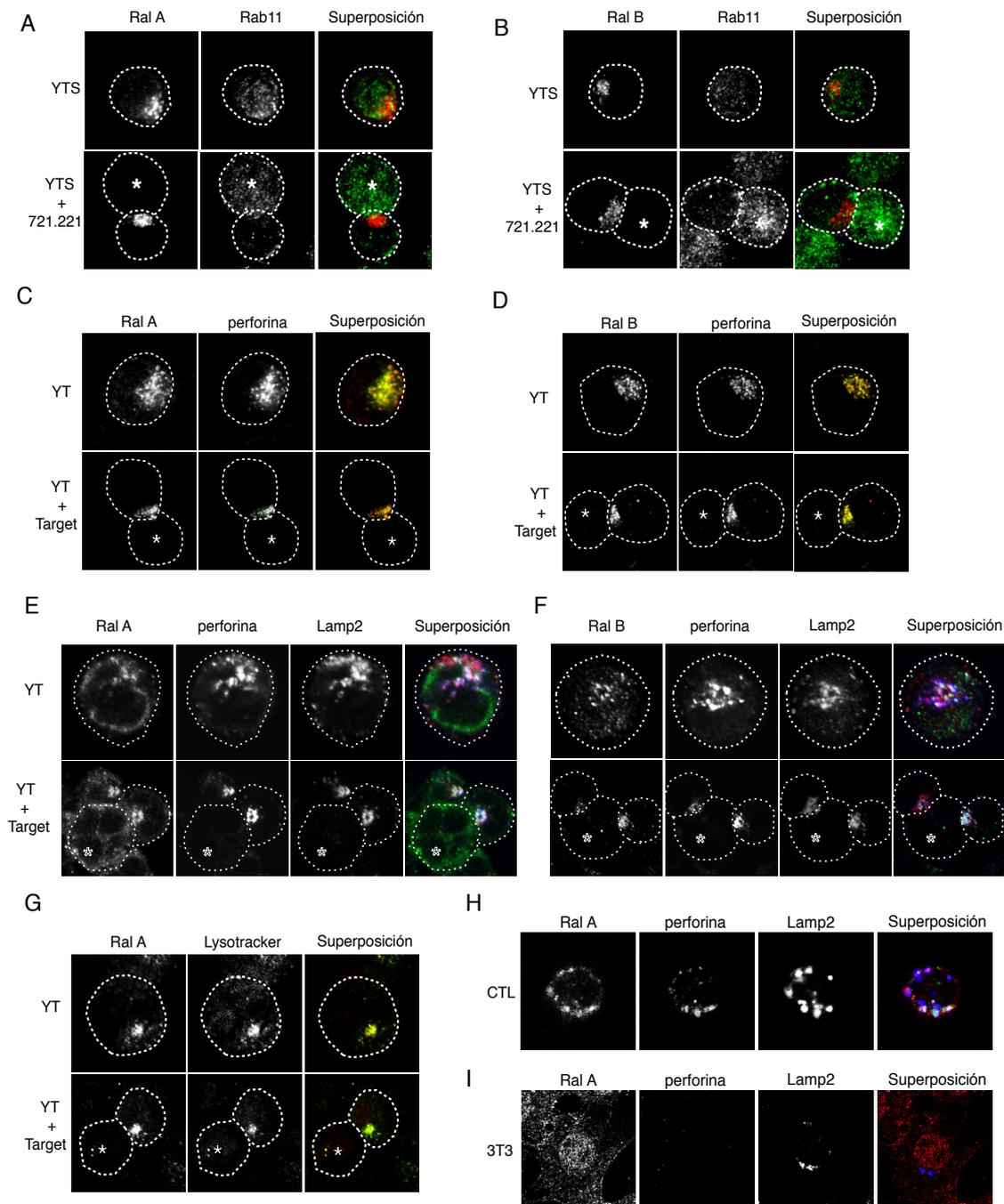
Numerosas publicaciones sitúan a Ral en la membrana celular y en algunos casos en



**Figura R12:**

Las células 721.221 expresan ICAM1 y B7.1, y son capaces de inducir activación de Ral en células 721.221:

Analizamos la expresión de ICAM-1 y B7.1 en células 721.221 tiñéndolas con anticuerpos específicos contra CD54 humano (ICAM1), CD80 humano (B7.1) o un control isotípico de IgG de hámster, todos unidos a FITC. Cuantificamos la tinción mediante citometría de flujo y comparamos la señal de ICAM-1 o B7.1 con la del control isotípico (A y B). De la misma manera estudiamos los niveles de CD28 y LFA-1 en las células YTS, esta vez con anticuerpos específicos contra CD28 humano y CD11a humano, respectivamente. E) Se incubaron células YTS con células 721.221 en proporción 1:1 durante los tiempos indicados. Se utilizaron células 721.221 sin fijar (parte superior) o prefijadas con PFA al 4% para la estimulación. Los lisados fueron sometidos a ensayos de pulldown con RalBP1-GST y analizados por WB.



### Figura R13:

Ral A y RalB se encuentran asociados a los gránulos líticos en células YTS:

Analizamos la localización de las GTPasas Ral mediante inmuofluorescencia utilizando anticuerpos específicos de las isoformas de Ral y de marcadores de diferentes compartimentos celulares. (A y B) Se tiñeron células YTS, en reposo o incubadas con células 721.221 en proporción de 4:1, con anticuerpos anti-RalA (A) o -RalB (B) y -Rab11. En la superposición, el rojo corresponde a RalA o B y verde a Rab11. (C y D) Tinción con anti-RalA (C) o a-RalB (D) junto a anti-perforina. En la superposición, el rojo corresponde a RalA o B y verde a perforina. (E y F) triple tinción con anti-RalA o -RalB, junto con anti-Lamp2 y anti-perforina. En la superposición Ral está representado en verde, Lamp2 en azul y perforina en rojo. (G) Preincubamos células YTS con el marcador lisosomal Lysotracker (75nM), y las teñimos con anti-RalA como anteriormente. En la superposición RalA está representado en verde y Lysotracker en rojo. Tinción de RalA en CTLs (H) de ratón, o en NIH-3T3 (I) con anticuerpos anti-RalA, junto con anti-Lamp2 y -perforina. Los colores en la superposición son los mismos que en (E).

compartimentos relacionados con endosomas tempranos o del sistema de reciclaje <sup>(56, 239, 255)</sup>. El endosoma de reciclaje tiene un papel fundamental en la citotoxicidad celular, puesto que es necesaria una interacción heterotípica entre este compartimento, el endosoma tardío y los gránulos líticos <sup>(179)</sup>. Pensamos que en las células YTS Ral podría encontrarse, pues, en el endosoma de reciclaje. Para comprobar esto teñimos el endosoma de reciclaje con anticuerpos específicos contra Rab11, marcador de este compartimento, y teñimos además RalA o RalB (**Fig R13A y B**) Tanto Rab11 como RalA o B muestran un patrón vesicular en el citoplasma, pero para nuestra sorpresa, no parecen compartir el mismo compartimento. En el panel inferior de ambos apartados mostramos contactos con células 721.221, en los cuales observa cómo RalA y B se acumulan junto a la zona de contacto al igual que habíamos observado con las células Jurkat. También se observa cierto enriquecimiento de Rab11 en la zona de contacto.

En algunos tipos celulares, no obstante, Ral se halla en las vesículas que van a ser secretadas; se ha encontrado por ejemplo Ral en vesículas sinápticas <sup>(24)</sup> y en gránulos densos en plaquetas <sup>(176)</sup>. Con estos precedentes, pensamos que Ral podría hallarse en los propios gránulos líticos, por lo que realizamos una tinción de RalA o B junto con anticuerpos específicos contra perforina (**Fig R13C y D**). Podemos ver que tanto RalA como RalB muestran una localización similar a la de perforina, no sólo en presencia de células diana, sino ya en estado de reposo. Esto nos indica que ambas isoformas de Ral se encuentran en los gránulos líticos en las células YTS, y que se mueven con ellos a la zona de la sinapsis al contactar con una célula diana.

A continuación realizamos una serie de tinciones para confirmar que las proteínas Ral se encuentran en estos gránulos. Al ser lisosomas especializados con capacidad de secretarse, contienen marcadores lisosomales como la proteína asociada a lisosomas 1 y 2, o Lamp1 y Lamp2 (también denominadas CD107a y b respectivamente). Por esta razón realizamos una tinción con Ral, y Lamp2 (**Fig R13E y F**). La tinción confirma nuestro resultado anterior, ya que ambas proteínas parecen compartir la misma distribución, tanto en ausencia como en presencia de células diana. Otro marcador que nos resulta

de utilidad para marcar los lisosomas y que no requiere tinción con anticuerpos es el LysoTracker. Éste es un colorante fluorescente y acidotrópico que se acumula en compartimentos celulares de pH bajo, como los lisosomas. Como vemos en la figura C2G, la localización de RalA coincide con los compartimentos donde la señal de LysoTracker es más intensa. En nuestro sistema celular, por tanto, RalA y B se encuentran en los gránulos líticos. Para estar seguros de que esto no es sólo una característica de nuestra línea de células NK realizamos una triple tinción de RalA, perforina y Lamp2 en linfocitos T citotóxicos, CTLs (**Fig R13H**). La tinción con los tres anticuerpos coincide en los mismos compartimentos, por lo que podemos concluir que la presencia de Ral en los gránulos líticos es una característica común de las células citotóxicas.

La localización de Ral en el lisosoma parece que está restringida a las células citotóxicas, ya que la tinción de Ral A y Lamp2 en la línea de fibroblastos 3T3 (**Fig R13I**) muestra cómo ambas proteínas están en compartimentos diferentes.

**La disminución de los niveles de RalA o RalB reduce la capacidad citotóxica de las células YTS.**

En los apartados anteriores hemos determinado que las proteínas Ral se hallan en los gránulos líticos de células citotóxicas y se activan cuando estas células reciben la señal que las lleva a eliminar una célula diana. Es lógico, pues, pensar que la disminución de los niveles de Ral reducirá la capacidad citotóxica de una célula. Con el fin de comprobar esto medimos la inducción de lisis de células YTS sobre células 721.221 utilizando el colorante Alamar Blue <sup>(195)</sup>. Este producto tiene un color azulado, pero al ser oxidado en las mitocondrias de células metabólicamente activas, vira de color de manera cuantificable con un citofluorómetro, cuando estimulamos con una longitud de onda de 530nm y medimos la emisión a 590nm. Esta emisión será menor, por tanto, cuantas menos células vivas haya en un pocillo. Teniendo en cuenta la emisión de las diferentes concentraciones de células YTS y la de células 721.221 en reposo, y comparándolas con la emisión de la incubación de las dos líneas, podemos cuantificar la muerte de las células diana, de esta manera:



$$\frac{(\text{Células 721.221 en reposo}) - [(\text{Células YTS} + \text{Células 721.221}) - (\text{Células YTS en reposo})]}{(\text{Células 721.221 en reposo})} \times 100$$

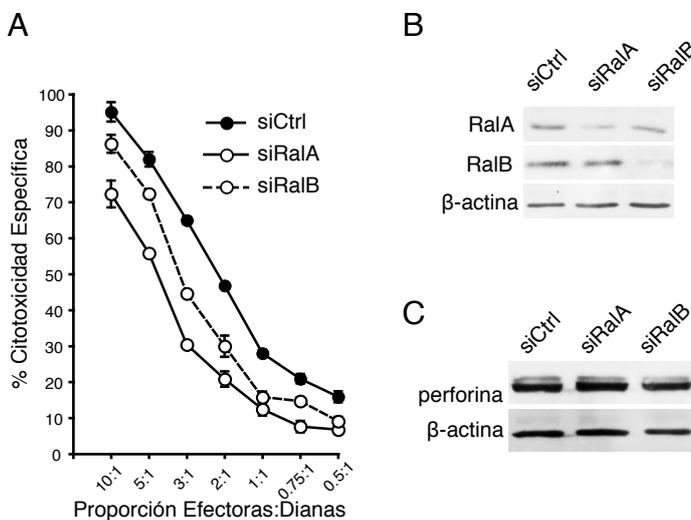
Esta fórmula nos indica el porcentaje de células 721.221 muertas respecto al total de 721.221, porcentaje que se denomina citotoxicidad específica <sup>(195)</sup>. Anteriores trabajos utilizando este método <sup>(10)</sup>, demuestran que tiene la ventaja de que no es radiactivo, es fácilmente cuantificable, extremadamente sensible y no necesita grandes cantidades de células.

Para comprobar el impacto de la reducción de Ral en citotoxicidad, utilizamos la tecnología de siRNAs y shRNAs para reducir los niveles de proteína de RalA y RalB en células YTS. En primer lugar nucleofectamos siRNAs control, contra RalA o contra RalB en células YTS y a las 48h realizamos experimentos de citotoxicidad con Alamar Blue usando diferentes concentraciones de células efectoras. La reducción de cualquiera de las isoformas de Ral reduce la capacidad citotóxica de las células YTS (**Fig R14A**), aunque parece que el impacto del siRNA de RalA es mayor que el de RalB. Tal y como mostramos en el apartado B, los siRNAs son específicos de su isoforma e inhiben alrededor de un 80% de la expresión de la proteína.

Para descartar que los defectos

observados se debiesen a algún tipo de defecto de señalización que tuviese como consecuencia una menor producción de gránulos líticos o su contenido, analizamos por WB los niveles de perforina en las células expresando los siRNAs utilizados (**Fig R14C**). Como se puede observar, no parece haber ninguna diferencia en los niveles de esta proteína al reducir los niveles de RalA o RalB. Así pues, dedujimos que la disminución de la citotoxicidad debe ser causada por otro tipo de alteraciones funcionales, como veremos más adelante.

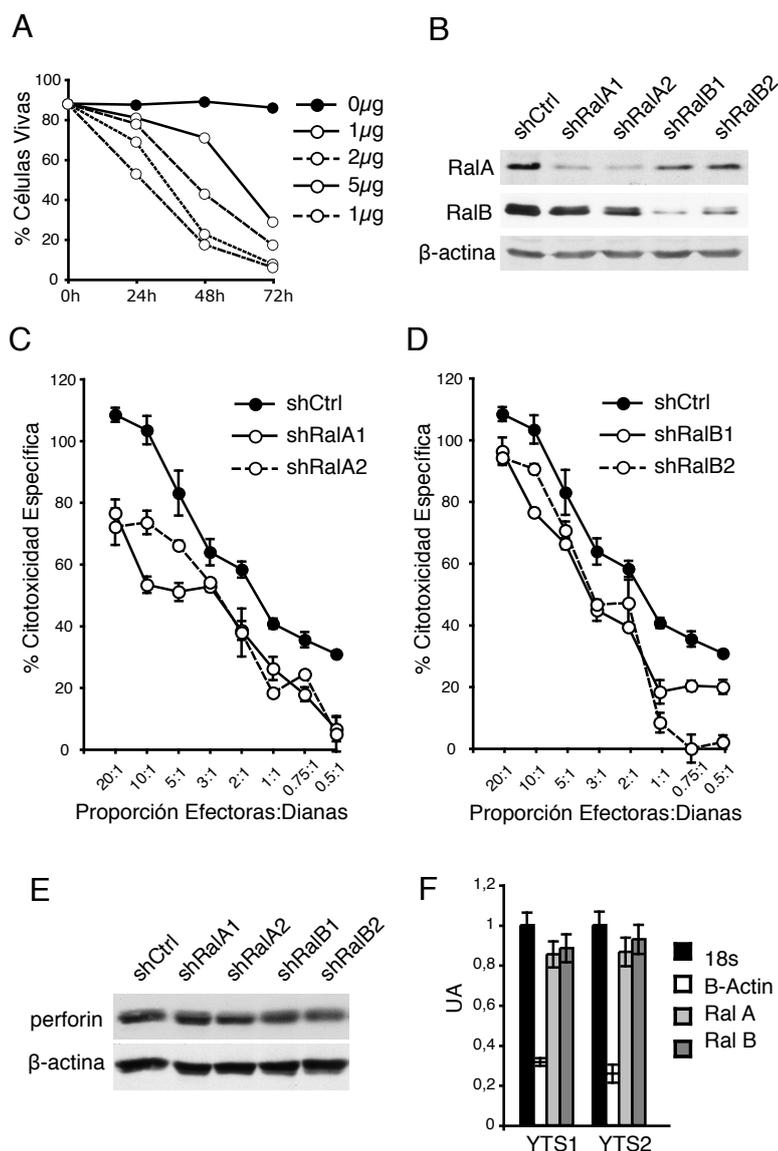
Apesar de que las secuencias de los siRNAs utilizados ha sido publicada previamente y que en otros sistemas han demostrado ser específicos, nos pareció que el uso de un solo RNA interferente para cada una de las isoformas de Ral podría ser poco riguroso. Esto nos hizo querer comprobar nuestros resultados utilizando YTS infectadas de forma estable con vectores lentivirales que codifican diferentes shRNAs para cada una de las isoformas. Los resultados que discutimos a continuación representan los obtenidos con dos shRNAs contra RalA (shRalA1 y shRalA2) y dos contra RalB (shRalB1 y shRalB2) respecto a un shRNA control (shCtrl). Como podemos ver en la **Fig R15B**, la reducción de los niveles de las dos isoformas es específica y en torno al 80%. Al analizar la capacidad citotóxica de estas células estables, confirmamos los resultados obtenidos con los siRNAs (**Fig R15C y D**). En este caso tampoco observamos diferencias en los niveles de perforina (**Fig R15E**).



**Figura R14:**

La disminución de los niveles de Ral mediante siRNAs en células YTS reduce su capacidad citolítica.

(A) Nucleofectamos células YTS con siRNAs específicos de RalA, RalB o un siRNA control, y las incubamos con células 721.221 a diferentes razones efector:diana. Se determinó la citotoxicidad mediante un ensayo de Alamar Blue. Los datos mostrados representan un experimento representativo de 3 realizados, y muestra la media ± EE de los triplicados para cada punto. (B) Análisis de la eficacia y especificidad de los siRNAs utilizados mediante WB. (C) Análisis por WB de los niveles de perforina en las células nucleofectadas con los siRNAs.



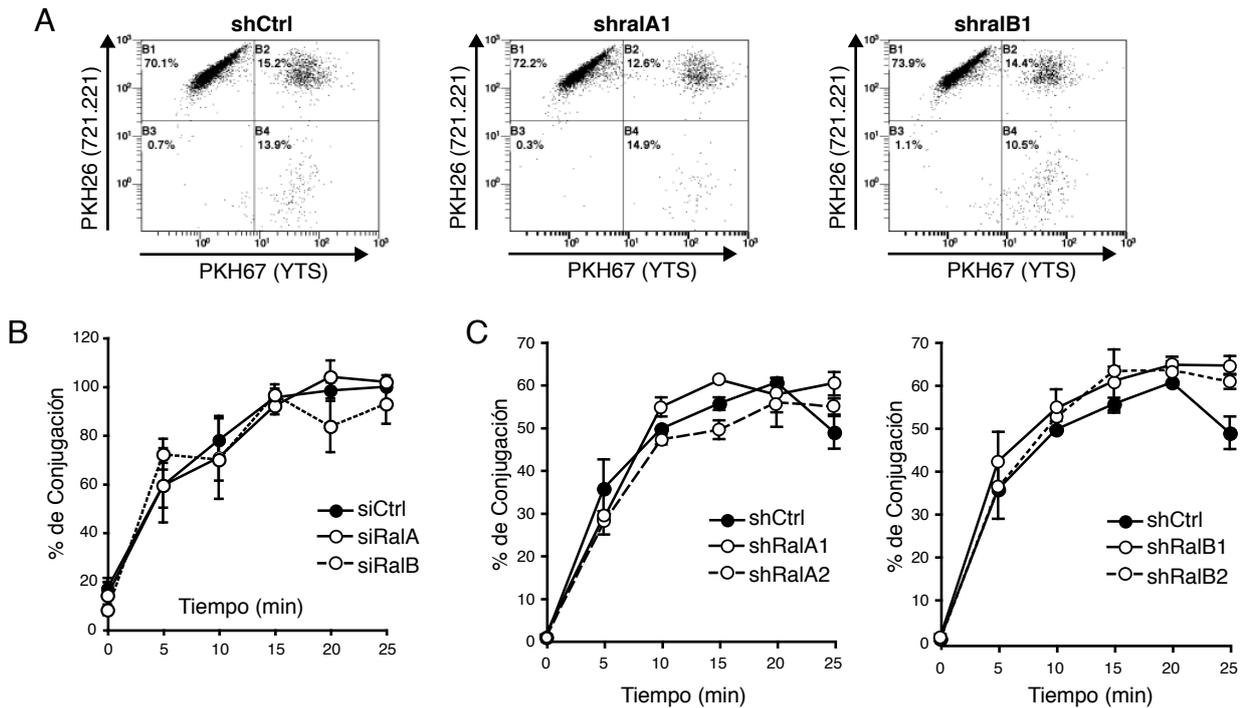
**Figura R15:**

La reducción de los niveles de Ral en células YTS expresando de forma estable shRNAs contra RalA y RalB también altera su capacidad citolítica. Infectamos células YTS con vectores lentivirales que inducen expresión de shRNAs con una secuencia control (shCtrl) o contra diferentes regiones de RalA y RalB (shRalA1/2) o shRalB1/2). Seleccionamos las células que los expresaban de forma estable mediante tratamiento con 2µg/ml de puromicina durante 10 días. (A) Determinación de la susceptibilidad de las células YTS a puromicina a lo largo de 72H. (B) Comprobación de las especificidad y eficiencia de los shRNAs mediante WB. (C y D) Ensayos de citotoxicidad utilizando Alamar Blue en células YTS expresando de forma estable shRNAs contra RalA como contra RalB. (E) Análisis por WB de los niveles de perforina en las células expresando los diferentes shRNAs utilizados. (F) Determinación de la cantidad relativa de mRNA de RalA y RalB por Q-PCR en dos cultivos independientes de células YTS, comparados con el mRNA de β-actina y al rRNA 18S.

Nuevamente observamos que la reducción de RalA induce mayores defectos en la capacidad lítica de las YTS que si interferimos RalB. En algunos tipos celulares una de las isoformas es más abundante que la otra y esto se correlaciona con que esa isoforma regula mayoritariamente ciertos procesos <sup>(229)</sup>. Sin embargo, al determinar la cantidad de mRNA de una u otra isoforma en dos cultivos independientes de células YTS, comprobamos que, al menos a nivel de mRNA, RalA y RalB se sintetizan de la misma manera. No podemos descartar, sin embargo algún tipo de regulación post-transcripcional que hiciese predominar RalA sobre RalB.

**Ral no regula la conjugación entre células YTS y sus dianas.**

La citotoxicidad es un proceso complejo que requiere la culminación de varios eventos que se ponen en marcha secuencialmente en el momento en que una célula lítica reconoce a una potencial diana. Estos subprocesos podrían resumirse en tres; en primer lugar la célula efectora debe contactar con la célula diana, establecer interacciones con ella a través de moléculas de adhesión y receptores, y reorganizar el citoesqueleto de actina para establecer una unión estable con la otra célula. Esto lo denominamos capacidad de conjugación. Un conjugado estable se constituye en una plataforma de señalización para numerosas rutas, que culminan con la polarización del centro organizador de microtúbulos (MTOC) y la maquinaria secretora a



### Figura R16:

El proceso de conjugación entre YTS y células diana 721.221 no se ve afectado por la reducción de los niveles de Ral.

Teñimos células YTS con el colorante de lipídico verde PKH67, y las incubamos con sus dianas 721.221 teñidas con el colorante PKH26, de color rojo, durante los tiempos indicados. (A) Representación de los datos obtenidos por citometría de flujo tras inducir conjugados entre YTS nucleofectadas con siRNAs y 721.221. El tiempo mostrado es de 20 minutos. (B) Representación de la conjugación, cuantificada como  $100 \times [\text{eventos positivos para rojo y verde (conjugados YTS:721.221)} / \text{eventos verdes totales (células YTS)}]$ . (C y D) Experimentos de conjugación realizados con YTS expresando shRNAs contra RalA y RalB respectivamente.

la zona de contacto con la otra célula. Finalmente los gránulos líticos, una vez polarizados a la zona de secreción, deben anclarse a la membrana y secretarse a la interfase entre célula efectora y diana.

Ral podría regular la reorganización de actina necesaria para estabilizar la sinapsis. Se ha encontrado Ral activo en lamelipodios nacientes de células MDCK y COS7 (256), un proceso que requiere una polimerización de actina y unos movimientos de membrana análogos a los de la sinapsis (95). También podrían estar relacionados con el control de la conjugación a la otra célula sus efectores RalBP1 y filamina. Se ha descrito, por ejemplo, que filamina facilita la acumulación de rafts lipídicos en la sinapsis mediada por CD28 (257); asimismo, existen indicios de que RalBP1 podría regular la actividad de cdc42. Esta GTPasa regula la polimerización de actina en numerosos sistemas a través de WASP, y se ha

correlacionado defectos en la actividad de ambas con polimerización deficiente del citoesqueleto de actina en la sinapsis inmunológica (77, 149). Otro efector de Ral, el complejo octamérico del exocisto, también se ha relacionado con procesos que requieren reorganización masiva del citoesqueleto de actina como lamelipodios (229) filopodios (251) y ondulaciones de membrana en respuesta a quimioquinas (23), aunque probablemente el papel del exocisto en estas funciones sea más el proporcionar membrana a un lugar determinado que regular el citoesqueleto de actina. Por lo tanto, es lógico hipotetizar una función para esta GTPasa en el proceso de conjugación con la célula diana.

Para comprobar esta hipótesis teñimos células YTS y 721.221 con los colorantes lipídicos PKH-67 (verde) y PKH-26 (rojo) respectivamente y las coincubamos durante diferentes tiempos a 37°C para permitir que estableciesen conjugados.

A continuación cuantificamos por citometría de flujo los eventos positivos para rojo y verde, que corresponden a células YTS:721.221 conjugadas (**Fig R16A**) Este experimento lo realizamos con células YTS nucleofectadas con los siRNA utilizados en el experimento de citotoxicidad (**Fig R16B**) y con las líneas de YTS que expresan de forma estable shRNAs contra RalA o RalB (**Fig R16C**). Sin embargo, en ninguno de los casos se aprecian diferencias significativas respecto al control cuando interferimos con la expresión de RalA o RalB. Por lo tanto, parece que el papel de Ral en citotoxicidad no está relacionado con el establecimiento de un conjugado estable.

**RalA, pero no RalB, regula la polarización de la maquinaria de secreción a la zona de contacto.**

Una vez se establece un conjugado estable y se inician los procesos de señalización, el MTOC se polariza a la zona de contacto y lleva consigo diferentes elementos de la maquinaria de secreción, incluyendo el aparato de Golgi, el endosoma de reciclaje y los gránulos líticos.

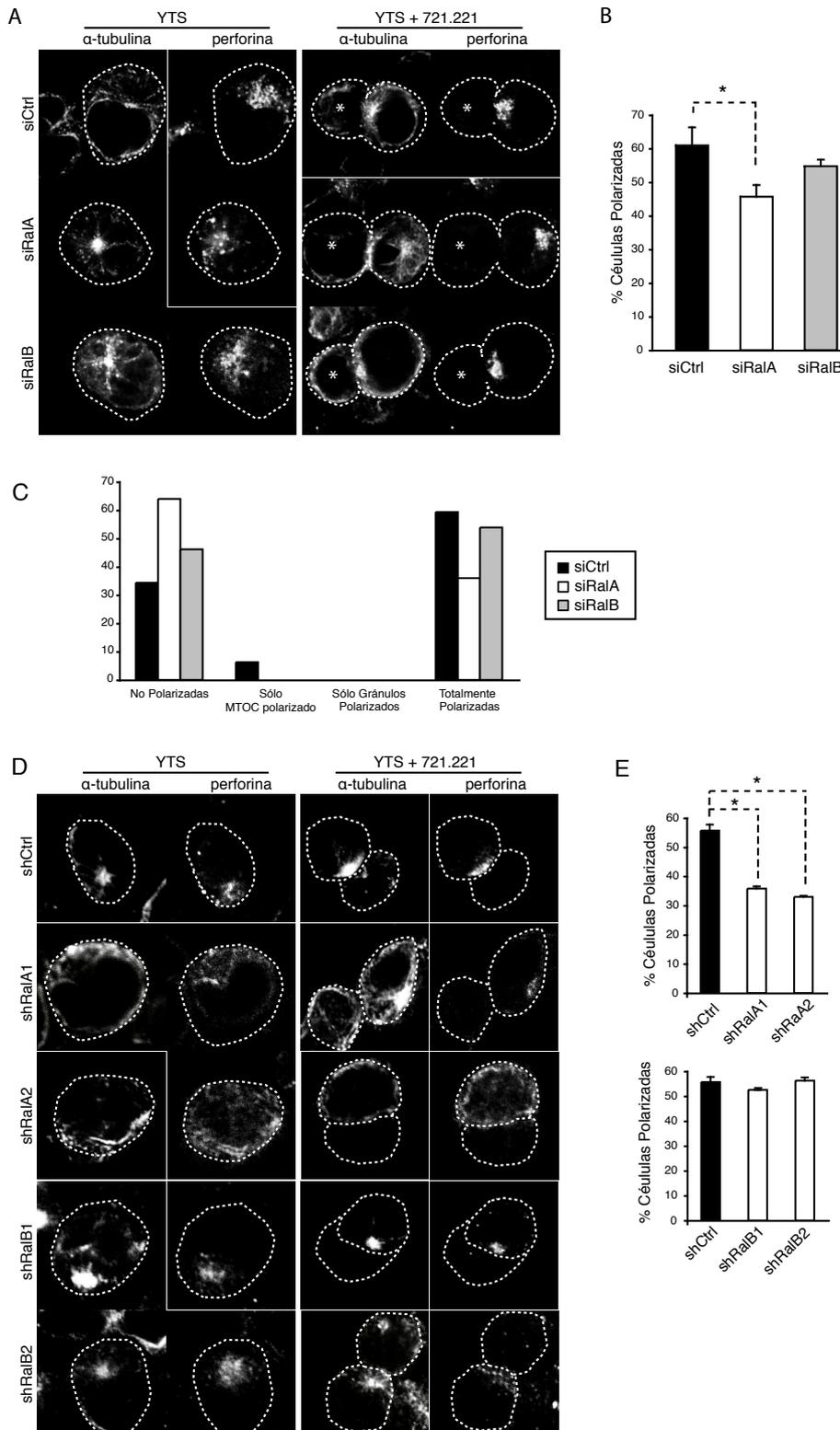
Es razonable pensar que Ral podría influir en la polarización del MTOC y la maquinaria secretora a la zona de la sinapsis, al fin y al cabo, este proceso no es muy diferente de la polarización de una célula al emitir un lamelipodio para adherirse a un sustrato y migrar. Como hemos visto anteriormente, la regulación del exocisto por parte de Ral parece tener gran relevancia en establecimiento de polaridad celular <sup>(256, 229, 105, 187)</sup>. Ral y el complejo del exocisto también podrían interactuar directamente con el MTOC, como ocurre durante citoquinesis <sup>(56)</sup> y facilitar su relocalización. Así pues, Ral podría colaborar en la polarización de los elementos necesarios para la lisis de la célula diana.

Para estudiar si la ausencia de Ral afecta la capacidad de relocalizar la maquinaria de secreción, incubamos células YTS nucleofectadas con siRNAs o YTS expresando shRNAs de manera estable, con células diana 721.221. Analizamos después las muestras por microscopía confocal, tiñéndolas antes con anticuerpos contra  $\alpha$ -tubulina y perforina. De esta manera pudimos identificar visualmente el MTOC y los gránulos líticos. Buscamos células diana y efectoras que

se hallasen en contacto, y cuantificamos cuántas células polarizaban a la zona de contacto tanto los gránulos con perforina, como el centro organizador de microtúbulos. La **Figura R17A** muestra YTS nucleofectadas con los diferentes siRNAs, aisladas o en contactos. Como podemos ver, no hay grandes diferencias en la distribución de los gránulos o los microtúbulos en células en reposo. Ahora bien, cuando se establece una sinapsis con una célula 721.221, tanto las células nucleofectadas con siCtrl como con siRalB polarizan la maquinaria secretora, mientras que en las nucleofectadas con siRalA un buen número de células parecen tener dificultades para hacerlo. Cuando representamos gráficamente la cuantificación (**Fig R17B**) vemos que esta diferencia en la eficiencia de polarización es significativa. Esta incapacidad de polarizar el MTOC y los gránulos líticos parece ser global, es decir, las células con el siRalA no polarizan ninguno de los dos elementos; si observamos la **Figura R17C** vemos que no se producen situaciones intermedias en las que se polarice sólo el MTOC o los gránulos. Por lo tanto, el defecto parece encontrarse en el inicio de la polarización.

A la hora de analizar este resultado, debemos tener en cuenta que los siRNAs que utilizamos no están marcados con ningún fluoróforo que nos permita saber qué células han sido realmente nucleofectadas con el interferente; por lo tanto en la cuantificación probablemente estemos teniendo en cuenta células que no hayan adquirido el siRNA. Éste problema no lo tenemos con las células que expresan los shRNAs, ya que la selección con puromicina elimina las células que no han integrado la construcción. Así pues, realizamos los mismos experimentos de polarización utilizando YTS expresando de manera estable shRNA control, shRalA1, shRalA2, shRalB1 y shRalB2. En la **Figura R17D y E** vemos que se reproducen los resultados obtenidos con los siRNAs: No se observan diferencias en polarización al reducir los niveles de RalB, pero de nuevo, al interferir RalA hay un número menor de células capaces de polarizar la maquinaria secretora. Las diferencias obtenidas con los shRNAs son mayores que las obtenidas con los siRNAs, probablemente porque la mayoría de células expresan la construcción.

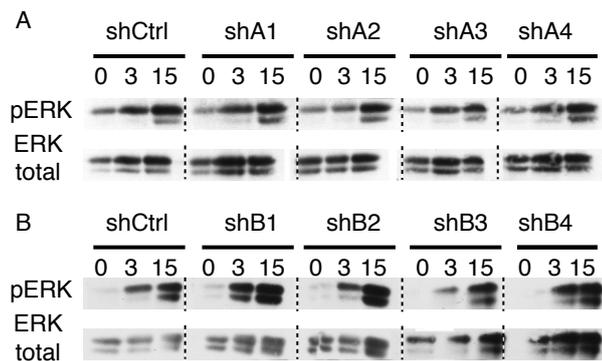
Obtenemos pues una explicación para



**Figura R17:**

La polarización de los gránulos líticos a la zona de contacto entre YTS y sus dianas requiere la presencia de RalA pero no de RalB.

Incubamos células YTS nucleofectadas con siRNA o expresando de forma estable shRNAs con células diana 721.221 en proporción 1:4 durante 20min a 37°C. Las células fueron fijadas, teñidas con anti- $\alpha$ -tubulina y -perforina, y analizadas por microscopía confocal. (A) Imágenes de microscopía confocal de células YTS nucleofectadas con siRNA control, contra RalA o RalB, en ausencia y presencia de dianas 721.221. (B) Cuantificación de la polarización de la maquinaria secretora como [(número de contactos que muestran polarización del MTOC y perforina/número total de contactos) x 100] en YTS tratadas con los diferentes siRNAs. Se muestra la media  $\pm$  EE de tres experimentos independientes.  $p < 0.05$ , por el test t- de Student de dos colas. (C) Clasificación de los tipos de contacto de un experimento representativo, en función de si polarizan tanto el MTOC como la perforina, el MTOC sólo, los gránulos líticos sólo o ninguno de los dos. (D) Imágenes de inmunofluorescencia de células YTS expresando diferentes shRNAs, en ausencia y presencia de dianas 721.221. (E) Cuantificación de la polarización como en (B), comparando YTS-shCtrl con YTS-shRalA1 o -shRalA2, en el panel superior, o con YTS-shRalB1 o -shRalB2. Se muestra la media  $\pm$  EE de tres experimentos independientes.  $p < 0.01$ , por el test t- de Student de dos colas.



**Figura R18:**

La disminución de los niveles de RalA o RalB no afectan la fosforilación de ERK en respuesta estímulos que inducen citotoxicidad.

Se estimularon células YTS expresando de forma estable shRNAs contra RalA (A) y RalB (B) con células Schneider SC2 expresando B7.1/ICAM-1.1, en proporción 1:1. Se analizó la fosforilación de ERK mediante anticuerpos contra fosfo-p44/42 (ERK1/2), y mostramos el resultado del Western Blot a 0, 3 y 15 minutos. En el panel inferior mostramos el ERK total.

la reducción en la capacidad citotóxica cuando interferimos RalA, pero estos resultados no explican la menor citotoxicidad cuando disminuimos los niveles de RalB, puesto que no afecta a la polarización de la maquinaria secretora.

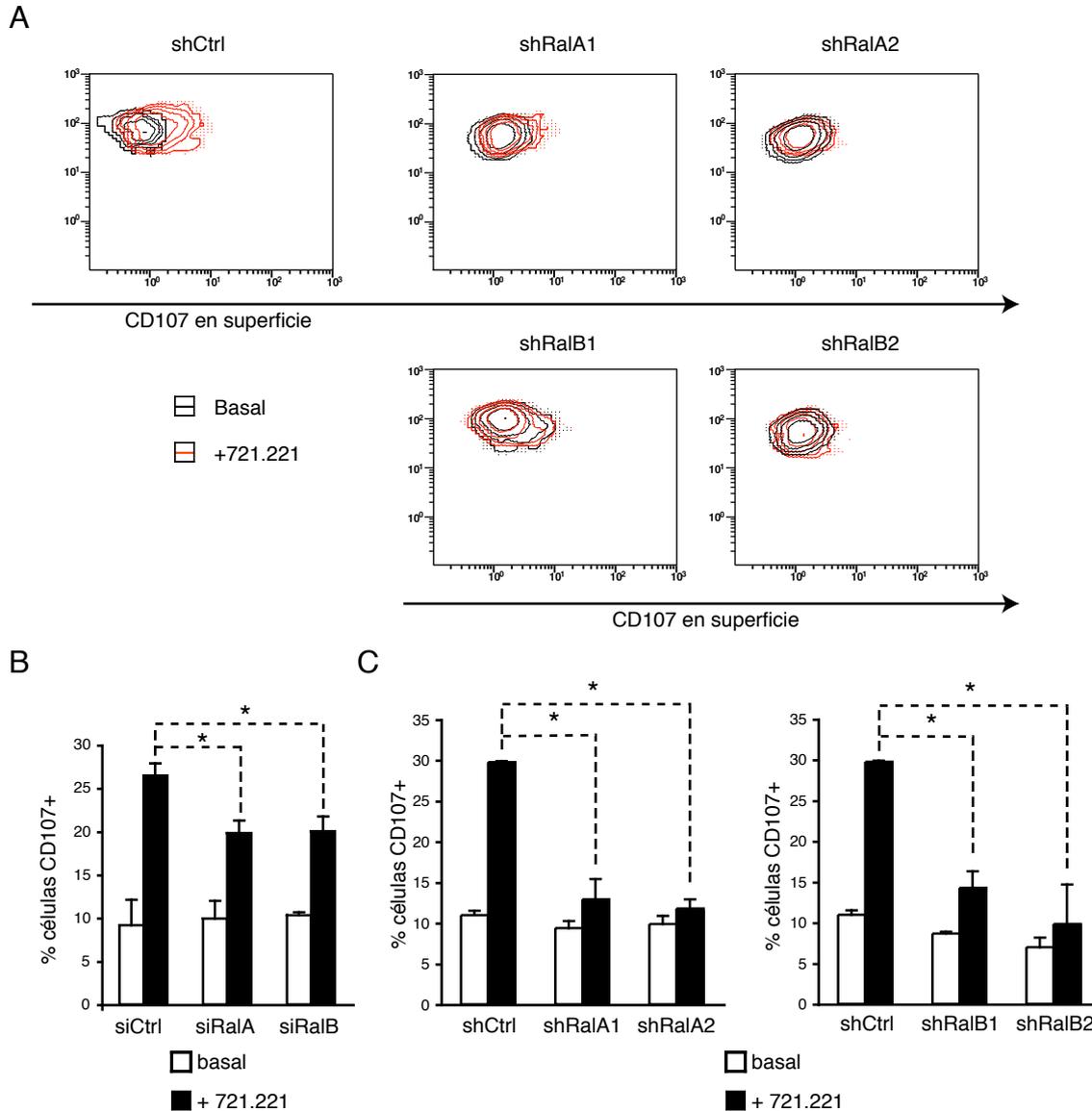
Hemos visto que Ral se activa en respuesta a la estimulación de LFA-1, esencial en la polarización de la célula lítica (36, 19). La señalización de fuera a dentro (*outside-in*) de LFA-1 estimula la actividad de RasGRP/Ras/.../ERK1/2 (54), y se ha demostrado que la actividad de ERK1 y ERK2, especialmente éste último, es necesaria para la correcta polarización del MTOC y en consecuencia, de la maquinaria secretora (54). Por esta razón examinamos los niveles de pERK en células YTS expresando de manera estable shRNAs control, contra RalA o RalB, a diferentes tiempos tras estimular con células diana con SC2-ICAM1.1/B7.1 (**Fig R18A y B**). En ninguno de los tiempos examinados vemos diferencias notables en la fosforilación de ERK; por lo tanto, descartamos la ruta de MAPK como la que media la regulación de RalA de la polarización de los gránulos líticos.

**La interferencia con RalA y RalB altera la degranulación de las células YTS.**

La secreción de los gránulos líticos es el último paso del proceso de citotoxicidad, y requiere el anclaje de los gránulos, la fusión de estos a la membrana plasmática, y la liberación del contenido lítico. En la introducción hemos descrito varios procesos análogos de secreción polarizada regulados por Ral. Ya hemos mencionado el papel de esta GTPasa en secreción específica al compartimento basolateral en epitelios polarizados, pero existen muchos otros ejemplos. Los cuerpos de Weibel Palade, sin ir más lejos, son lisosomas secretores al igual que los gránulos líticos y su secreción está controlada por RalGDS-RalA, de manera dependiente de calcio (225). Otros ejemplos son el control de la secreción neuroendocrina en células PC12 a través de RalA-PLD1-Arf6 (274, 268) o la exocitosis de gránulos densos en plaquetas, en la cual el exocisto resulta esencial (135). La regulación del exocisto por parte de Ral parece necesaria en la mayoría de estos sistemas; este complejo heterooctamérico podría establecer un parche que permitiese la interacción entre los gránulos líticos y la membrana.

Una manera frecuentemente utilizada para medir la degranulación de células NK o CTLs se basa en aprovechar la naturaleza lisosómica de los gránulos líticos (4). Lamp1 y 2 (CD107a y b respectivamente) son moléculas transmembrana de los lisosomas, que no se expresan en la membrana plasmática en una célula lítica en reposo. Ahora bien, cuando los gránulos líticos (lisosomas secretores especializados) se fusionan con la membrana plasmática, podemos detectar estos marcadores tiñendo con anticuerpos extracelulares y analizando las muestras por citometría de flujo. Para comprobar si en células YTS en las que hemos interferido la expresión de Ral se producían defectos en degranulación, teñimos células YT con PKH-26 y las incubamos con 721.221 en presencia de anticuerpo anti-CD107a conjugado con FITC. A las 4 horas determinamos el porcentaje de células que habían aumentado los niveles de CD107a en la membrana y por tanto estaban degranulando.

En la **Figura R19A** mostramos los histogramas que representan la señal de CD107a



**Figura R19:**

La interferencia de cualquiera de las isoformas de Ral altera la degranulación de las células YTS ante sus dianas.

Incubamos células YTS tanto nucleofectadas con siRNAs como estabilizadas con shRNAs con células diana 721.221 en relación 1:2, en presencia de un anticuerpo anti-CD107-FITC (BD-Pharmingen) y monensina A (4nM, BD-Pharmingen). Tras 4h de incubación, se analizaron los niveles de CD107 en membrana de las células YTS por citometría de flujo. (A) Diagramas de contornos obtenidos con células YTS expresando los diferentes shRNAs. Los contornos negros corresponden a las células YTS sin estimular, y los rojos las células YTS incubadas con células 721.221 (B) Cuantificación por citometría de los porcentajes de células CD107a-positivas en células YTS nucleofectadas con siRNA. Se representan las medias  $\pm$  EE de 3 experimentos.  $p < 0.05$ , por el test t- de Student de dos colas. (C) Cuantificación similar a la anterior, en células YTS expresando los diferentes shRNAs. Representamos las medias  $\pm$  EE de 3 experimentos.  $p < 0.05$ , por el test t- de Student de dos colas.

antes y después de incubar con células diana, en YTS estables para shCtrl y para shRNA contra RalA y B. Las células expresando el shCtrl son

capaces de translocar CD107a a la membrana, lo que indica que al incubar con células diana son capaces de secretar el contenido lítico para

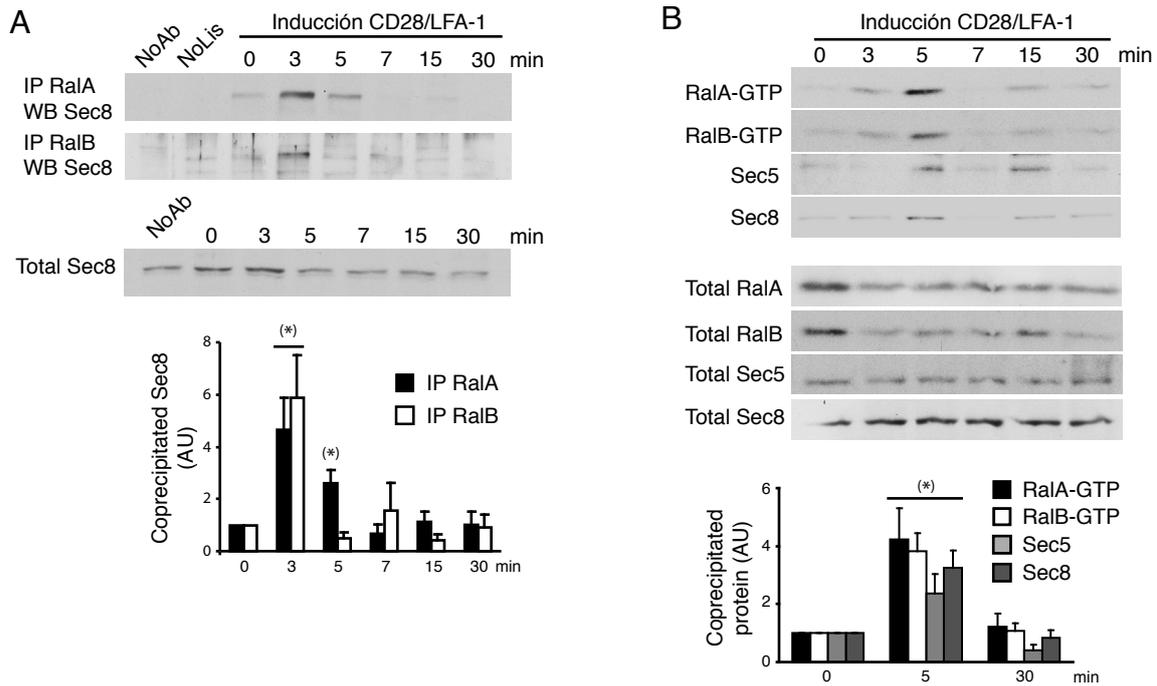
eliminarlas. Sin embargo, las que expresan shRNA contra cualquiera de las isoformas de Ral no son capaces de inducir secreción. Esto ocurre tanto en los experimentos realizados con siRNAs como con los realizados con shRNAs, como vemos en la **Figura R19B y C**, aunque nuevamente los efectos parecen ser más notables con la expresión estable de shRNAs. La razón probablemente sea la misma que en los experimentos de polarización, es decir, que todas las células YTS utilizadas expresan el RNA interferente.

Por lo tanto, las GTP-asas Ral parecen estar controlando dos procesos independientes durante la citotoxicidad celular mediada por gránulos. En primer lugar RalA regula la polarización de la maquinaria de secreción, aparentemente el inicio del proceso. Por otro lado hemos observado que la inhibición de cualquiera de las isoformas de Ral lleva a un desajuste en la secreción de gránulos líticos. Teniendo en cuenta que las células con RalB interferido son capaces de polarizar los gránulos líticos, los resultados nos sugieren que en estas células existe un defecto en el anclaje y la secreción de los gránulos. Quisimos profundizar en las bases moleculares que subyacen la regulación de la citotoxicidad a través de Ral. Por el tipo de defectos observados y con los precedentes de publicaciones anteriores, nos pareció que la regulación del exocisto era la ruta efectora de Ral con mayores posibilidades de estar implicada en el proceso. Dedicaremos los próximos apartados al estudio de la implicación de esta ruta en este sistema.

***El exocisto se ensambla al producirse un contacto entre YTS y una célula diana.***

El exocisto regula el transporte y anclaje de numerosos tipos de vesícula a una membrana objetivo; suele encontrarse desensamblado en forma de hemicomplejos en diferentes compartimentos celulares <sup>(34, 229)</sup>. Varias GTPasas pequeñas intervienen en el ensamblaje de este complejo, entre ellas proteínas de la familia Rho y Ral. Dado que se requiere la actividad de Ral para que este complejo se ensamble correctamente <sup>(187)</sup>, examinamos si el exocisto se forma al inducir citotoxicidad de una célula diana. Al igual que en los experimentos de la **Fig R10**, estimulamos células YTS con células SC2-B7.1/ICAM1.1 a diferentes tiempos. A continuación inmunoprecipitamos RalA o RalB en células YTS estimuladas de la misma manera que antes, y analizamos la presencia de Sec8 por Western Blot (**Fig R20A**). En el panel superior se aprecia como a 3 minutos se produce un fuerte incremento en el Sec8 asociado a RalA y B; en el panel inferior vemos una cuantificación de esta asociación. Teniendo en cuenta que de las subunidades del exocisto las proteínas Ral sólo se asocian a Sec5 <sup>(187)</sup> y Exo84 <sup>(188)</sup>, el hecho de observar Sec8 coprecipitando es indicativo de que el exocisto se está ensamblando y que el complejo resultante contiene Ral. Para demostrar que es la fracción activa de Ral la que se une al complejo, realizamos experimentos de pulldown en estos mismos lisados utilizando RalBP1-RBD unido a GST. De esta manera purificamos la fracción activa de las dos isoformas de Ral junto todo aquello a lo que estén asociadas. Así pues, si detectamos Sec5 o Sec8 significa que se han unido a la fracción activa de Ral (**Fig R20B**). El resultado confirma nuestra hipótesis, ya que somos capaces de detectar incrementos de Sec5 y Sec8 asociados a los mismos tiempos en los que tanto RalA como RalB están activos.

Para confirmar los datos bioquímicos quisimos ver si estos se correspondían con observaciones de microscopía. Teñimos diferentes moléculas del exocisto en células YTS en reposo y estimuladas con células diana para estudiar su distribución subcelular y si se concentran en la zona de contacto entre la célula efectora y la diana. Debido a que Sec5 es la subunidad que



### Figura R20:

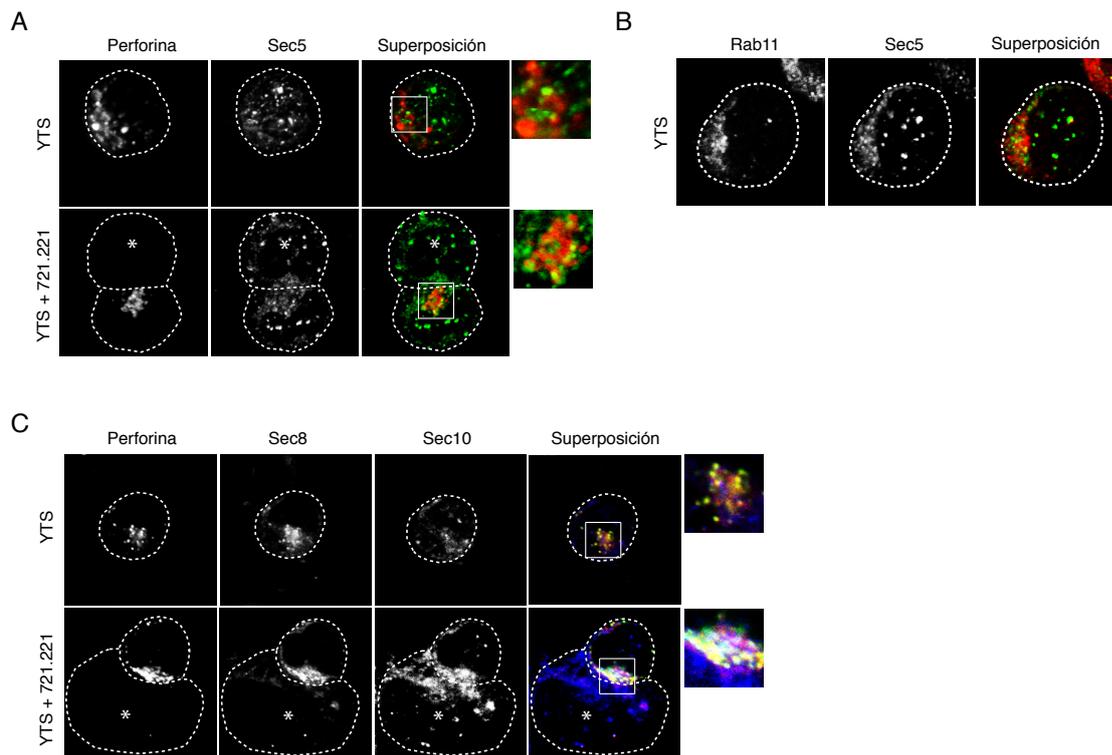
#### Ral interacta con moléculas del exocisto durante la respuesta citotóxica:

A) Se estimularon células YTS con células Schneider SC2 expresando B7.1/ICAM-1.1, en proporción 1:1 durante los tiempos indicados. Se utilizaron los lisados en ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpos contra RalA, en el panel superior, o RalB, en el central. En ambos casos se analizó por Western Blot la asociación de Sec8 mediante un anticuerpo específico. El panel inferior muestra Sec8 total de los lisados como control de carga. En la parte inferior del apartado representamos la cuantificación del Sec8 asociado, en unidades arbitrarias, mostrando las medias y desviación estándar de 4 experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , test de  $t$ -Student's de dos colas. B) Se estimuló las células de la misma manera que en A, pero los lisados fueron sometidos a ensayos de pulldown con GST-RalBP1 RBD. Los paneles superiores muestran el análisis por Western Blot de estos ensayos. Además de utilizar RalA y RalB, comprobamos la asociación de Sec5 y Sec8 con anticuerpos específicos. Los paneles inferiores muestran los controles de carga. En la parte inferior del apartado representamos la cuantificación de RalA y B-GTP, así como del Sec5 y Sec8 asociados, en unidades arbitrarias, mostrando las medias y desviación estándar de 4 experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , test de  $t$ -Student's de dos colas

interacciona con Ral, fue la que analizamos en primer lugar. Hicimos una tinción de Sec5 junto a perforina y observamos que no se localizan en el mismo compartimento celular (**Fig R21A**, panel superior) pero se produce un enriquecimiento de Sec5 cerca de la zona de contacto cuando los gránulos son polarizados. De hecho los dos compartimentos parecen interactuar, tal y como se muestra en el detalle a la derecha, lo cual es consistente con el hecho de que en los ensayos de pulldown vemos Sec5 asociado a Ral activo (**Fig R20C**), así como con las publicaciones que demuestran que es fundamental la interacción de diversos compartimentos del sistema de tráfico vesicular con los gránulos líticos para que estos puedan ser secretados<sup>(179)</sup>. Ya que no encontramos

Sec5 en los gránulos líticos pensamos que quizá se encontrara en el endosoma de reciclaje, como se ha descrito en algunos sistemas<sup>(152)</sup>. En la **Figura R21B** vemos que se observa cierta colocalización de Rab11 con Sec5, si bien no parece que todo el Sec5 detectado se asocie al compartimento del endosoma de reciclaje.

La tinción con Sec8 y Sec10 junto con perforina apoya la implicación del exocisto en este sistema; tal y como se había publicado, Sec8 y 10 se encuentran en lugares diferentes (**Fig R21C**); Sec8 parece hallarse principalmente en los gránulos líticos, mientras que Sec10 parece encontrarse de forma difusa por el citoplasma. En el panel inferior observamos que cuando



**Figura R21:**

Las subunidades del exocisto Sec5, Sec8 y Sec10 se concentran en la zona de contacto entre la célula efectora y la célula diana.

Análisis por microscopía confocal de la localización de diferentes subunidades del complejo del exocisto en células en reposo o incubadas con células 721.221 en proporción 1:4 (20min, 37°C). (A) Tinción usando anticuerpos anti-Sec5 (Proteintech) y –perforina (Kamiya Biomedical). La superposición muestra Sec5 en verde y perforina en rojo. A la derecha mostramos una ampliación de un detalle. (B) Tinción con anticuerpos anti-Sec5 y –Rab11. La superposición muestra Sec5 en verde y Rab11 en rojo. (C) Tinción con anticuerpos anti-Sec8 (BD-Biosciences), –Sec10 (AbCam) y –perforina. La superposición muestra Sec8 en rojo, perforina en verde y Sec10 en azul. A la derecha se muestra la ampliación de un detalle.

incubamos YTS con 721.221 las dos subunidades del exocisto se concentran en la zona de contacto, donde observamos colocalización con los gránulos líticos, lo que confirma que estos interactúan con otros compartimentos vesiculares antes de la secreción.

Por lo tanto los datos de microscopía confocal confirman los datos obtenidos por el análisis bioquímico, y sugieren un papel para el exocisto en la citotoxicidad celular.

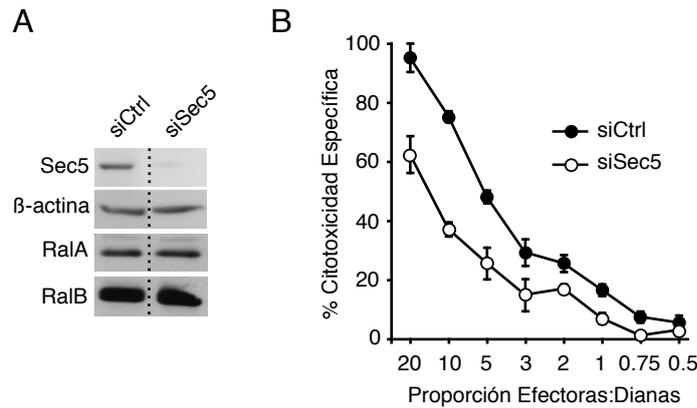
**La reducción de los niveles de Sec5 reduce la capacidad citotóxica.**

Para confirmar la importancia del exocisto en la citotoxicidad decidimos medir la capacidad lítica de células YTS con niveles reducidos de Sec5. Decidimos interferir esta subunidad por ser

el nexo entre la activación de Ral y el ensamblaje del exocisto.

Nucleofectamos células YTS con siRNA control y contra Sec5, y comprobamos su eficiencia y especificidad por Western Blot (**Fig R22A**). El siRNA contra Sec5 no afecta a los niveles de RalA, RalB o perforina, sin embargo produce una reducción en torno al 80% de Sec5.

Al medir la capacidad citotóxica de células YTS con niveles reducidos de Sec5 por el método del Alamar Blue observamos un notable defecto en la capacidad de eliminar sus dianas (**Fig R22B**). Este resultado apoya por tanto la importancia del exocisto en la citotoxicidad mediada por gránulos.



**Figura R22:**

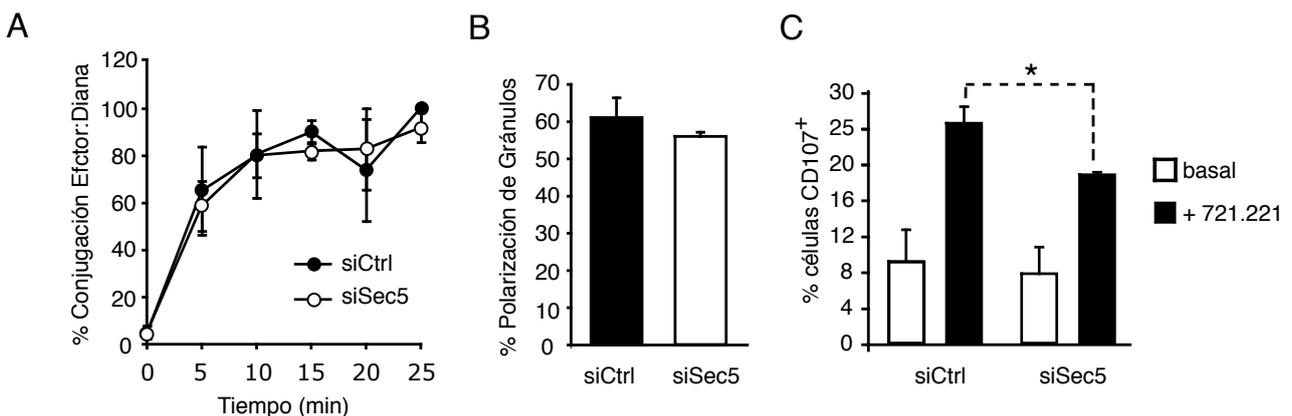
La reducción de los niveles de la subunidad del exocisto Sec5 disminuye la capacidad citotóxica de células YTS.

Nucleofectamos en YTS un siRNA específico contra Sec5. (A) Análisis por Western Blot de los niveles de Sec5, RalA, RalB y  $\beta$ -actina en YTS nucleofectadas con siCtrl o siSec5. (B) Ensayo de citotoxicidad contra 721.221 con Alamar Blue en células YTS con siCtrl o siSec5 a diferentes relaciones efector:diana. Representamos la media  $\pm$  EE de los triplicados de los diferentes puntos, en un experimento representativo.

**El exocisto regula la degranulación pero no la polarización de la maquinaria de secreción.**

así que realizamos los mismos pasos lógicos que seguimos cuando queríamos determinar los mecanismos afectados por Ral; analizamos la capacidad de establecer conjugados, de polarizar la maquinaria secretora y finalmente de secretar el contenido de los gránulos líticos (**Fig R23**).

Nuestro siguiente paso fue intentar determinar a qué nivel participa el exocisto en los mecanismos que llevan a la citotoxicidad,



**Figura R23:**

Sec5 no está implicado en el proceso de conjugación o de polarización de la maquinaria citolítica, pero regula el proceso de degranulación.

Comparamos las células YTS nucleofectadas con un siRNA control o uno contra Sec5 en diferentes experimentos: (A) Ensayo de conjugación, realizado como en **Fig 16**. Representamos la media  $\pm$  EE de 3 experimentos independientes. (B) Ensayo de polarización de la maquinaria de secreción, realizado como en la **Fig 17**. Representamos la media  $\pm$  EE de 3 experimentos independientes. (C) Ensayo de degranulación, de la misma manera que habíamos hecho en Fig8. Representación de la media  $\pm$  EE de tres experimentos independientes.  $p < 0.05$ , por el test t- de Student de dos colas.

Cuando analizamos la conjugación no observamos ninguna diferencia entre las células interferidas y las control (**Fig C23A**). Esto no resulta sorprendente, ya que tampoco habíamos observado defectos en la formación de conjugados estables al inhibir la expresión de RalA o RalB (**Fig R16**). Sí habíamos observado diferencias en la polarización de la maquinaria secretora al inhibir RalA; aún así, tal como muestra la **Figura 23B**, la disminución de los niveles de Sec5 no parecen afectar este proceso. En cambio, cuando medimos degranulación (**Fig R23C**) observamos como las células interferidas muestran una menor capacidad para inducir secreción que las control, y esta diferencia es estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

La reducción de los niveles de Sec5, por tanto, afecta a la degranulación, sin embargo no afecta a la polarización de la maquinaria de secreción. Esto, junto al hecho de que sólo la inhibición de RalA lleva a alteraciones en la polarización, sugiere que RalA está regulando este proceso a través de otras vías efectoras no relacionadas con el exocisto, y que estas vías dependen sólo de RalA.







## DISCUSIÓN:

### *Papel de las GTPasas Ral en la función de los linfocitos T:*

En la primera parte del trabajo hemos intentado dilucidar un posible papel de las GTPasas Ral en la activación de los linfocitos T a través del TCR. Hemos observado que esta proteína se activa en respuesta a este receptor de antígeno y se relocaliza a la zona de contacto entre la célula presentadora y el linfocito T, y que en el modelo celular de Jurkat alteraciones en su expresión o actividad desencadenan cambios en la capacidad de estas células para activarse. Aún así, al estudiar los ratones *RalGDS<sup>-/-</sup>*, con defectos en la estimulación de Ral-GTP, no observamos diferencias ni en el desarrollo del sistema inmune ni en la funcionalidad de los linfocitos T.

La estimulación del TCR lleva al reclutamiento y activación de numerosas moléculas transductoras de señales, formando una plataforma de señalización denominada sinapsis inmunológica <sup>(95, 231, 276)</sup>. Entre estas proteínas se encuentra Ras, cuya actividad no sólo es necesaria para la señalización y funcionalidad de los linfocitos, sino que es el principal regulador de Ral a través de los RalGEFs. Mediante ensayos de pulldown hemos demostrado que se produce una activación temprana de Ral (**Figura R1**), en respuesta a la estimulación del TCR, lo que sugiere que esta GTPasa se encuentra también

en el complejo señalizador que se asocia al TCR. En células Jurkat, la incubación con anticuerpos contra CD3 $\epsilon$  provoca incrementos en Ral-GTP a tiempos cortos, mostrando un pico de activación cercano a los 3 minutos. El principal candidato a regular este pico de activación es, como hemos dicho Ras. De hecho, las cinéticas de activación de Ras y de Ral, tal y como se ve en la **Figura R1**, son bastante parecidas. En linfocitos T la actividad de Ras es el resultado de la acción de dos familias de GEFs; al igual que en otros tejidos, la ruta SLP76/Grb2/SOS <sup>(143)</sup> estimula la actividad de Ras en respuesta al TCR. Ésta también se regula por RasGRP, un GEF que responde a incrementos en la concentración intracelular de diacilglicerol originado por la acción de PLC $\gamma$ 1 <sup>(76, 80, 226)</sup>. La acción de este GEF, por tanto, podría explicar la activación de Ral observada en respuesta al éster de forbol PMA, análogo del DAG. PLC $\gamma$ 1 también genera el segundo mensajero IP $_3$ , que induce liberación de los reservorios intracelulares de calcio. Un dato que podría relacionar la acción de PLC $\gamma$ 1 con Ral es que observamos cierto incremento en la actividad de Ral tras incubar células Jurkat con ionomicina, un ionóforo que provoca incrementos en el Ca $^{2+}$  intracelular. Esto ocurre de manera paralela a lo que tiene lugar en las líneas celulares B RAMOS y DT40 <sup>(69)</sup>, plaquetas <sup>(286)</sup> y células endoteliales <sup>(225)</sup>. Los detalles moleculares de cómo Ral responde a los incrementos del calcio intracelular permanecen todavía sin esclarecer, aunque como hemos comentado en la introducción, o bien Ral responde directamente a Ca $^{2+}$  <sup>(116)</sup>, a través de GEFs sin dominio de unión a Ras <sup>(225)</sup> o, como se postula en algunas publicaciones, RalGDS podría unirse a CaM y activar Ral <sup>(62, 272)</sup>. Los niveles de activación de Ral observados tras el tratamiento con ionomicina, no obstante, son considerablemente más tenues que cuando estimulamos directamente el TCR o usamos PMA, por lo que todo apunta a que Ras es el responsable de la mayor parte del Ral activo en respuesta a la estimulación del TCR, como ocurre en plaquetas <sup>(286)</sup>.

Quando examinamos las cinéticas de activación comprobamos que la intensidad de

la activación de Ral aumenta cuando además de anticuerpos contra CD3 $\epsilon$  utilizamos anticuerpos contra CD28. Como comentamos en la introducción y discutiremos también más adelante, CD28 induce picos en la actividad de PI3K <sup>(1, 277)</sup>; esto provoca el reclutamiento de PDK1 <sup>(45)</sup>, una proteína quinasa que fosforila AKT, y que se ha demostrado que no sólo se asocia con RalGDS sino que estimula su actividad <sup>(260)</sup>. La activación de CD28 podría llevar a un mayor reclutamiento y activación de RalGDS en la zona de activación que cuando se estimula solamente el TCR, lo que se traduciría en un potente incremento de la fracción unida a GTP de Ral.

Considerando los diferentes tipos de estimulación de las células Jurkat que hemos utilizado, vemos que diversas señales que se ponen en marcha tras la activación del TCR confluyen en la activación de Ral.

Junto con el hecho de que se active a tiempos tan tempranos, la prueba de que Ral es un componente del complejo señalizador de la sinapsis inmunológica es que esta GTPasa se relocaliza a la zona de contacto con la célula presentadora, tal y como demuestran los datos de inmunofluorescencia (**Figura R2**). En condiciones de reposo, Ral aparece con un patrón vesicular, y se diría que en algunos momentos, asociado a la membrana plasmática. Esto es consistente con otras publicaciones, en las que se sitúa a Ral asociado en general a endomembranas <sup>(56, 255)</sup> y a la membrana plasmática <sup>(141, 256)</sup>. Ahora bien, la localización cambia notablemente cuando estimulamos el TCR de células Jurkat utilizando células Raji presentando SEE, o el de células CD8<sup>+</sup> mediante células presentadoras mostrando el péptido OTI en membrana. Este estímulo induce la relocalización de Ral a la zona de la sinapsis. Esto resulta interesante, en especial si lo sumamos al hecho de que detectamos actividad de Ral a tiempos cortos tras estimulación del TCR. Se ha descrito que Ras-GTP se acumula en la membrana plasmática cuando se activa este receptor, y recientes estudios lo sitúan en la sinapsis <sup>(230)</sup>, aunque las isoformas implicadas son motivo de controversia <sup>(209, 230)</sup>. Independientemente

de la isoforma de Ras que se esté activando en membrana tras la estimulación del TCR, los RalGEF serían reclutados a la zona de activación de Ras y explicarían la acumulación de Ral observada. Aunque sería conveniente examinar la localización de Ral con respecto a PKC $\theta$  o Lck, marcadores del cSMAC de la sinapsis, la distribución de Ral en la zona de contacto no parece tan discreta como cuando se tiñe PKC $\theta$ . Esto no es extraño, Ras-GTP parece localizarse en el pSMAC <sup>(230, 46)</sup>. En próximos experimentos sería interesante estudiar la localización de Ral con respecto a marcadores de las diversas zonas de la sinapsis inmunológica. Aún así, si recopilamos los resultados bioquímicos obtenidos y los combinamos con estas inmunofluorescencias, contamos con suficientes indicios como para sospechar una función relevante de Ral al activar una célula T.

Las células Jurkat se transfectan con gran facilidad, por lo que constituyen un modelo ideal para ensayar la introducción de variantes de proteínas en una célula y examinar la activación tras estimular el TCR. Introdujimos diferentes variantes de RalA y B: las silvestres, mutantes activos y dominantes negativos. Si realmente Ral está transduciendo señales emitidas por Ras, esperábamos observar diferencias en activación celular. Para ello examinamos la expresión en membrana del marcador temprano de activación de células T CD69 <sup>(48)</sup>. Lo más notable es que la introducción de las variantes de ambas isoformas de Ral que no hidrolizan GTP (RalA72L y RalB23V) inducen mayor expresión de CD69 en membrana, lo que indica una mayor activación de estos linfocitos. Al examinar el estado de algunas rutas de activación que desembocan en expresión génica tras activación del TCR, como AKT y ERK1/2 vimos que los niveles de pERK se encuentran también aumentados al introducir RalA72L o RalB23V. No sólo eso, sino que apenas incrementan su actividad al estimular el TCR, lo que correlaciona con la expresión de CD69. Ocurre algo similar con los niveles de pAKT, aunque no resulta tan evidente como con pERK. Ya se han observado efectos parecidos cuando se sobreactiva la vía de Ras; la variante mutante



activa RasV12 lleva a niveles basales muy altos de CD69 <sup>(227)</sup>. En esta misma publicación se observa también que mutantes activos de Ras que se unen únicamente a RalGDS también aumentan los niveles basales de CD69, casi al mismo nivel que los mutantes que sólo activan Raf. Todo esto apoya que los mutantes constitutivamente activos de Ral están induciendo un estado de mayor activación celular y estimulan de manera anormal las rutas que llevan a la expresión de CD69, entre ellas la ruta de ERK/API-1 <sup>(47, 183)</sup>. La relevancia del papel de Ral en la activación de las células Jurkat se reafirma al estimular el TCR de células transfectadas con RNAs interferentes contra RalA o RalB. En este caso observamos un menor número de células CD69 positivas. Sin embargo, en el caso de los RNA de interferencia, no observamos diferencias notables ni en pERK ni en pAKT, lo que sugiere que Ral podría contribuir a la activación por otras vías y que Ras es suficiente para mantener altos los niveles de pERK y AKT. Aún así, el hecho de observar alteraciones en la expresión del marcador de activación CD69 apoya la implicación de Ral en la activación de los linfocitos T.

En el laboratorio contamos con ratones RalGDS<sup>-/-</sup>, desarrollados por González García, et al <sup>(103)</sup>. La reducción en la actividad de Ral en estos ratones afecta notablemente a los efectos oncogénicos de Ras, que se ven intensamente reducidos en un modelo de cáncer de piel. Por esta razón, al analizar estos ratones esperábamos que se recapitulasen parte de los defectos observados en el desarrollo del sistema inmune y en la función de éste al alterar la función de Ras <sup>(71, 89, 92, 253, 281)</sup>. La reducción en la señalización en la vía TCR/Ras, o la expresión de H-RasN17 específicamente en linfocitos T, lleva a problemas de desarrollo tímico, concretamente en selección positiva <sup>(71, 253, 281)</sup>. Aunque la mayoría de estos defectos se asocian a menor actividad de ERK, no podíamos descartar el papel de Ral. Aún en el caso de que la actividad de Ral fuese relativamente prescindible, en otros sistemas como el desarrollo de tumores en ratón, se ha observado una fuerte sinergia entre las rutas de MAPK y Ral <sup>(110)</sup>. También hay que tener en cuenta que defectos en algunas rutas

reguladas putativamente por Ral, como la de JNK <sup>(47)</sup> llevan a problemas de selección negativa y linfocitos autorreactivos, resistentes a la muerte inducida por antígeno <sup>(75)</sup>. Por lo tanto, el estudio de estos ratones nos permitía dos cosas: en primer lugar, comprobar si la ruta de RalGEF-Ral tiene relevancia en el desarrollo del sistema inmune. En segundo lugar, estudiar la función de linfocitos T en los cuales hemos reducido la actividad de Ral.

Realizamos, por tanto, tinciones con anticuerpos contra marcadores de diversas poblaciones del sistema inmune y las estudiamos por citometría de flujo, prestando especial atención a las poblaciones linfoides, tanto en ratones adultos como en ratones envejecidos. Curiosamente, no vimos diferencia alguna en las poblaciones analizadas. En el desarrollo de poblaciones analizadas de células T y B, el GEF de Ral RalGDS, parece ser prescindible. Tampoco identificamos ningún defecto en células mieloides como neutrófilos o macrófagos. Aún así, examinamos ratones de edades avanzadas, por si algún defecto en selección tímica negativa o positiva quedaba enmascarado y se manifestaba más tarde. Al fin y al cabo, alteraciones en la actividad y expresión de Ras se han asociado a desarrollo de patologías autoinmunes como lupus eritematoso sistémico <sup>(185)</sup>. No sólo eso, sino que mutaciones en GEFs de Ras, como RasGRP llevan a problemas en selección positiva que inducen linfadenopatías tipo lupus en ratones adultos <sup>(152)</sup>. La deficiencia de RalGDS, por tanto, al ser un posible canalizador de parte de las señales de Ras en linfocitos T, podría reproducir patologías similares. Sin embargo, tampoco parece que a largo plazo haya acumulación de ninguna población ni anomalías relevantes en estos ratones. Por lo tanto, al menos en el desarrollo del sistema inmune la ausencia de RalGDS no tiene consecuencias severas; esto puede deberse a que las rutas efectoras de Ras PI3K y MAPK son suficientes para el desarrollo y homeostasis de los linfocitos, o bien a que otros GEFs de Ral están compensando la ausencia de RalGDS. Sobre este último punto volveremos más adelante.

Intentamos por lo tanto examinar la capacidad de linfocitos T RalGDS<sup>-/-</sup> de activarse *in vitro*. Con los resultados anteriormente obtenidos en Jurkat con los mutantes activos y los shRNAs, es en este punto donde esperábamos encontrar diferencias más notables entre los ratones RalGDS<sup>-/-</sup> y los WT. Ahora bien, no observamos diferencias ni en proliferación, ni en la expresión de marcadores de activación como CD69 o CD25; tampoco parece haber defectos en la secreción de IL2. Los resultados indican que el papel de RalGDS en linfocitos T de ratón es prescindible también a nivel de su activación, a pesar de que Ral se localiza en sinapsis y se activa de manera temprana. Cuando realizamos experimentos de pulldown para determinar el descenso de la actividad de Ral en linfocitos T tras estimular su TCR observamos que la eliminación de ésta no era total. Existen otros GEFs de Ral, como Rlf<sup>(283)</sup>, Rgl2<sup>(88, 213)</sup> o Rgl3<sup>(237)</sup>, que también contienen dominios de unión a Ras, y podrían sustituir parcialmente el defecto de RalGDS. De hecho Rlf se expresa en tejidos linfoides como el bazo<sup>(214)</sup>. Recientemente se ha creado el portal BioGPS, que reúne gran cantidad de información de diversas bases de datos acerca de la expresión de genes<sup>(288)</sup>. Entre la información que se puede obtener de este portal destaca la posibilidad de estudiar la distribución por tejidos de la expresión del gen de interés, a partir de datos obtenidos por microarrays. Examinamos con la ayuda de este portal la expresión de RalGDS y de otros GEFs, tanto dependientes de Ras como Rlf y Rgl2, como independientes de éste, como RalGPS1 y 2. Con esta aproximación quisimos estudiar someramente si en células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> humanas y de ratón algún otro GEF podría compensar la deficiencia en RalGDS. Los datos indican que en células T CD4<sup>+</sup> humanas y de ratón, la expresión de Rlf se encuentra elevada. Además, en linfocitos T de ratón CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, RalGPS2 también se expresa bastante más que en otros tejidos. Estas isoformas podrían, por tanto, mantener unos niveles mínimos de activación de Ral, suficientes para que realizase sus funciones.

No podemos descartar, de todas maneras, la posibilidad de que realmente la actividad de

Ral no sea imprescindible en los linfocitos de animales RalGDS<sup>-/-</sup>. Aunque podría deberse a efectos no deseados, hemos observado que el dominante negativo de RalA o RalB no tiene efectos sobre las células Jurkat, mientras que la reducción de los niveles de Ral mediante shRNAs sí reduce la activación mediada por el TCR. Una posible explicación a esto sería que los efectos de Ral en la activación de los linfocitos T no dependen tanto de su estado GTP como de su unión constitutiva a alguno de sus efectores. Un posible candidato a esto sería PLD1, que se une de manera constitutiva a Ral, en un complejo que recluta a Arf e incrementa la actividad de esta proteína<sup>(138, 170, 268)</sup>. Arf se ha relacionado con remodelación de actina y con regulación de Rac<sup>(219)</sup>, otra GTPasa pequeña de enorme importancia en la transducción de señales que provienen del TCR<sup>(9)</sup>. Ral podría por tanto estar implicado en la regulación de Arf a través de PLD de manera independiente de su actividad. Finalmente, hay que remarcar que existen notables diferencias entre células de ratón y células humanas a la hora de transducir las señales de Ras, como demuestran los distintos requerimientos entre las dos especies para inducir transformación celular. En HEK-HT, humanas, el mutante activo de Ras Ras12V37G, que activa específicamente la vía de RalGDS es suficiente para inducir transformación celular, frente a las variantes que se unen a Raf y PI3K<sup>(110)</sup>. Sin embargo, en NIH-3T3 sólo la variante que activa selectivamente Raf es transformante, la variante Ras12V35S. Es importante señalar que cuando se activa la ruta de RalGDS junto a la de Raf los efectos transformantes son mayores. Por lo tanto, podría ser que la actividad de Ral sea relevante en linfocitos humanos pero no en linfocitos de ratón.



### **Las GTPasas Ral en citotoxicidad celular:**

En este trabajo describimos por primera vez un rol para las GTPasas Ral en células NK, concretamente en el proceso de citotoxicidad mediada por gránulos líticos. Hasta la fecha, las GTPasas pequeñas que habían mostrado tener mayor relevancia en citotoxicidad habían sido las GTPasas de las familias Rho, Ras o Rab<sup>(136)</sup>. Las proteínas de la familia Rho, por ejemplo, están relacionadas con el establecimiento de conjugados estables, la estructura de la sinapsis y la polarización de la maquinaria secretora<sup>(102, 201)</sup>. Ras está implicado en la activación de cascadas de MAPK/ERK1/2, que llevan a la transcripción génica y a la activación de la célula NK<sup>(60, 179)</sup>, así como a la polarización de la maquinaria secretora<sup>(54, 74)</sup>. Por su parte, la familia Rab interviene sobretodo en las fases finales de la secreción de los gránulos, en su anclaje y su fusión a la membrana<sup>(179)</sup>, aunque también se ha descrito que Rab7 podría regular la polarización del MTOC<sup>(129)</sup>. Así pues, con nuestros datos aportamos un nuevo participante en el complejo proceso de la citotoxicidad mediada por gránulos líticos, ya que demostramos que las GTPasas Ral regulan la polarización de estos gránulos y su degranulación.

En primer lugar hemos demostrado que Ral se activa en células líticas. Hemos observado que tanto en CTLs como en la línea celular NK YTS, tras suministrarles un estímulo que induce citotoxicidad, se produce un fuerte incremento en los niveles de Ral-GTP. En el caso de los CTLs de ratón no hemos sido capaces de identificar una activación notable de RalB; esto no parece debido a que RalB se exprese en menor medida en CTLs que RalA, puesto que los niveles de mRNA de RalA y RalB en estas células son equivalentes. En cualquier caso, en el modelo que utilizamos en nuestros experimentos funcionales, las células YTS, está claro que ambas isoformas están presentes y se activan de una manera similar. Se aprecia un pico de actividad a tiempos cortos, un rápido descenso, y un nuevo remonte de los niveles de Ral-GTP. Las razones por las cuales

Ral muestra esta cinética podrían ser varias; una de ellas podría ser la activación de Ral-GAPs que aceleren la hidrólisis de GTP de Ral. Se ha demostrado que en células estimuladas con EGF la actividad de Ral está controlada por el complejo RalGAP1<sup>(240)</sup>. Es posible que la activación de los receptores que activan Ral recluten también complejos con actividad GAP; muchos de los GAPs de Ras tienen dominios SH2 de unión a tirosinas fosforiladas, o PH de unión a lípidos<sup>(20)</sup>, con lo que se reclutan a las regiones donde se están activando receptores de membrana. Es posible que los GAPs de Ral funcionen de manera análoga. La inactivación posterior de este GAP explicaría la recuperación de la actividad de Ral. Una razón biológica para estas dos fases de activación podría estar relacionada con la regulación de dos procesos distintos durante la citotoxicidad. Esto parece concordar con el hecho de que RalA participe en la polarización de la maquinaria secretora y en la degranulación, como discutiremos más adelante. Sin embargo, RalB sigue esta misma cinética y sólo parece ser necesario en la degranulación, lo que invalidaría la explicación de que los dos picos se corresponden con dos funciones. Curiosamente en la literatura no hemos encontrado muchos casos en que Ral muestre una cinética así; bien es cierto que en general las publicaciones que examinan la actividad de Ral suelen analizarla hasta los 10 minutos, con lo que es posible que por esto no se haya observado previamente<sup>(69, 256, 260, 286)</sup>. De hecho la estimulación de plaquetas con PAF causa un rápido aumento de Ral-GTP a 1 minuto, pero Ral vuelve a niveles casi basales a los 3 minutos<sup>(286)</sup>. Únicamente en una publicación, en la que estimulan neutrófilos también con PAF, se ve una cinética similar, con un aumento entre 1 y 3 minutos, remisión de la actividad a 5 y un nuevo pico a 10<sup>(172)</sup>; en este sistema este patrón de activación de Ral es paralelo al de otra GTPasa pequeña, Rap1<sup>(171)</sup>, por lo que este comportamiento no parece exclusivo solamente de Ral.

La manera por la cual Ral podría activarse en respuesta al TCR la hemos discutido en la sección anterior; nos llamó la atención

sin embargo la activación de Ral en respuesta a CD28 y LFA-1, que proporcionan la estimulación mínima necesaria para inducir citotoxicidad <sup>(40)</sup>. Ambos inician rutas de señalización que hasta ahora no habían sido relacionadas con Ral. LFA-1 ha sido estudiado extensamente sobre todo en lo concerniente a la regulación de su adhesividad por los llamados mecanismos inside-out <sup>(184)</sup>, aunque los mecanismos de señalización que parten de esta integrina (outside-in) siguen sin estar claros en absoluto. Moléculas como talina <sup>(173)</sup>, SLP76 <sup>(272)</sup> o PLD/Ras <sup>(183)</sup>, se han implicado en esta ruta, aunque su exacta contribución se desconoce. También se ha descrito que la estimulación de LFA-1 es capaz de inducir fosforilación de PLC $\gamma$ 1 <sup>(132)</sup> y a través de esta lipasa, incrementos en el calcio intracelular <sup>(139)</sup>. El desconocimiento de las vías de señalización de LFA-1 hace que el estudio de Ral como una nueva molécula implicada esta transducción de señales pueda resultar interesante como futuro tema de estudio. Pensamos que la activación de Ral podría estar regulada por Ras, debido a la participación de PLD y PLC $\gamma$ 1 en la señalización a través de LFA-1. Ambas moléculas generan DAG en la membrana que aumenta la actividad de RasGRP y éste de Ras. Utilizamos un inhibidor general de las PLC, el U73221, y observamos una disminución en la fosforilación de ERK, sin embargo RalA no varió notablemente activación máxima, lo que sugiere que otra ruta alternativa a Ras podría regular a Ral en respuesta a LFA-1. Una posibilidad sería que otros GEFs no dependientes de Ras activasen Ral; se ha descrito en HEK293 que RalGPS2, un RalGEF incapaz de unirse a Ras, interacciona con PLC $\gamma$  a través de un dominio rico en prolinas <sup>(50)</sup>. Aún así, en este momento estamos trabajando en aclarar los mecanismos moleculares que llevan a la activación de Ral en respuesta a LFA-1.

Tampoco resulta obvia la explicación de cómo CD28 estimula la actividad de Ral. En la primera sección de los resultados comprobamos que CD28 potencia la producción de Ral-GTP tras la activación del TCR. La unión de CD28 a su ligando B7.1 induce la fosforilación de residuos de tirosina en los denominados dominios YINM; estos, al fosforilarse reclutan Vav1 y

PI3K <sup>(277)</sup>. La actividad PI3K en membrana induce la aproximación de PDK1, que fosforila AKT <sup>(45, 277)</sup>. Se ha descrito un complejo PDK1/RalGDS/Akt requerido para la fosforilación de Akt, pero que además libera el dominio catalítico de RalGDS <sup>(260, 294)</sup>, lo que permitiría la activación de Ral. Esta hipótesis la apoya el hecho de que el inhibidor de PI3K LY94002 reduce notablemente la capacidad de Ral para activarse en respuesta a SC2 ICAM-1/B7.1. Esto no sería extraño, puesto que en otros sistemas RalA también se inhibe por LY94002 <sup>(256, 260)</sup>. Sin embargo, se requieren estudios más profundos para vincular la actividad de Ral a PI3K en respuesta a CD28.

En la mayoría de tejidos en los que se ha estudiado la distribución de Ral, esta GTPasa se suele encontrar asociada a la cara interna de membranas, ya sea la plasmática <sup>(141, 256)</sup>, o de vesículas intracelulares <sup>(56, 255)</sup>. Sin ir más lejos, cuando examinamos su distribución en células Jurkat o linfocitos T primarios en la primera parte, observamos que Ral sigue este patrón. De hecho, en los casos que se ha visto Ral en vesículas, Ral parecería asociarse al compartimento endosomal temprano o de reciclaje <sup>(239, 56, 255)</sup>. Por eso nos sorprendió ver que en las células líticas examinadas, YTS y CTLs, Ral se encuentra en los gránulos líticos, que son de origen lisosomal. No obstante, en algunos sistemas de secreción, se ha observado Ral A o B en vesículas que van a ser secretadas. Ejemplo de esto son las vesículas sinápticas <sup>(24)</sup> o los gránulos densos de plaquetas <sup>(176)</sup>. También se ha detectado Ral en la misma fracción que los cuerpos de Weibel-Palade en gradientes de densidad en plaquetas <sup>(70)</sup>. Hay que resaltar el hecho que los cuerpos de Weibel-Palade son LRO, (*lysosome related organelles*), es decir, comparten biogénesis con los lisosomas. Por lo tanto, esto sentaría un precedente para la localización de Ral en lisosomas modificados, que es lo que en definitiva son los gránulos líticos. Hemos demostrado que esta localización es específica, ya que hicimos uso de diversos marcadores para gránulos líticos; por un lado utilizamos anticuerpos contra perforina, componente esencial de estos gránulos. También utilizamos marcadores de lisosomas, como Lamp2



o lisotracker, que funcionan como marcadores específicos de los gránulos líticos porque en las células citotóxicas no existen otros lisosomas que los gránulos líticos <sup>(38)</sup>. Otra prueba de que esta localización es muy específica es el hecho de que en células 3T3 Ral tampoco muestra colocalización con marcadores lisosomales.

Con estos precedentes, y antes de profundizar en procesos más concretos, decidimos examinar la capacidad citolítica de células YTS en las que hubiésemos disminuído los niveles de RalA o B, ya fuese mediante tecnología de siRNAs o expresando de manera estable shRNAs a través de lentivirus. Utilizamos como células diana las células 721.221, ya que expresan niveles altos de B7.1 y ya han demostrado ser sensibles a células YTS <sup>(13)</sup>. El hecho de que además tengan niveles bajos de MHC, hace que el paralelismo entre los resultados bioquímicos obtenidos con células SC2-ICAM1.1/B7.1 sea mayor. Aún así, quisimos asegurarnos de que los datos bioquímicos obtenidos con las células SC2 se reproducían al estimular células YTS con 721.221 (**Fig R12E**, panel superior). Vimos que la cinética de activación de Ral es similar a cuando estimulamos células YTS con las células de *Drosophila*. Sin embargo, es posible que parte de la fracción activa detectada en estos ensayos de pulldown corresponda a las células 721.221, ya que son de origen humano y el anticuerpo contra RalA no discerniría entre el Ral de uno u otro tipo celular. Además, la conjugación entre la célula citolítica y su diana también produce reorganizaciones de citoesqueleto en esta última, por lo que Ral podría activarse también en la célula diana. Para eliminar estas posibles interferencias, privamos de suero las células 721.221 y las fijamos con 4% PFA (**Fig R12E** panel inferior), eliminando así la posibilidad de que en estas células Ral aumente su actividad. Los resultados son idénticos a los anteriormente obtenidos, por lo que concluimos que las células 721.221 eran un modelo idóneo para seguir nuestros estudios.

Tras examinar la posibilidad de usar diversos métodos para establecer la capacidad citolítica, decidimos utilizar el colorante Alamar Blue <sup>(195)</sup>, que permite una lectura sencilla (un

fluorímetro), no es radiactivo como el <sup>51</sup>Cr <sup>(35, 175)</sup> ni tóxico, ya que no forma cristales como el MTT <sup>(120)</sup>, marca las células de manera uniforme y es extremadamente sensible. Además, ya ha sido utilizado previamente con éxito para medir la citotoxicidad inducida por células NK <sup>(10)</sup>. Redujimos los niveles de RalA y RalB en células YT, y tanto en el caso de la interferencia mediante siRNA como shRNA obtuvimos resultados muy similares: en ambos casos se aprecia un descenso de la citólisis de células 721.221, aunque es más acusado cuando la isoforma afectada es RalA. La diferencia del impacto de la interferencia de una u otra isoforma es probablemente debida al hecho de que, como comentaremos en breve, RalA afecta a dos subprocesos esenciales para el desarrollo normal de la citotoxicidad celular, mientras que RalB sólo afecta a la degranulación. En cualquier caso, al reducir los niveles de Ral no conseguimos eliminar del todo la capacidad citolítica. Esto puede deberse, o bien a que la disminución de las isoformas mediante siRNA o shRNAs no es total (y la poca proteína restante es suficiente para amortiguar el efecto), o a que el resto de GTPasas pequeñas que participan en el proceso consiguen atenuar las consecuencias de los defectos en Ral; al fin y al cabo, la citotoxicidad celular es un proceso muy robusto y regulado, debido a que problemas en ella llevan a patologías muy graves <sup>(8, 90, 166)</sup>. Una aproximación razonable sería comprobar el efecto de inhibir las dos isoformas simultáneamente, RalA y RalB, algo que por el momento estamos poniendo a punto en nuestro laboratorio. Aún así, hay que resaltar que la doble interferencia no tiene por qué resultar en un defecto mayor de la citotoxicidad. En diversas publicaciones, especialmente las que se acercan a las funciones de Ral en cáncer, muestran unos efectos paradójicos entre RalA y RalB. Por ejemplo, en migración de células tumorales muy invasivas, como UMUC-3 y DU145, la inhibición de RalA no tiene efectos sobre la migración, mientras que la reducción de RalB la anula completamente <sup>(204)</sup>, probablemente porque en estas células RalA y RalB tengan diferentes afinidades por sus efectores, como ocurre en otros sistemas, tanto de secreción <sup>(239)</sup> como de migración <sup>(229)</sup>. Ahora bien, la inhibición de las

dos isoformas restaura la capacidad migratoria de estas células. Chien y White <sup>(58)</sup> muestran papeles no solapantes de RalA y B en células tumorales. RNAs de interferencia contra RalA afectan a la proliferación independiente de anclaje, algo que se ha constatado más tarde <sup>(161)</sup> mientras que la inhibición de RalB induce apoptosis masiva. Nuevamente, la disminución simultánea de RalA y RalB no tiene efecto sobre la muerte celular. En este caso los autores proponen un equilibrio entre las dos isoformas en que el déficit de RalB induciría muerte y la ausencia de RalA y RalB reestablecería el equilibrio. En cualquier caso, estamos poniendo actualmente a punto en el laboratorio la disminución de RalGDS con shRNAs, para intentar disminuir la actividad de las dos isoformas simultáneamente como aproximación alternativa.

Una vez comprobado que las GTPasas Ral influyen en el proceso citotóxico, examinamos los posibles subprocesos que podrían estar afectados por la función de Ral. Ral ha sido relacionado con la formación de protrusiones de membrana <sup>(229, 251, 256)</sup>, y eventos regulados por el citoesqueleto de actina <sup>(198)</sup>. Además, Cdc42, es esencial en la ramificación del citoesqueleto de actina a través de su interacción con WASP, lo que estabiliza la estructura de la sinapsis <sup>(25)</sup> y como dijimos en la introducción, RalBP1 podría regular la actividad de cdc42 a través de su dominio GAP <sup>(44, 208)</sup>. Sin embargo, no observamos ninguna diferencia en la capacidad de establecer conjugados estables entre la célula diana y la YTS al reducir los niveles de Ral. Esto puede deberse a la localización de Ral, ya que el hecho de que Ral se encuentre en los gránulos líticos sugiere que el papel de estas GTPasas puede estar más vinculado al destino de estas vesículas. Buena prueba de ello es que es cuando examinamos la polarización de la maquinaria secretora observamos los primeros defectos notables al inhibir RalA. Esto no ocurre, son embargo, con RalB. La manera por la que RalA puede estar regulando la reubicación del MTOC y los gránulos no es fácil de explicar, sobretodo si tenemos en cuenta que RalB no parece influir en este proceso y que en general se unen a los mismos efectores. Un posible candidato a mediar

los efectos en polarización de RalA es el exocisto. Este complejo ya ha demostrado asociarse al MTOC durante citoquinesis <sup>(56)</sup>, por lo que podría colaborar en la localización de este en la zona de la sinapsis. Además, en varios sistemas RalA se asocia con mayor afinidad a Sec5 que RalB <sup>(239, 56)</sup>, lo que explicaría las diferencias a la hora de reducir sus niveles. Ahora bien, tal y como demostramos, la reducción de los niveles de Sec5 mediante siRNAs no afecta la capacidad de las células YTS de polarizar el MTOC ni los gránulos líticos (**Fig R23**). Algunos artículos atribuyen las diferencias fenotípicas entre RalA y B a diferencias en localización <sup>(239)</sup>. Este no parece ser tampoco nuestro caso, puesto que tanto RalA como RalB los encontramos en los gránulos líticos y se movilizan a la zona de contacto de la misma manera.

De todas maneras, debido a que cuando reducimos los niveles de RalA no observamos polarización ni del MTOC, que es el primer elemento en movilizarse a la sinapsis <sup>(42, 248)</sup>, ni de los gránulos líticos, que son arrastrados a través de los microtúbulos hacia la zona de contacto, pensamos que el defecto que induce la ausencia de RalA responde a una alteración en la transducción de señales que lleva al inicio del proceso de polarización. Se ha descrito que la estimulación de LFA-1 es suficiente para inducir la polarización del MTOC y de los gránulos líticos (no su secreción) <sup>(19, 36)</sup>; hemos demostrado que la estimulación con SC2-ICAM.1 inducen una fuerte activación de Ral, así que es lícito considerar, por tanto, que defectos en Ral pueden llevar a problemas en la polarización inducida por LFA-1. Ahora bien, LFA-1 también activa RalB, por lo que nos resulta extraño que la interferencia de RalB no afecte a la polarización de la maquinaria secretora. Es posible que RalB solamente tenga un papel de apoyo en este subproceso. Como hemos comentado en la introducción, dos rutas principales han sido relacionadas con la polarización. Nuevamente hablaremos de cdc42, y la ruta de las MAPK, ERK1 y 2 <sup>(54, 55)</sup>. Cdc42 ha sido relacionado en numerosos trabajos con la polarización del MTOC <sup>(18, 250, 265, 278)</sup>, por su regulación del



citoesqueleto de actina a través de WASP y CIP4. WASP se acumula en el pSMAC, y su ausencia se traduce en una reducida polimerización de actina en la sinapsis, y defectos en la polarización de la célula <sup>(102, 201)</sup>. CIP4 por su parte se asocia a  $\alpha$ -tubulina y se relocaliza a la sinapsis junto con el MTOC y WASP <sup>(261)</sup>. Ral podría regular cdc42 a través de su efector RalBP1. Algunos de los primeros artículos que discutían una posible regulación de cdc42 por parte de Ral proponían que Ral podría potenciar la actividad de cdc42 al inhibir el dominio GAP de RalBP1 <sup>(86)</sup>, así que si esto fuese cierto, en nuestro sistema un defecto en Ral podría traducirse en menor actividad de cdc42. Otro hipotético nexo entre Ral y cdc42 es IQGAP1, una proteína que se ha demostrado que se une, tanto en levaduras como en células de mamífero, a cdc42 <sup>(202, 223)</sup> y a las subunidades del exocisto Sec3 <sup>(202)</sup> y Exo70 <sup>(203)</sup>, constitutivamente vinculadas a la membrana plasmática. Hay que puntualizar, sin embargo, que si hubiera defectos en la polimerización de actina, una posible consecuencia sería que la conjugación con la célula diana debería estar afectada, y no éste no es el caso. De cualquier forma, como experimentos futuros nos hemos planteado estudiar la actividad de cdc42 mediante pulldown utilizando los dominios CRIB de WASP o PAK <sup>(293)</sup> tras interferir RalA o RalB. De esta manera certificaríamos o descartaríamos un posible control de Ral de cdc42-Arp2, etc.

Otra alternativa es que Ral esté regulando la ruta de ERK1 y 2 a través de su efector PLD1. Se ha demostrado que la polarización de la maquinaria secretora ocurre con mayor dificultad en presencia de inhibidores de MEK1 o 2 y de ERK1 o 2 <sup>(54)</sup>. De hecho, resulta especialmente crítica la disminución de los niveles de ERK2, que anula completamente la polarización del MTOC. La manera por la cual Ral pudiera regular esta vía consistiría en que, en respuesta a una señal inductora de citotoxicidad, la PLD1 asociada constitutivamente a Ral llevaría a un aumento del DAG, que como dijimos antes, a través de DAG/RasGRP/Ras aumentaría la fosforilación de ERK1/2 <sup>(126, 183)</sup>. Esta posibilidad ya hemos empezado a estudiarla, examinando los

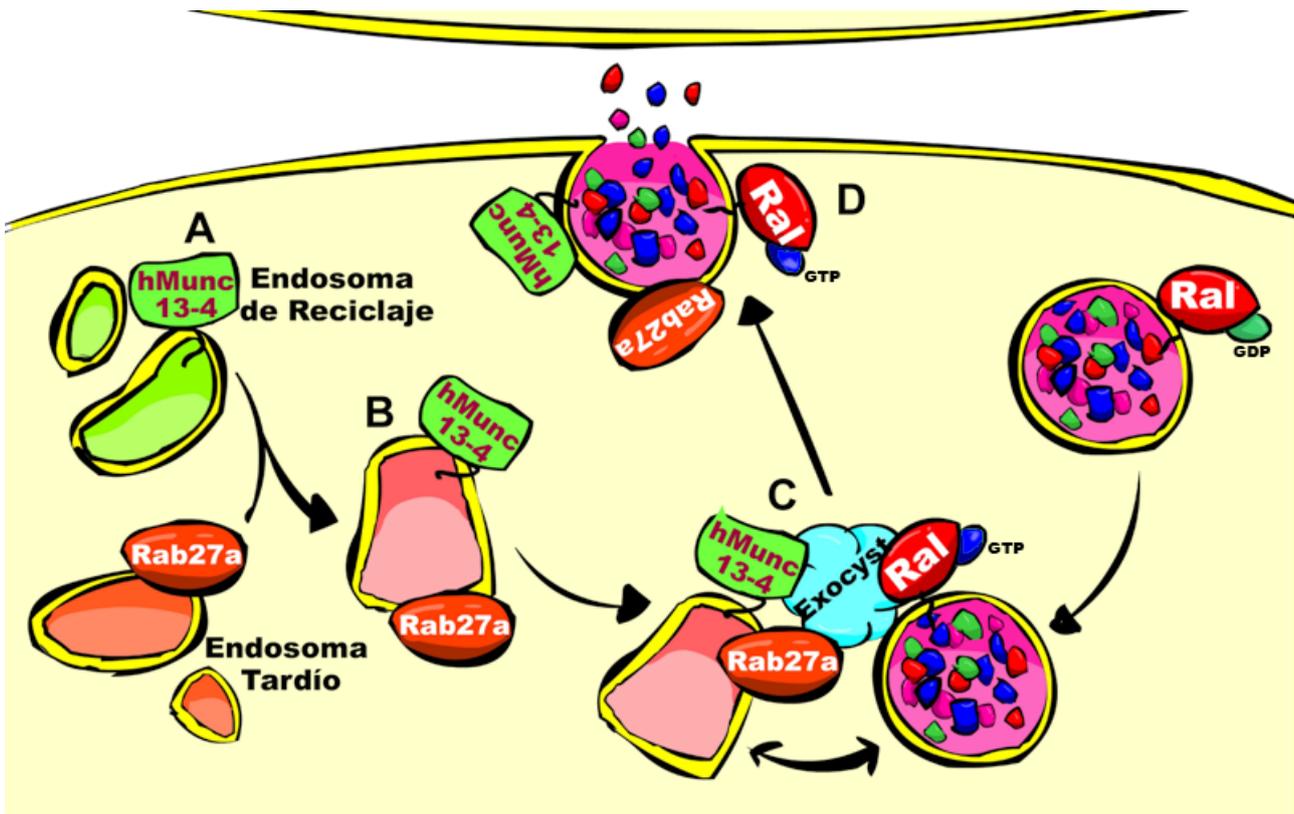
niveles de pERK en células YTS que expresan de manera estable shRNAs de RalA y de RalB. Los experimentos no muestran grandes diferencias entre células con un shCtrl y las que expresan shRNAs contra RalA o B, ni inicialmente ni tras estimularlas con células diana. Sin embargo, es posible que la señalización a través CD28, que no induce polarización de por sí, esté generando pERK que enmascare un posible defecto en esta ruta al interferir Ral. Los procesos de polarización y de secreción no son mutuamente dependientes, pueden ocurrir uno en ausencia del otro, por lo tanto el experimento realizado podría refinarse utilizando como estímulo células SC2 expresando solamente ICAM1.1, lo cual induciría solamente polarización, y así detectaríamos sólo el pERK correspondiente a la estimulación de LFA-1. En todo caso, sería interesante examinar si el pERK detectado presenta la misma localización en las células control que en las que expresan el shRNA de RalA, puesto que en algunos casos, una señal activadora deslocalizada puede llevar al MTOC a no polarizarse en absoluto; esto ocurre en CTLs tratados con PMA o carentes de actividad DGKII, que simulan una señal deslocalizada de DAG <sup>(217)</sup>.

Al examinar la función secretora de los gránulos líticos hemos comprobado que la reducción tanto de RalA como de RalB afecta notablemente la capacidad de secretar gránulos líticos de las células YTS, cuantificada a través de la expresión de Lamp1 (CD107a) en la membrana plasmática <sup>(36, 164)</sup>. Habíamos comprobado previamente que las células con niveles bajos de Ral expresan perforina de manera normal y que no muestran defectos en la cantidad de gránulos líticos, como se observa en las inmunofluorescencias. Así pues, la translocación defectiva de CD107a en la membrana parece deberse a un problema en la propia secreción. Hemos comentado ya con anterioridad diversas funciones de exocitosis y secreción polarizada en los que la función de Ral es imprescindible, subrayando la relevancia del exocisto al mediar los efectos de Ral en estos procesos. La secreción polarizada al compartimento basolateral <sup>(105, 187, 239)</sup> o la secreción plaquetaria de gránulos

densos <sup>(135)</sup> son sólo algunos ejemplos. Éste último sistema resulta de gran interés al analizar nuestros resultados; en primer lugar porque los gránulos densos contienen Ral <sup>(176)</sup>, de manera análoga a lo que vemos en gránulos líticos. En segundo lugar, porque muchas de las proteínas que regulan el anclaje y fusión de gránulos densos, como hMunc13-4 <sup>(241)</sup>, tienen una función esencial también en secreción citolítica, como discutiremos más adelante.

El hecho de que RalA y RalB se unan al exocisto (como muestran las inmunoprecipitaciones) y que la inhibición de Sec5 disminuya la inducción de la secreción nos lleva a pensar que la regulación de la secreción es a través de este complejo octamérico. Hemos demostrado que diferentes subunidades de este complejo se encuentran en diversos compartimentos o localizaciones subcelulares; Sec8 se encuentra mayoritariamente en los gránulos líticos, al igual que Ral, aunque en las inmunofluorescencias se aprecia que una fracción de Sec8 no forma parte de estos gránulos. Sec10 aparece difuso por el citoplasma o asociado a vesículas cuya naturaleza no hemos determinado aún. Por su parte, Sec5 se encuentra en vesículas diferentes a los gránulos líticos, parcialmente asociado al endosoma de reciclaje, puesto que parte de la tinción de Sec5 es similar a la de Rab11. Si revisamos la literatura, la localización específica de las isoformas no parece constante entre sistemas. Por ejemplo, en plaquetas Sec5 y 8 se encuentran en el citosol, pero también en membrana plasmática <sup>(135)</sup>; en células de riñón de rata Sec8 y Sec5 se encuentran asociados constitutivamente en un hemicomplejo, que requiere la actividad de Ral para ensamblarse con el resto de subunidades <sup>(229)</sup>. De cualquier modo, cuando estimulamos una célula YTS con células diana una fracción de estas subunidades se agrupa y concentra próxima a la zona de contacto. Sumado a los datos bioquímicos y a que la disminución de Sec5 afecta a la secreción, mostramos aquí un papel del exocisto en la degranulación de los gránulos líticos. Su función precisa no la podemos concretar, aunque existe información suficiente para especular acerca de

ella. Una pista de lo que puede estar ocurriendo nos la dan los complejos SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) implicados de manera crítica en el anclaje de los gránulos líticos. Algunos autores proponen que en los sistemas de secreción mediados por el exocisto, este complejo actúa ensamblándose como parche entre la membrana diana y la vesícula, colaborando en el anclaje específico de las vesículas a la membrana diana, justo antes de que se formen los complejos SNARE y establezcan el anclaje <sup>(188, 254, 289)</sup>. Estudios relativamente recientes remarcan la importancia de estas proteínas en la secreción lítica. Defectos en Syntaxina11 no sólo reducen la capacidad secretora de células NK sino que además se han asociado a linfocitosis fagocíticas (FHL) <sup>(8)</sup>. La ausencia de la v-SNARE Vamp8 también disminuye la degranulación <sup>(166)</sup>. Lo más notable es que, a pesar de los defectos en degranulación, la conjugación y la polarización de los gránulos líticos, así como la producción y número de estos, permanecen intactos. Observamos, pues, un gran paralelismo con nuestros resultados (los defectos en la polarización del MTOC al reducir RalA no están mediados por el exocisto, como demostramos al reducir los niveles de Sec5). Estas similitudes sugerirían que también en este sistema el exocisto facilita la unión del gránulo lítico a la membrana diana, actuando antes de los complejos SNARE. Aún así, ésta no es la única explicación posible del papel de Ral y el exocisto en degranulación. Tal como describimos en la introducción, Rab27a y hMunc13-4 son esenciales en el anclaje y fusión de los gránulos líticos a la membrana plasmática <sup>(87, 179)</sup>. Defectos en cualquiera de los dos deriva en patologías graves, al igual que en el caso de los defectos en proteínas de la familia SNARE. Pues bien, la subunidad del exocisto Exo84, que interacciona directamente con Ral activo, es capaz de interaccionar con BAIAP3, miembro de la familia de hMunc13 <sup>(206)</sup>. De igual manera, Sec15 se asocia a Rab27a en ensayos de doble híbrido <sup>(291)</sup> y hMunc13-4 es necesario en secreción de gránulos densos de plaquetas <sup>(241)</sup>, un proceso en el que el exocisto tiene un papel crucial. Se nos ocurren por lo tanto, dos maneras en la que



**Figura D1:**

Modelo de secreción de gránulos líticos regulado por Ral y el exocisto:

En este modelo proponemos que las GTPasas Ral y el exocisto podrían regular la fusión heterotípica entre los gránulos líticos y componentes del endosoma de reciclaje y del endosoma tardío, y de esta manera facilitar la imprescindible maduración de estos gránulos, sin la que no pueden ser secretados. A) Vesículas del endosoma de reciclaje se fusionarían con otras del endosoma tardío generando vesículas con componentes de ambas (B), entre ellos Rab27 y hMunc13-4. C) Ral regularía el ensamblaje del exocisto; algunas de sus subunidades son capaces de interactuar con hMunc13-4 y con Rab27a, de manera que la formación del exocisto podría colaborar en la fusión entre los gránulos líticos y la vesícula mixta. D) Una vez adquiridos todos los componentes necesarios para el anclaje y la fusión de membranas, el gránulo lítico se secreta.

Ral y el exocisto podrían estar implicados en el anclaje y secreción de los gránulos líticos. En primer lugar, Ral activo induciría el ensamblaje del exocisto específicamente entre el gránulo y la membrana plasmática, lo que facilitaría el anclaje mediado por SNAREs y finalmente la fusión. Sin embargo, esto implicaría que todos los componentes del exocisto se encuentran en el gránulo, en la membrana plasmática o solubles en el citoplasma; ahora bien, hemos visto que algunos componentes como Sec5 se encuentran en vesículas independientes de los gránulos líticos, lo cual restaría validez a este modelo. La presencia en células YTS de componentes del exocisto en distintos compartimentos vesiculares que finalmente colocan en la zona de contacto

al formarse el conjugado con la célula diana (**Figura R21C**), sugiere que existe una fusión heterotípica entre estas vesículas. La fusión entre los gránulos líticos, el endosoma tardío (en el que se encuentra Rab27a) y el de reciclaje (donde encontramos h-Munc13.4 y Rab11, que se ha relacionado con Sec15<sup>(291,295)</sup>) es necesaria, como hemos dicho, para la maduración de los gránulos líticos. Ral, al inducir el ensamblaje del exocisto, estaría favoreciendo la fusión de estas vesículas (**Figura D1**), un paso sin el cual estos nunca llegan a anclarse ni a secretar su contenido<sup>(179)</sup>.

Aunque se requieren más estudios, en este trabajo aportamos, por tanto, una nueva pieza del rompecabezas molecular que es el

último paso de la secreción de gránulos líticos. Habrá que profundizar en el futuro en el papel exacto de Ral en este proceso, y también en las posibles implicaciones en patología. Como hemos dicho, mutaciones o defectos en proteínas como syntaxina 11, h-Munc13.4 y Rab27a llevan a linfocitosis hemofagocíticas (8, 87, 298). Estos síndromes se caracterizan por hiperactivación del sistema inmune, fiebre, sarpullidos, esplenomegalia y severos defectos en citotoxicidad mediada por CTLs y NKs (124). Sería interesante, así pues, estudiar la posible asociación de mutaciones en Ral o componentes del exocisto a patologías de este tipo.

Finalmente, la contribución de estas GTPasas a la secreción polarizada abre también nuevas posibilidades en el estudio de la secreción de citoquinas por parte de células CD4<sup>+</sup>-cooperadoras. Estas células muestran una sinapsis secretora muy similar a la de las células líticas pero su mecanismo de secreción está todavía relativamente poco estudiado. La implicación en este proceso, además, supondría un papel de Ral en células T no líticas, en las cuales, como hemos visto en la primera parte de la tesis, Ral se activa y relocaliza a la zona de la sinapsis. Por esta razón sería muy interesante evaluar el papel de Ral en secreción polarizada de citoquinas.







## *Conclusiones:*

### *Parte 1: Papel de las GTPasas Ral en la función de los linfocitos T:*

- 1.) Las GTPasas Ral se activan en respuesta a la estimulación del receptor de antígeno de los linfocitos T. La fracción unida a GTP de Ral aumenta tras estimular el TCR con anticuerpos específicos. El hecho de que también aumente en respuesta a PMA o ionomicina sugiere la implicación de PLC $\gamma$  en la activación de Ral.
- 2.) En linfocitos T, Ral A y B se encuentran mayoritariamente en vesículas intracelulares, pero también en membrana plasmática. Sin embargo, en presencia de una célula presentadora de antígeno RalA y RalB se relocalizan a la zona de contacto entre las dos células.
- 3.) Los incrementos en la actividad de Ral mediante la utilización de mutantes activos, o la interferencia con alguna de sus isoformas alteran la capacidad de las células Jurkat de activarse en respuesta a la estimulación del TCR.
- 4.) Los linfocitos T de ratones RalGDS<sup>-/-</sup> muestran una menor capacidad para activar Ral tras la estimulación de su TCR. Sin embargo, estos ratones no presentan defectos en el desarrollo de las poblaciones linfoides, ni los animales adultos ni ratones envejecidos.
- 5.) Al analizar la función de linfocitos T de animales RalGDS<sup>-/-</sup>, estos no muestran defectos ni en proliferación ni en expresión de marcadores de activación en respuesta a la estimulación del TCR.

### *Parte 2: Las GTPasas Ral en citotoxicidad celular:*

- 1.) Ral se activa en respuesta a estímulos que inducen citotoxicidad, tanto en linfocitos T citotóxicos como en la línea de células NK YTS. En las células YTS se producen incrementos en la fracción unida a GTP de Ral tanto en respuesta a CD28 como a LFA-1. La actividad de PI3K es necesaria en la estimulación de Ral vía CD28; sin embargo no parece requerirse actividad de Ras para la activación de Ral a través de LFA-1.
- 2.) Tanto Ral A como RalB se encuentran en los gránulos líticos en células citotóxicas, como muestran diferentes marcadores de este compartimento subcelular. Cuando los gránulos líticos se relocalizan a la zona de contacto, Ral también se moviliza con ellos.

- 3.) La reducción de los niveles tanto de RalA como de RalB reduce la capacidad citotóxica de células YTS. Este defecto se debe a alteraciones en la degranulación, y en el caso de RalA, también a problemas en la movilización de la maquinaria secretora a la zona de la sinapsis secretora.
- 4.) El complejo octamérico del exocisto, relacionado con secreción polarizada y cuya formación regula Ral, se ensambla en respuesta a estímulos que inducen citotoxicidad. En este complejo se encuentra Ral activo. La subunidad Sec8 del exocisto se encuentra en los gránulos líticos, mientras que otras subunidades como Sec5 o Sec10 muestran localizaciones vesiculares independientes de estos gránulos. Al producirse una interacción con una célula diana, todas estas subunidades se agrupan en torno a la zona de contacto.
- 5.) La interferencia con el ensamblaje del exocisto mediante la reducción de los niveles de Sec5 disminuye la capacidad citolítica de las células YTS. Este defecto se debe a que la interferencia con Sec5 altera la secreción de gránulos líticos frente a una célula diana.







## Referencias:

1. Acuto, O., and F. Michel. 2003. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol* 3:939-51.
2. Aguirre-Ghiso, J. A., P. Frankel, E. F. Farias, Z. Lu, H. Jiang, A. Olsen, L. A. Feig, E. B. de Kier Joffe, and D. A. Foster. 1999. RalA requirement for v-Src- and v-Ras-induced tumorigenicity and overproduction of urokinase-type plasminogen activator: involvement of metalloproteases. *Oncogene* 18:4718-25.
3. Albright, C. F., B. W. Giddings, J. Liu, M. Vito, and R. A. Weinberg. 1993. Characterization of a guanine nucleotide dissociation stimulator for a ras-related GTPase. *Embo J* 12:339-47.
4. Alter, G., J. M. Malenfant, and M. Altfeld. 2004. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 294:15-22.
5. Andres, P. G., K. C. Howland, D. Dresnek, S. Edmondson, A. K. Abbas, and M. F. Krummel. 2004. CD28 signals in the immature immunological synapse. *J Immunol* 172:5880-6.
6. Andrews, H. K., Y. Q. Zhang, N. Trotta, and K. Broadie. 2002. Drosophila sec10 is required for hormone secretion but not general exocytosis or neurotransmission. *Traffic* 3:906-21.
7. Arase, H., E. S. Mocarski, A. E. Campbell, A. B. Hill, and L. L. Lanier. 2002. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* 296:1323-6.
8. Arneson, L. N., A. Brickshawana, C. M. Segovis, R. A. Schoon, C. J. Dick, and P. J. Leibson. 2007. Cutting edge: syntaxin 11 regulates lymphocyte-mediated secretion and cytotoxicity. *J Immunol* 179:3397-401.
9. Arrieumerlou, C., C. Randriamampita, G. Bismuth, and A. Trautmann. 2000. Rac is involved in early TCR signaling. *J Immunol* 165:3182-9.
10. Ashiru, O., P. Boutet, L. Fernandez-Messina, S. Aguera-Gonzalez, J. N. Skepper, M. Vales-Gomez, and H. T. Reyburn. Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure to the human NKG2D ligand MICA\*008 that is shed by tumor cells in exosomes. *Cancer Res* 70:481-9.
11. Awasthi, S., S. S. Singhal, Y. C. Awasthi, B. Martin, J. H. Woo, C. C. Cunningham, and A. E. Frankel. 2008. RLIP76 and Cancer. *Clin Cancer Res* 14:4372-7.
12. Awasthi, Y. C., R. Sharma, S. Yadav, S. Dwivedi, A. Sharma, and S. Awasthi. 2007. The non-ABC drug transporter RLIP76 (RALBP-1) plays a major role in the mechanisms of drug resistance. *Curr Drug Metab* 8:315-23.
13. Azuma, M., M. Cayabyab, D. Buck, J. H. Phillips, and L. L. Lanier. 1992. Involvement of CD28 in MHC-unrestricted cytotoxicity mediated by a human natural killer leukemia cell line. *J Immunol* 149:1115-23.
14. Balaji, K. N., N. Schaschke, W. Machleidt, M. Catalfamo, and P. A. Henkart. 2002. Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J Exp Med* 196:493-503.
15. Balda, M. S., M. D. Garrett, and K. Matter. 2003. The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J Cell Biol* 160:423-32.
16. Balda, M. S., and K. Matter. 2000. The tight junction protein ZO-1 and an

- interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *Embo J* 19:2024-33.
17. Baldari, C. T., G. Macchia, and J. L. Telford. 1992. Interleukin-2 promoter activation in T-cells expressing activated Ha-ras. *J Biol Chem* 267:4289-91.
  18. Banerjee, P. P., R. Pandey, R. Zheng, M. M. Suhoski, L. Monaco-Shawver, and J. S. Orange. 2007. Cdc42-interacting protein-4 functionally links actin and microtubule networks at the cytolytic NK cell immunological synapse. *J Exp Med* 204:2305-20.
  19. Barber, D. F., M. Faure, and E. O. Long. 2004. LFA-1 contributes an early signal for NK cell cytotoxicity. *J Immunol* 173:3653-9.
  20. Bernards, A., and J. Settleman. 2004. GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol* 14:377-85.
  21. Betz, A., M. Okamoto, F. Benseler, and N. Brose. 1997. Direct interaction of the rat unc-13 homologue Munc13-1 with the N terminus of syntaxin. *J Biol Chem* 272:2520-6.
  22. Bevan, M. J. 2006. In a radiation chimaera, host H-2 antigens determine immune responsiveness of donor cytotoxic cells. *Nature* 197. 269: 417-418. *J Immunol* 176:5-6.
  23. Bhattacharya, M., P. H. Anborgh, A. V. Babwah, L. B. Dale, T. Dobransky, J. L. Benovic, R. D. Feldman, J. M. Verdi, R. J. Rylett, and S. S. Ferguson. 2002. Beta-arrestins regulate a Ral-GDS Ral effector pathway that mediates cytoskeletal reorganization. *Nat Cell Biol* 4:547-55.
  24. Bielinski, D. F., H. Y. Pyun, K. Linko-Stentz, I. G. Macara, and R. E. Fine. 1993. Ral and Rab3a are major GTP-binding proteins of axonal rapid transport and synaptic vesicles and do not redistribute following depolarization stimulated synaptosomal exocytosis. *Biochim Biophys Acta* 1151:246-56.
  25. Billadeau, D. D., and J. K. Burkhardt. 2006. Regulation of cytoskeletal dynamics at the immune synapse: new stars join the actin troupe. *Traffic* 7:1451-60.
  26. Biron, C. A., K. S. Byron, and J. L. Sullivan. 1989. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med* 320:1731-5.
  27. Bischoff, J. R., L. Anderson, Y. Zhu, K. Mossie, L. Ng, B. Souza, B. Schryver, P. Flanagan, F. Clairvoyant, C. Ginther, C. S. Chan, M. Novotny, D. J. Slamon, and G. D. Plowman. 1998. A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *Embo J* 17:3052-65.
  28. Blangy, A., L. Arnaud, and E. A. Nigg. 1997. Phosphorylation by p34cdc2 protein kinase regulates binding of the kinesin-related motor HsEg5 to the dynactin subunit p150. *J Biol Chem* 272:19418-24.
  29. Blott, E. J., and G. M. Griffiths. 2002. Secretory lysosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:122-31.
  30. Bodemann, B. O., and M. A. White. 2008. Ral GTPases and cancer: linchpin support of the tumorigenic platform. *Nat Rev Cancer* 8:133-40.
  31. Boissel, L., N. Houssin, A. Chikh, A. Rynditch, L. Van Hove, and J. Moreau. 2007. Recruitment of Cdc42 through the GAP domain of RLIP participates in remodeling of the actin cytoskeleton and is involved in *Xenopus* gastrulation. *Dev Biol* 312:331-43.
  32. Bos, J. L., H. Rehmann, and A. Wittinghofer. 2007. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 129:865-77.
  33. Bossi, G., C. Trambas, S. Booth, R. Clark, J. Stinchcombe, and G. M. Griffiths. 2002. The secretory synapse: the secrets of a serial killer. *Immunol Rev* 189:152-60.
  34. Boyd, C., T. Hughes, M. Pypaert, and P. Novick. 2004. Vesicles carry most exocyst subunits to exocytic sites marked by the remaining two subunits, Sec3p and Exo70p. *J Cell Biol* 167:889-901.



35. Brunner, K. T., J. Mael, J. C. Cerottini, and B. Chapuis. 1968. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* 14:181-96.
36. Bryceson, Y. T., M. E. March, D. F. Barber, H. G. Ljunggren, and E. O. Long. 2005. Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. *J Exp Med* 202:1001-12.
37. Buchert, M., C. Darido, E. Lagerqvist, A. Sedello, C. Cazevielle, F. Buchholz, J. F. Bourgaux, J. Pannequin, D. Joubert, and F. Hollande. 2009. The symplekin/ZONAB complex inhibits intestinal cell differentiation by the repression of AML1/Runx1. *Gastroenterology* 137:156-64, 164 e1-3.
38. Burkhardt, J. K., S. Hester, C. K. Lapham, and Y. Argon. 1990. The lytic granules of natural killer cells are dual-function organelles combining secretory and pre-lysosomal compartments. *J Cell Biol* 111:2327-40.
39. Burshtyn, D. N., A. M. Scharenberg, N. Wagtmann, S. Rajagopalan, K. Berrada, T. Yi, J. P. Kinet, and E. O. Long. 1996. Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitor receptor. *Immunity* 4:77-85.
40. Cai, Z., A. Brunmark, M. R. Jackson, D. Loh, P. A. Peterson, and J. Sprent. 1996. Transfected *Drosophila* cells as a probe for defining the minimal requirements for stimulating unprimed CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14736-41.
41. Camonis, J. H., and M. A. White. 2005. Ral GTPases: corrupting the exocyst in cancer cells. *Trends Cell Biol* 15:327-32.
42. Cannon, J. L., and J. K. Burkhardt. 2002. The regulation of actin remodeling during T-cell-APC conjugate formation. *Immunol Rev* 186:90-9.
43. Cantalupo, G., P. Alifano, V. Roberti, C. B. Bruni, and C. Bucci. 2001. Rab-interacting lysosomal protein (RILP): the Rab7 effector required for transport to lysosomes. *Embo J* 20:683-93.
44. Cantor, S. B., T. Urano, and L. A. Feig. 1995. Identification and characterization of Ral-binding protein 1, a potential downstream target of Ral GTPases. *Mol Cell Biol* 15:4578-84.
45. Cantrell, D. 2002. Protein kinase B (Akt) regulation and function in T lymphocytes. *Semin Immunol* 14:19-26.
46. Carrasco, S., and I. Merida. 2004. Diacylglycerol-dependent binding recruits PKC $\theta$  and RasGRP1 C1 domains to specific subcellular localizations in living T lymphocytes. *Mol Biol Cell* 15:2932-42.
47. Castellanos, M. C., C. Munoz, M. C. Montoya, E. Lara-Pezzi, M. Lopez-Cabrera, and M. O. de Landazuri. 1997. Expression of the leukocyte early activation antigen CD69 is regulated by the transcription factor AP-1. *J Immunol* 159:5463-73.
48. Cebrian, M., E. Yague, M. Rincon, M. Lopez-Botet, M. O. de Landazuri, and F. Sanchez-Madrid. 1988. Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. *J Exp Med* 168:1621-37.
49. Ceriani, M., L. Amigoni, C. Scandiuzzi, G. Berruti, and E. Martegani. The PH-PxxP domain of RalGPS2 promotes PC12 cells differentiation acting as a dominant negative for RalA GTPase activation. *Neurosci Res* 66:290-8.
50. Ceriani, M., C. Scandiuzzi, L. Amigoni, R. Tisi, G. Berruti, and E. Martegani. 2007. Functional analysis of RalGPS2, a murine guanine nucleotide exchange factor for RalA GTPase. *Exp Cell Res* 313:2293-307.
51. Chardin, P., and A. Tavitian. 1986. The ral gene: a new ras related gene isolated by the use of a synthetic probe. *Embo J* 5:2203-8.
52. Chavez-Galan, L., M. C. Arenas-Del Angel, E. Zenteno, R. Chavez, and R.

- Lascurain. 2009. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol* 6:15-25.
53. Chen, J. J., Y. Sun, and G. J. Nabel. 1998. Regulation of the proinflammatory effects of Fas ligand (CD95L). *Science* 282:1714-7.
54. Chen, X., D. S. Allan, K. Krzewski, B. Ge, H. Kopcow, and J. L. Strominger. 2006. CD28-stimulated ERK2 phosphorylation is required for polarization of the microtubule organizing center and granules in YTS NK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:10346-51.
55. Chen, X., P. P. Trivedi, B. Ge, K. Krzewski, and J. L. Strominger. 2007. Many NK cell receptors activate ERK2 and JNK1 to trigger microtubule organizing center and granule polarization and cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:6329-34.
56. Chen, X. W., M. Inoue, S. C. Hsu, and A. R. Saltiel. 2006. RalA-exocyst-dependent recycling endosome trafficking is required for the completion of cytokinesis. *J Biol Chem* 281:38609-16.
57. Chien, Y., S. Kim, R. Bumeister, Y. M. Loo, S. W. Kwon, C. L. Johnson, M. G. Balakireva, Y. Romeo, L. Kopelovich, M. Gale, Jr., C. Yeaman, J. H. Camonis, Y. Zhao, and M. A. White. 2006. RalB GTPase-mediated activation of the I $\kappa$ B family kinase TBK1 couples innate immune signaling to tumor cell survival. *Cell* 127:157-70.
58. Chien, Y., and M. A. White. 2003. RAL GTPases are linchpin modulators of human tumour-cell proliferation and survival. *EMBO Rep* 4:800-6.
59. Chiesa, S., E. Tomasello, E. Vivier, and F. Vely. 2005. Coordination of activating and inhibitory signals in natural killer cells. *Mol Immunol* 42:477-84.
60. Chuang, S. S., P. R. Kumaresan, and P. A. Mathew. 2001. 2B4 (CD244)-mediated activation of cytotoxicity and IFN-gamma release in human NK cells involves distinct pathways. *J Immunol* 167:6210-6.
61. Clark, R. H., J. C. Stinchcombe, A. Day, E. Blott, S. Booth, G. Bossi, T. Hamblin, E. G. Davies, and G. M. Griffiths. 2003. Adaptor protein 3-dependent microtubule-mediated movement of lytic granules to the immunological synapse. *Nat Immunol* 4:1111-20.
62. Clough, R. R., R. S. Sidhu, and R. P. Bhullar. 2002. Calmodulin binds RalA and RalB and is required for the thrombin-induced activation of Ral in human platelets. *J Biol Chem* 277:28972-80.
63. Coughlin, J. J., S. L. Stang, N. A. Dower, and J. C. Stone. 2005. RasGRP1 and RasGRP3 regulate B cell proliferation by facilitating B cell receptor-Ras signaling. *J Immunol* 175:7179-84.
64. Czyzyk, J., J. L. Brogdon, A. Badou, O. Henegariu, P. Preston Hurlburt, R. Flavell, and K. Bottomly. 2003. Activation of CD4 T cells by Raf-independent effectors of Ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6003-8.
65. Daniels, M. A., E. Teixeira, J. Gill, B. Hausmann, D. Roubaty, K. Holmberg, G. Werlen, G. A. Hollander, N. R. Gascoigne, and E. Palmer. 2006. Thymic selection threshold defined by compartmentalization of Ras/MAPK signalling. *Nature* 444:724-9.
66. Darmon, A. J., D. W. Nicholson, and R. C. Bleackley. 1995. Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* 377:446-8.
67. Davignon, D., E. Martz, T. Reynolds, K. Kurzinger, and T. A. Springer. 1981. Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1): a surface antigen distinct from Lyt-2,3 that participates in T lymphocyte-mediated killing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:4535-9.
68. de Bruyn, K. M., J. de Rooij, R. M. Wolthuis, H. Rehmann, J. Wesenbeek, R. H. Cool, A. H. Wittinghofer, and J. L. Bos. 2000. RalGEF2, a pleckstrin homology domain containing guanine nucleotide exchange factor for Ral. *J Biol*



- Chem 275:29761-6.
69. de Gorter, D. J., J. C. Vos, S. T. Pals, and M. Spaargaren. 2007. The B cell antigen receptor controls AP-1 and NFAT activity through Ras-mediated activation of Ral. *J Immunol* 178:1405-14.
  70. de Leeuw, H. P., P. M. Wijers-Koster, J. A. van Mourik, and J. Voorberg. 1999. Small GTP-binding protein RalA associates with Weibel-Palade bodies in endothelial cells. *Thromb Haemost* 82:1177-81.
  71. Delgado, P., E. Fernandez, V. Dave, D. Kappes, and B. Alarcon. 2000. CD3delta couples T-cell receptor signalling to ERK activation and thymocyte positive selection. *Nature* 406:426-30.
  72. Dell'Angelica, E. C., C. Mullins, S. Caplan, and J. S. Bonifacino. 2000. Lysosome-related organelles. *Faseb J* 14:1265-78.
  73. Delon, J., K. Kaibuchi, and R. N. Germain. 2001. Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. *Immunity* 15:691-701.
  74. Djeu, J. Y., K. Jiang, and S. Wei. 2002. A view to a kill: signals triggering cytotoxicity. *Clin Cancer Res* 8:636-40.
  75. Dong, C., D. D. Yang, M. Wusk, A. J. Whitmarsh, R. J. Davis, and R. A. Flavell. 1998. Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1. *Science* 282:2092-5.
  76. Dower, N. A., S. L. Stang, D. A. Bottorff, J. O. Ebinu, P. Dickie, H. L. Ostergaard, and J. C. Stone. 2000. RasGRP is essential for mouse thymocyte differentiation and TCR signaling. *Nat Immunol* 1:317-21.
  77. Dupre, L., A. Aiuti, S. Trifari, S. Martino, P. Saracco, C. Bordignon, and M. G. Roncarolo. 2002. Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates lipid raft dynamics during immunological synapse formation. *Immunity* 17:157-66.
  78. Dupuis, M., E. Schaerer, K. H. Krause, and J. Tschopp. 1993. The calcium-binding protein calreticulin is a major constituent of lytic granules in cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 177:1-7.
  79. Dustin, M. L., and E. O. Long. Cytotoxic immunological synapses. *Immunol Rev* 235:24-34.
  80. Ebinu, J. O., S. L. Stang, C. Teixeira, D. A. Bottorff, J. Hooton, P. M. Blumberg, M. Barry, R. C. Bleakley, H. L. Ostergaard, and J. C. Stone. 2000. RasGRP links T-cell receptor signaling to Ras. *Blood* 95:3199-203.
  81. Egen, J. G., and J. P. Allison. 2002. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity* 16:23-35.
  82. Emkey, R., S. Freedman, and L. A. Feig. 1991. Characterization of a GTPase-activating protein for the Ras-related Ral protein. *J Biol Chem* 266:9703-6.
  83. Fan, S., Q. Meng, J. J. Laterra, and E. M. Rosen. 2007. Ras effector pathways modulate scatter factor-stimulated NF-kappaB signaling and protection against DNA damage. *Oncogene* 26:4774-96.
  84. Feig, L. A. 2003. Ral-GTPases: approaching their 15 minutes of fame. *Trends Cell Biol* 13:419-25.
  85. Feig, L. A. 1999. Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases. *Nat Cell Biol* 1:E25-7.
  86. Feig, L. A., T. Urano, and S. Cantor. 1996. Evidence for a Ras/Ral signaling cascade. *Trends Biochem Sci* 21:438-41.
  87. Feldmann, J., I. Callebaut, G. Raposo, S. Certain, D. Bacq, C. Dumont, N. Lambert, M. Ouachee-Chardin, G. Chedeville, H. Tamary, V. Minard-Colin, E. Vilmer, S. Blanche, F. Le Deist, A. Fischer, and G. de Saint Basile. 2003. Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell* 115:461-73.
  88. Ferro, E., D. Magrini, P. Guazzi, T. H. Fischer, S. Pistolesi, R. Pogni, G. C. White, and L. Trabalzini. 2008. G-protein binding features and regulation of the

- RalGDS family member, RGL2. *Biochem J* 415:145-54.
89. Fields, P. E., T. F. Gajewski, and F. W. Fitch. 1996. Blocked Ras activation in anergic CD4<sup>+</sup> T cells. *Science* 271:1276-8.
90. Fischer, A., S. Latour, and G. de Saint Basile. 2007. Genetic defects affecting lymphocyte cytotoxicity. *Curr Opin Immunol* 19:348-53.
91. Frankel, P., A. Aronheim, E. Kavanagh, M. S. Balda, K. Matter, T. D. Bunney, and C. J. Marshall. 2005. RalA interacts with ZONAB in a cell density-dependent manner and regulates its transcriptional activity. *Embo J* 24:54-62.
92. Franklin, R. A., A. Tordai, H. Patel, A. M. Gardner, G. L. Johnson, and E. W. Gelfand. 1994. Ligation of the T cell receptor complex results in activation of the Ras/Raf-1/MEK/MAPK cascade in human T lymphocytes. *J Clin Invest* 93:2134-40.
93. Frech, M., I. Schlichting, A. Wittinghofer, and P. Chardin. 1990. Guanine nucleotide binding properties of the mammalian RalA protein produced in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 265:6353-9.
94. Freiberg, B. A., H. Kupfer, W. Maslanik, J. Delli, J. Kappler, D. M. Zaller, and A. Kupfer. 2002. Staging and resetting T cell activation in SMACs. *Nat Immunol* 3:911-7.
95. Friedl, P., A. T. den Boer, and M. Gunzer. 2005. Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 5:532-45.
96. Friedrich, G. A., J. D. Hildebrand, and P. Soriano. 1997. The secretory protein Sec8 is required for paraxial mesoderm formation in the mouse. *Dev Biol* 192:364-74.
97. Froelich, C. J., K. Orth, J. Turbov, P. Seth, R. Gottlieb, B. Babior, G. M. Shah, R. C. Bleackley, V. M. Dixit, and W. Hanna. 1996. New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity. Target cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis. *J Biol Chem* 271:29073-9.
98. Fukui, S., H. T. Matern, J. R. Jagath, R. H. Scheller, and A. T. Brunger. 2003. Structural basis of the interaction between RalA and Sec5, a subunit of the sec6/8 complex. *Embo J* 22:3267-78.
99. Gasser, S., and D. H. Raullet. 2006. Activation and self-tolerance of natural killer cells. *Immunol Rev* 214:130-42.
100. Giet, R., and C. Prigent. 1999. Aurora/Ipl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases. *J Cell Sci* 112 ( Pt 21):3591-601.
101. Gillis, S., and J. Watson. 1980. Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. V. Identification of an interleukin 2-producing human leukemia T cell line. *J Exp Med* 152:1709-19.
102. Gismondi, A., L. Cifaldi, C. Mazza, S. Giliani, S. Parolini, S. Morrone, J. Jacobelli, E. Bandiera, L. Notarangelo, and A. Santoni. 2004. Impaired natural and CD16-mediated NK cell cytotoxicity in patients with WAS and XLT: ability of IL-2 to correct NK cell functional defect. *Blood* 104:436-43.
103. Gonzalez-Garcia, A., C. A. Pritchard, H. F. Paterson, G. Mavria, G. Stamp, and C. J. Marshall. 2005. RalGDS is required for tumor formation in a model of skin carcinogenesis. *Cancer Cell* 7:219-26.
104. Gottardi, C. J., M. Arpin, A. S. Fanning, and D. Louvard. 1996. The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10779-84.
105. Grindstaff, K. K., C. Yeaman, N. Anandasabapathy, S. C. Hsu, E. Rodriguez-Boulan, R. H. Scheller, and W. J. Nelson. 1998. Sec6/8 complex is recruited to cell-cell contacts and specifies transport vesicle delivery to the basal-lateral membrane in epithelial cells. *Cell*



- 93:731-40.
106. Gross, C. C., J. A. Brzostowski, D. Liu, and E. O. Long. Tethering of intercellular adhesion molecule on target cells is required for LFA-1-dependent NK cell adhesion and granule polarization. *J Immunol* 185:2918-26.
  107. Grosshans, B. L., A. Andreeva, A. Gangar, S. Niessen, J. R. Yates, 3rd, P. Brennwald, and P. Novick. 2006. The yeast Igl family member Sro7p is an effector of the secretory Rab GTPase Sec4p. *J Cell Biol* 172:55-66.
  108. Gu, C., S. G. Tangye, X. Sun, Y. Luo, Z. Lin, and J. Wu. 2006. The X-linked lymphoproliferative disease gene product SAP associates with PAK-interacting exchange factor and participates in T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:14447-52.
  109. Guo, W., D. Roth, C. Walch-Solimena, and P. Novick. 1999. The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis. *Embo J* 18:1071-80.
  110. Hamad, N. M., J. H. Elconin, A. E. Karnoub, W. Bai, J. N. Rich, R. T. Abraham, C. J. Der, and C. M. Counter. 2002. Distinct requirements for Ras oncogenesis in human versus mouse cells. *Genes Dev* 16:2045-57.
  111. Hao, Y., R. Wong, and L. A. Feig. 2008. RalGDS couples growth factor signaling to Akt activation. *Mol Cell Biol* 28:2851-9.
  112. Harwood, A. E., and J. C. Cambier. 1993. B cell antigen receptor cross-linking triggers rapid protein kinase C independent activation of p21ras1. *J Immunol* 151:4513-22.
  113. Henkart, M. P., and P. A. Henkart. 1982. Lymphocyte mediated cytolysis as a secretory phenomenon. *Adv Exp Med Biol* 146:227-47.
  114. Henry, D. O., S. A. Moskalenko, K. J. Kaur, M. Fu, R. G. Pestell, J. H. Camonis, and M. A. White. 2000. Ral GTPases contribute to regulation of cyclin D1 through activation of NF-kappaB. *Mol Cell Biol* 20:8084-92.
  115. Hirst, C. E., M. S. Buzzza, C. H. Bird, H. S. Warren, P. U. Cameron, M. Zhang, P. G. Ashton-Rickardt, and P. I. Bird. 2003. The intracellular granzyme B inhibitor, proteinase inhibitor 9, is up-regulated during accessory cell maturation and effector cell degranulation, and its overexpression enhances CTL potency. *J Immunol* 170:805-15.
  116. Hofer, F., R. Berdeaux, and G. S. Martin. 1998. Ras-independent activation of Ral by a Ca(2+)-dependent pathway. *Curr Biol* 8:839-42.
  117. Hofer, F., S. Fields, C. Schneider, and G. S. Martin. 1994. Activated Ras interacts with the Ral guanine nucleotide dissociation stimulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11089-93.
  118. Hogquist, K. A., S. C. Jameson, W. R. Heath, J. L. Howard, M. J. Bevan, and F. R. Carbone. 1994. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76:17-27.
  119. Huse, M., E. J. Quann, and M. M. Davis. 2008. Shouts, whispers and the kiss of death: directional secretion in T cells. *Nat Immunol* 9:1105-11.
  120. Hussain, R. F., A. M. Nouri, and R. T. Oliver. 1993. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. *J Immunol Methods* 160:89-96.
  121. Ikeda, M., O. Ishida, T. Hinoi, S. Kishida, and A. Kikuchi. 1998. Identification and characterization of a novel protein interacting with Ral-binding protein 1, a putative effector protein of Ral. *J Biol Chem* 273:814-21.
  122. Iritani, B. M., K. A. Forbush, M. A. Farrar, and R. M. Perlmutter. 1997. Control of B cell development by Ras-mediated activation of Raf. *Embo J* 16:7019-31.
  123. Jahn, R., and R. H. Scheller. 2006. SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:631-43.
  124. Jakovljevic, G., I. Kardum-Skelin, S.

- Rogosic, S. Culic, J. Stepan, A. Gagro, I. Skaric, L. Mikecin, A. Bonevski, I. Barisic, and M. Nakic. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis in a 6-week-old male infant. *Coll Antropol* 34:631-4.
125. Ji, H., F. Rintelen, C. Waltzinger, D. Bertschy Meier, A. Bilancio, W. Pearce, E. Hirsch, M. P. Wymann, T. Ruckle, M. Camps, B. Vanhaesebroeck, K. Okkenhaug, and C. Rommel. 2007. Inactivation of PI3Kgamma and PI3Kdelta distorts T-cell development and causes multiple organ inflammation. *Blood* 110:2940-7.
126. Jiang, H., J. Q. Luo, T. Urano, P. Frankel, Z. Lu, D. A. Foster, and L. A. Feig. 1995. Involvement of Ral GTPase in v-Src-induced phospholipase D activation. *Nature* 378:409-12.
127. Jimenez, M., I. Perez de Castro, M. Benet, J. F. Garcia, G. Inghirami, and A. Pellicer. 2004. The Rgr oncogene induces tumorigenesis in transgenic mice. *Cancer Res* 64:6041-9.
128. Jin, R., J. R. Junutula, H. T. Matern, K. E. Ervin, R. H. Scheller, and A. T. Brunger. 2005. Exo84 and Sec5 are competitive regulatory Sec6/8 effectors to the RalA GTPase. *Embo J* 24:2064-74.
129. Jordens, I., M. Fernandez-Borja, M. Marsman, S. Dusseljee, L. Janssen, J. Calafat, H. Janssen, R. Wubbolts, and J. Neefjes. 2001. The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Curr Biol* 11:1680-5.
130. Jullien-Flores, V., O. Dorseuil, F. Romero, F. Letourneur, S. Saragosti, R. Berger, A. Tavitian, G. Gacon, and J. H. Camonis. 1995. Bridging Ral GTPase to Rho pathways. RLIP76, a Ral effector with CDC42/Rac GTPase-activating protein activity. *J Biol Chem* 270:22473-7.
131. Jullien-Flores, V., Y. Mahe, G. Mirey, C. Leprince, B. Meunier-Bisceuil, A. Sorkin, and J. H. Camonis. 2000. RLIP76, an effector of the GTPase Ral, interacts with the AP2 complex: involvement of the Ral pathway in receptor endocytosis. *J Cell Sci* 113 ( Pt 16):2837-44.
132. Kanner, S. B., L. S. Grosmaire, J. A. Ledbetter, and N. K. Damle. 1993. Beta 2-integrin LFA-1 signaling through phospholipase C-gamma 1 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7099-103.
133. Kaplan, R., B. Morse, K. Huebner, C. Croce, R. Howk, M. Ravera, G. Ricca, M. Jaye, and J. Schlessinger. 1990. Cloning of three human tyrosine phosphatases reveals a multigene family of receptor-linked protein-tyrosine-phosphatases expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:7000-4.
134. Kataoka, T., M. Schroter, M. Hahne, P. Schneider, M. Irmeler, M. Thome, C. J. Froelich, and J. Tschopp. 1998. FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *J Immunol* 161:3936-42.
135. Kawato, M., R. Shirakawa, H. Kondo, T. Higashi, T. Ikeda, K. Okawa, S. Fukai, O. Nureki, T. Kita, and H. Horiuchi. 2008. Regulation of platelet dense granule secretion by the Ral GTPase-exocyst pathway. *J Biol Chem* 283:166-74.
136. Khurana, D., and P. J. Leibson. 2003. Regulation of lymphocyte-mediated killing by GTP-binding proteins. *J Leukoc Biol* 73:333-8.
137. Kikuchi, A., S. D. Demo, Z. H. Ye, Y. W. Chen, and L. T. Williams. 1994. ralGDS family members interact with the effector loop of ras p21. *Mol Cell Biol* 14:7483-91.
138. Kim, J. H., S. D. Lee, J. M. Han, T. G. Lee, Y. Kim, J. B. Park, J. D. Lambeth, P. G. Suh, and S. H. Ryu. 1998. Activation of phospholipase D1 by direct interaction with ADP-ribosylation factor 1 and RalA. *FEBS Lett* 430:231-5.
139. Kim, K., L. Wang, and I. Hwang. 2009. LFA-1-dependent Ca<sup>2+</sup> entry following suboptimal T cell receptor triggering proceeds without mobilization of intracellular Ca<sup>2+</sup>. *J Biol Chem*



- 284:22149-54
140. Kinsella, B. T., R. A. Erdman, and W. A. Maltese. 1991. Carboxyl-terminal isoprenylation of ras-related GTP-binding proteins encoded by *rac1*, *rac2*, and *ralA*. *J Biol Chem* 266:9786-94.
  141. Kishida, S., S. Koyama, K. Matsubara, M. Kishida, Y. Matsuura, and A. Kikuchi. 1997. Colocalization of Ras and Ral on the membrane is required for Ras-dependent Ral activation through Ral GDP dissociation stimulator. *Oncogene* 15:2899-907.
  142. Kohl, S., T. A. Springer, F. C. Schmalstieg, L. S. Loo, and D. C. Anderson. 1984. Defective natural killer cytotoxicity and polymorphonuclear leukocyte antibody-dependent cellular cytotoxicity in patients with LFA-1/OKM-1 deficiency. *J Immunol* 133:2972-8.
  143. Koretzky, G. A. 1997. The role of Grb2-associated proteins in T-cell activation. *Immunol Today* 18:401-6.
  144. Koretzky, G. A., J. Picus, T. Schultz, and A. Weiss. 1991. Tyrosine phosphatase CD45 is required for T-cell antigen receptor and CD2-mediated activation of a protein tyrosine kinase and interleukin 2 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:2037-41.
  145. Krangel, M. S. 2009. Mechanics of T cell receptor gene rearrangement. *Curr Opin Immunol* 21:133-9.
  146. Krensky, A. M., and C. Clayberger. 2009. Biology and clinical relevance of granulysin. *Tissue Antigens* 73:193-8.
  147. Krummel, M. F., M. D. Sjaastad, C. Wulfig, and M. M. Davis. 2000. Differential clustering of CD4 and CD3zeta during T cell recognition. *Science* 289:1349-52.
  148. Krzewski, K., X. Chen, and J. L. Strominger. 2008. WIP is essential for lytic granule polarization and NK cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:2568-73.
  149. Labno, C. M., C. M. Lewis, D. You, D. W. Leung, A. Takesono, N. Kamberos, A. Seth, L. D. Finkelstein, M. K. Rosen, P. L. Schwartzberg, and J. K. Burkhardt. 2003. Itk functions to control actin polymerization at the immune synapse through localized activation of Cdc42 and WASP. *Curr Biol* 13:1619-24.
  150. Ladedra, V., P. Frankel, L. A. Feig, D. A. Foster, E. Bal de Kier Joffe, and J. A. Aguirre-Ghiso. 2001. RalA mediates v-Src, v-Ras, and v-Raf regulation of CD44 and fibronectin expression in NIH3T3 fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 283:854-61.
  151. Lafont, V., F. Ottonnes, J. Liautard, and J. Favero. 1999. Evidence for a p21(ras)/Raf-1/MEK-1/ERK-2-independent pathway in stimulation of IL-2 gene transcription in human primary T lymphocytes. *J Biol Chem* 274:25743-8.
  152. Langevin, J., M. J. Morgan, J. B. Sibarita, S. Aresta, M. Murthy, T. Schwarz, J. Camonis, and Y. Bellaiche. 2005. Drosophila exocyst components Sec5, Sec6, and Sec15 regulate DE-Cadherin trafficking from recycling endosomes to the plasma membrane. *Dev Cell* 9:365-76.
  153. Latour, S., and A. Veillette. 2004. The SAP family of adaptors in immune regulation. *Semin Immunol* 16:409-19.
  154. Layer, K., G. Lin, A. Nencioni, W. Hu, A. Schmucker, A. N. Antov, X. Li, S. Takamatsu, T. Chevassut, N. A. Dower, S. L. Stang, D. Beier, J. Buhlmann, R. T. Bronson, K. B. Elkou, J. C. Stone, L. Van Parijs, and B. Lim. 2003. Autoimmunity as the consequence of a spontaneous mutation in *Rasgrp1*. *Immunity* 19:243-55.
  155. Lee, T., L. Feig, and D. J. Montell. 1996. Two distinct roles for Ras in a developmentally regulated cell migration. *Development* 122:409-18.
  156. Leonardi, P., E. Kassin, I. Hernandez-Munoz, R. Diaz, G. Inghirami, and A. Pellicer. 2002. Human *rgr*: transforming activity and alteration in T-cell malignancies. *Oncogene* 21:5108-16.

157. Li, H., H. Zhu, C. J. Xu, and J. Yuan. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94:491-501.
158. Lieberman, J. 2003. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 3:361-70.
159. Lim, K. H., A. T. Baines, J. J. Fiordalisi, M. Shipitsin, L. A. Feig, A. D. Cox, C. J. Der, and C. M. Counter. 2005. Activation of RalA is critical for Ras-induced tumorigenesis of human cells. *Cancer Cell* 7:533-45.
160. Lim, K. H., D. C. Brady, D. F. Kashatus, B. B. Ancrile, C. J. Der, A. D. Cox, and C. M. Counter. Aurora-A phosphorylates, activates, and relocalizes the small GTPase RalA. *Mol Cell Biol* 30:508-23.
161. Lim, K. H., K. O'Hayer, S. J. Adam, S. D. Kendall, P. M. Campbell, C. J. Der, and C. M. Counter. 2006. Divergent roles for RalA and RalB in malignant growth of human pancreatic carcinoma cells. *Curr Biol* 16:2385-94.
162. Lima, W. R., K. S. Parreira, O. Devuyst, A. Caplanusi, F. N'Kuli, B. Marien, P. Van Der Smissen, P. M. Alves, P. Verroust, E. I. Christensen, F. Terzi, K. Matter, M. S. Balda, C. E. Pierreux, and P. J. Courtoy. ZONAB promotes proliferation and represses differentiation of proximal tubule epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 21:478-88.
163. Lin, J., and A. Weiss. 2003. The tyrosine phosphatase CD148 is excluded from the immunologic synapse and down-regulates prolonged T cell signaling. *J Cell Biol* 162:673-82.
164. Liu, D., Y. T. Bryceson, T. Meckel, G. Vasiliver-Shamis, M. L. Dustin, and E. O. Long. 2009. Integrin-dependent organization and bidirectional vesicular traffic at cytotoxic immune synapses. *Immunity* 31:99-109.
165. Ljunggren, H. G., and K. Karre. 1990. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11:237-44.
166. Loo, L. S., L. A. Hwang, Y. M. Ong, H. S. Tay, C. C. Wang, and W. Hong. 2009. A role for endobrevin/VAMP8 in CTL lytic granule exocytosis. *Eur J Immunol* 39:3520-8.
167. Lopez-Barahona, M., X. R. Bustelo, and M. Barbacid. 1996. The TC21 oncoprotein interacts with the Ral guanosine nucleotide dissociation factor. *Oncogene* 12:463-70.
168. Lopez-Cabrera, M., E. Munoz, M. V. Blazquez, M. A. Ursa, A. G. Santis, and F. Sanchez-Madrid. 1995. Transcriptional regulation of the gene encoding the human C-type lectin leukocyte receptor AIM/CD69 and functional characterization of its tumor necrosis factor-alpha-responsive elements. *J Biol Chem* 270:21545-51.
169. Lovatt, M., A. Filby, V. Parravicini, G. Werlen, E. Palmer, and R. Zamoyska. 2006. Lck regulates the threshold of activation in primary T cells, while both Lck and Fyn contribute to the magnitude of the extracellular signal-related kinase response. *Mol Cell Biol* 26:8655-65.
170. Luo, J. Q., X. Liu, P. Frankel, T. Rotunda, M. Ramos, J. Flom, H. Jiang, L. A. Feig, A. J. Morris, R. A. Kahn, and D. A. Foster. 1998. Functional association between Arf and RalA in active phospholipase D complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3632-7.
171. M'Rabet, L., P. Coffier, F. Zwartkruis, B. Franke, A. W. Segal, L. Koenderman, and J. L. Bos. 1998. Activation of the small GTPase rap1 in human neutrophils. *Blood* 92:2133-40.
172. M'Rabet, L., P. J. Coffier, R. M. Wolthuis, F. Zwartkruis, L. Koenderman, and J. L. Bos. 1999. Differential fMet-Leu-Phe- and platelet-activating factor-induced signaling toward Ral activation in primary human neutrophils. *J Biol Chem* 274:21847-52.
173. Mace, E. M., S. J. Monkley, D. R. Critchley, and F. Takei. 2009. A dual role for talin in NK cell cytotoxicity: activation of LFA-1-mediated cell adhesion and polarization of NK cells. *J Immunol* 182:948-56.



174. Mantovani, A., and F. Balkwill. 2006. RalB signaling: a bridge between inflammation and cancer. *Cell* 127:42-4.
175. Mariani, E., M. C. Monaco, S. Sgobbi, J. F. de Zwart, A. R. Mariani, and A. Facchini. 1994. Standardization of a micro-cytotoxicity assay for human natural killer cell lytic activity. *J Immunol Methods* 172:173-8.
176. Mark, B. L., O. Jilkin, and R. P. Bhullar. 1996. Association of Ral GTP-binding protein with human platelet dense granules. *Biochem Biophys Res Commun* 225:40-6.
177. Matsubara, K., S. Kishida, Y. Matsuura, H. Kitayama, M. Noda, and A. Kikuchi. 1999. Plasma membrane recruitment of RalGDS is critical for Ras-dependent Ral activation. *Oncogene* 18:1303-12.
178. McCormick, F. 1993. Signal transduction. How receptors turn Ras on. *Nature* 363:15-6.
179. Menager, M. M., G. Menasche, M. Romao, P. Knapnougel, C. H. Ho, M. Garfa, G. Raposo, J. Feldmann, A. Fischer, and G. de Saint Basile. 2007. Secretory cytotoxic granule maturation and exocytosis require the effector protein hMunc13-4. *Nat Immunol* 8:257-67.
180. Metkar, S. S., B. Wang, M. Aguilar-Santelises, S. M. Raja, L. Uhlin-Hansen, E. Podack, J. A. Trapani, and C. J. Froelich. 2002. Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity* 16:417-28.
181. Mizushima, S., and S. Nagata. 1990. pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res* 18:5322.
182. Monks, C. R., B. A. Freiberg, H. Kupfer, N. Sciaky, and A. Kupfer. 1998. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395:82-6.
183. Mor, A., G. Campi, G. Du, Y. Zheng, D. A. Foster, M. L. Dustin, and M. R. Philips. 2007. The lymphocyte function-associated antigen-1 receptor costimulates plasma membrane Ras via phospholipase D2. *Nat Cell Biol* 9:713-9.
184. Mor, A., M. L. Dustin, and M. R. Philips. 2007. Small GTPases and LFA-1 reciprocally modulate adhesion and signaling. *Immunol Rev* 218:114-25.
185. Mor, A., M. R. Philips, and M. H. Pillinger. 2007. The role of Ras signaling in lupus T lymphocytes: biology and pathogenesis. *Clin Immunol* 125:215-23.
186. Moretta, A., C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, C. Cantoni, M. C. Mingari, R. Biassoni, and L. Moretta. 2001. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 19:197-223.
187. Moskalenko, S., D. O. Henry, C. Rosse, G. Mirey, J. H. Camonis, and M. A. White. 2002. The exocyst is a Ral effector complex. *Nat Cell Biol* 4:66-72.
188. Moskalenko, S., C. Tong, C. Rosse, G. Mirey, E. Formstecher, L. Daviet, J. Camonis, and M. A. White. 2003. Ral GTPases regulate exocyst assembly through dual subunit interactions. *J Biol Chem* 278:51743-8.
189. Motyka, B., G. Korbitt, M. J. Pinkoski, J. A. Heibin, A. Caputo, M. Hobman, M. Barry, I. Shostak, T. Sawchuk, C. F. Holmes, J. Gaudie, and R. C. Bleackley. 2000. Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* 103:491-500.
190. Murphy, W. J., V. Kumar, and M. Bennett. 1987. Rejection of bone marrow allografts by mice with severe combined immune deficiency (SCID). Evidence that natural killer cells can mediate the specificity of marrow graft rejection. *J Exp Med* 165:1212-7.
191. Nagaoka, H., Y. Takahashi, R. Hayashi, T. Nakamura, K. Ishii, J. Matsuda, A. Ogura, Y. Shirakata, H. Karasuyama, T. Sudo, S. Nishikawa, T. Tsubata, T. Mizuochi,

- T. Asano, H. Sakano, and T. Takemori. 2000. Ras mediates effector pathways responsible for pre-B cell survival, which is essential for the developmental progression to the late pre-B cell stage. *J Exp Med* 192:171-82.
192. Nakajima, H., H. L. Park, and P. A. Henkart. 1995. Synergistic roles of granzymes A and B in mediating target cell death by rat basophilic leukemia mast cell tumors also expressing cytolysin/perforin. *J Exp Med* 181:1037-46.
193. Nakashima, S., K. Morinaka, S. Koyama, M. Ikeda, M. Kishida, K. Okawa, A. Iwamatsu, S. Kishida, and A. Kikuchi. 1999. Small G protein Ral and its downstream molecules regulate endocytosis of EGF and insulin receptors. *Embo J* 18:3629-42.
194. Nichols, K. E., C. S. Ma, J. L. Cannons, P. L. Schwartzberg, and S. G. Tangye. 2005. Molecular and cellular pathogenesis of X-linked lymphoproliferative disease. *Immunol Rev* 203:180-99.
195. Nociari, M. M., A. Shalev, P. Benias, and C. Russo. 1998. A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* 213:157-67.
196. Novick, P., and W. Guo. 2002. Ras family therapy: Rab, Rho and Ral talk to the exocyst. *Trends Cell Biol* 12:247-9.
197. Oettinger, M. A., D. G. Schatz, C. Gorka, and D. Baltimore. 1990. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248:1517-23.
198. Ohta, Y., N. Suzuki, S. Nakamura, J. H. Hartwig, and T. P. Stossel. 1999. The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2122-8.
199. Okkenhaug, K., A. Bilancio, J. L. Emery, and B. Vanhaesebroeck. 2004. Phosphoinositide 3-kinase in T cell activation and survival. *Biochem Soc Trans* 32:332-5.
200. Orange, J. S., K. E. Harris, M. M. Andzelm, M. M. Valter, R. S. Geha, and J. L. Strominger. 2003. The mature activating natural killer cell immunologic synapse is formed in distinct stages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14151-6.
201. Orange, J. S., N. Ramesh, E. Remold-O'Donnell, Y. Sasahara, L. Koopman, M. Byrne, F. A. Bonilla, F. S. Rosen, R. S. Geha, and J. L. Strominger. 2002. Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for NK cell cytotoxicity and colocalizes with actin to NK cell-activating immunologic synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11351-6.
202. Osman, M. A., and R. A. Cerione. 1998. Iqg1p, a yeast homologue of the mammalian IQGAPs, mediates cdc42p effects on the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 142:443-55.
203. Osman, M. A., J. B. Konopka, and R. A. Cerione. 2002. Iqg1p links spatial and secretion landmarks to polarity and cytokinesis. *J Cell Biol* 159:601-11.
204. Oxford, G., C. R. Owens, B. J. Titus, T. L. Foreman, M. C. Herlevsen, S. C. Smith, and D. Theodorescu. 2005. RalA and RalB: antagonistic relatives in cancer cell migration. *Cancer Res* 65:7111-20.
205. Pages, G., S. Guerin, D. Grall, F. Bonino, A. Smith, F. Anjuere, P. Auburger, and J. Pouyssegur. 1999. Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* 286:1374-7.
206. Palmer, R. E., S. B. Lee, J. C. Wong, P. A. Reynolds, H. Zhang, V. Truong, J. D. Oliner, W. L. Gerald, and D. A. Haber. 2002. Induction of BAIAP3 by the EWS-WT1 chimeric fusion implicates regulated exocytosis in tumorigenesis. *Cancer Cell* 2:497-505.
207. Pan, G., K. O'Rourke, A. M. Chinnaiyan, R. Gentz, R. Ebner, J. Ni, and V. M. Dixit. 1997. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276:111-3.
208. Park, S. H., and R. A. Weinberg. 1995. A putative effector of Ral has homology to Rho/Rac GTPase activating proteins. *Oncogene* 11:2349-55.



209. Perez de Castro, I., T. G. Bivona, M. R. Philips, and A. Pellicer. 2004. Ras activation in Jurkat T cells following low-grade stimulation of the T-cell receptor is specific to N-Ras and occurs only on the Golgi apparatus. *Mol Cell Biol* 24:3485-96.
210. Persson, T., J. Calafat, H. Janssen, M. Karawajczyk, S. R. Carlsson, and A. Egesten. 2002. Specific granules of human eosinophils have lysosomal characteristics: presence of lysosome-associated membrane proteins and acidification upon cellular activation. *Biochem Biophys Res Commun* 291:844-54.
211. Peter, M., J. Nakagawa, M. Doree, J. C. Labbe, and E. A. Nigg. 1990. In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* 61:591-602.
212. Peters, P. J., J. Borst, V. Oorschot, M. Fukuda, O. Krahenbuhl, J. Tschopp, J. W. Slot, and H. J. Geuze. 1991. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med* 173:1099-109.
213. Peterson, S. N., L. Trabalzini, T. R. Brtva, T. Fischer, D. L. Altschuler, P. Martelli, E. G. Lapetina, C. J. Der, and G. C. White, 2nd. 1996. Identification of a novel RalGDS-related protein as a candidate effector for Ras and Rap1. *J Biol Chem* 271:29903-8.
214. Post, G. R., C. Swiderski, B. A. Waldrop, L. Salty, C. C. Glembotski, R. M. Wolthuis, and N. Mochizuki. 2002. Guanine nucleotide exchange factor-like factor (Rlf) induces gene expression and potentiates alpha 1-adrenergic receptor-induced transcriptional responses in neonatal rat ventricular myocytes. *J Biol Chem* 277:15286-92.
215. Prasad, A., J. Zikherman, J. Das, J. P. Roose, A. Weiss, and A. K. Chakraborty. 2009. Origin of the sharp boundary that discriminates positive and negative selection of thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:528-33.
216. Purbhoo, M. A., D. J. Irvine, J. B. Huppa, and M. M. Davis. 2004. T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse. *Nat Immunol* 5:524-30.
217. Quann, E. J., E. Merino, T. Furuta, and M. Huse. 2009. Localized diacylglycerol drives the polarization of the microtubule-organizing center in T cells. *Nat Immunol* 10:627-35.
218. Raaijmakers, J. H., and J. L. Bos. 2009. Specificity in Ras and Rap signaling. *J Biol Chem* 284:10995-9.
219. Radhakrishna, H., O. Al-Awar, Z. Khachikian, and J. G. Donaldson. 1999. ARF6 requirement for Rac ruffling suggests a role for membrane trafficking in cortical actin rearrangements. *J Cell Sci* 112 ( Pt 6):855-66.
220. Rangarajan, A., S. J. Hong, A. Gifford, and R. A. Weinberg. 2004. Species- and cell type-specific requirements for cellular transformation. *Cancer Cell* 6:171-83.
221. Rebhun, J. F., H. Chen, and L. A. Quilliam. 2000. Identification and characterization of a new family of guanine nucleotide exchange factors for the ras-related GTPase Ral. *J Biol Chem* 275:13406-10.
222. Richie, L. I., P. J. Ebert, L. C. Wu, M. F. Krummel, J. J. Owen, and M. M. Davis. 2002. Imaging synapse formation during thymocyte selection: inability of CD3zeta to form a stable central accumulation during negative selection. *Immunity* 16:595-606.
223. Rittmeyer, E. N., S. Daniel, S. C. Hsu, and M. A. Osman. 2008. A dual role for IQGAP1 in regulating exocytosis. *J Cell Sci* 121:391-403.
224. Robey, E., and B. J. Fowlkes. 1994. Selective events in T cell development. *Annu Rev Immunol* 12:675-705.
225. Rondaij, M. G., R. Bierings, E. L. van Agtmaal, K. A. Gijzen, E. Sellink, A. Kragt, S. S. Ferguson, K. Mertens, M. J. Hannah, J. A. van Mourik, M. Fernandez-Borja, and J. Voorberg. 2008. Guanine

- exchange factor RalGDS mediates exocytosis of Weibel-Palade bodies from endothelial cells. *Blood* 112:56-63.
226. Roose, J. P., M. Mollenauer, V. A. Gupta, J. Stone, and A. Weiss. 2005. A diacylglycerol-protein kinase C-RasGRP1 pathway directs Ras activation upon antigen receptor stimulation of T cells. *Mol Cell Biol* 25:4426-41.
227. Roose, J. P., M. Mollenauer, M. Ho, T. Kurosaki, and A. Weiss. 2007. Unusual interplay of two types of Ras activators, RasGRP and SOS, establishes sensitive and robust Ras activation in lymphocytes. *Mol Cell Biol* 27:2732-45.
228. Rosario, M., H. F. Paterson, and C. J. Marshall. 2001. Activation of the Ral and phosphatidylinositol 3' kinase signaling pathways by the ras-related protein TC21. *Mol Cell Biol* 21:3750-62.
229. Rosse, C., A. Hatzoglou, M. C. Parrini, M. A. White, P. Chavrier, and J. Camonis. 2006. RalB mobilizes the exocyst to drive cell migration. *Mol Cell Biol* 26:727-34.
230. Rubio, I., S. Grund, S. P. Song, C. Biskup, S. Bandemer, M. Fricke, M. Forster, A. Graziani, U. Wittig, and S. Kliche. TCR-induced activation of Ras proceeds at the plasma membrane and requires palmitoylation of N-Ras. *J Immunol* 185:3536-43.
231. Rudd, C. E. 1999. Adaptors and molecular scaffolds in immune cell signaling. *Cell* 96:5-8.
232. Rudge, S. A., and M. J. Wakelam. 2009. Inter-regulatory dynamics of phospholipase D and the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 1791:856-61.
233. Sablina, A. A., W. Chen, J. D. Arroyo, L. Corral, M. Hector, S. E. Bulmer, J. A. DeCaprio, and W. C. Hahn. 2007. The tumor suppressor PP2A Abeta regulates the RalA GTPase. *Cell* 129:969-82.
234. Sawamoto, K., P. Winge, S. Koyama, Y. Hirota, C. Yamada, S. Miyao, S. Yoshikawa, M. H. Jin, A. Kikuchi, and H. Okano. 1999. The *Drosophila* Ral GTPase regulates developmental cell shape changes through the Jun NH(2)-terminal kinase pathway. *J Cell Biol* 146:361-72.
235. Schatz, D. G., M. A. Oettinger, and D. Baltimore. 1989. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* 59:1035-48.
236. Senga, T., T. Iwamoto, T. Kitamura, Y. Miyake, and M. Hamaguchi. 2001. JAK/STAT3-dependent activation of the RalGDS/Ral pathway in M1 mouse myeloid leukemia cells. *J Biol Chem* 276:32678-81.
237. Shao, H., and D. A. Andres. 2000. A novel RalGEF-like protein, RGL3, as a candidate effector for rit and Ras. *J Biol Chem* 275:26914-24.
238. Shinkai, Y., K. Takio, and K. Okumura. 1988. Homology of perforin to the ninth component of complement (C9). *Nature* 334:525-7.
239. Shipitsin, M., and L. A. Feig. 2004. RalA but not RalB enhances polarized delivery of membrane proteins to the basolateral surface of epithelial cells. *Mol Cell Biol* 24:5746-56.
240. Shirakawa, R., S. Fukai, M. Kawato, T. Higashi, H. Kondo, T. Ikeda, E. Nakayama, K. Okawa, O. Nureki, T. Kimura, T. Kita, and H. Horiuchi. 2009. Tuberous sclerosis tumor suppressor complex-like complexes act as GTPase-activating proteins for Ral GTPases. *J Biol Chem* 284:21580-8.
241. Shirakawa, R., T. Higashi, A. Tabuchi, A. Yoshioka, H. Nishioka, M. Fukuda, T. Kita, and H. Horiuchi. 2004. Munc13-4 is a GTP-Rab27-binding protein regulating dense core granule secretion in platelets. *J Biol Chem* 279:10730-7.
242. Singer, A., S. Adoro, and J. H. Park. 2008. Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nat Rev Immunol* 8:788-801.
243. Singhal, S. S., A. Sehwat, M. Sahu, P. Singhal, R. Vatsyayan, P. C. Rao Lelsani, S. Yadav, and S. Awasthi. Rlip76 transports



- sunitinib and sorafenib and mediates drug resistance in kidney cancer. *Int J Cancer* 126:1327-38.
244. Smyth, M. J., E. Cretney, J. M. Kelly, J. A. Westwood, S. E. Street, H. Yagita, K. Takeda, S. L. van Dommelen, M. A. Degli-Esposti, and Y. Hayakawa. 2005. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 42:501-10.
245. Spaargaren, M., and J. R. Bischoff. 1994. Identification of the guanine nucleotide dissociation stimulator for Ral as a putative effector molecule of R-ras, H-ras, K-ras, and Rap. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12609-13.
246. Stenoien, D. L., S. Sen, M. A. Mancini, and B. R. Brinkley. 2003. Dynamic association of a tumor amplified kinase, Aurora-A, with the centrosome and mitotic spindle. *Cell Motil Cytoskeleton* 55:134-46.
247. Stinchcombe, J. C., G. Bossi, S. Booth, and G. M. Griffiths. 2001. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* 15:751-61.
248. Stinchcombe, J. C., and G. M. Griffiths. 2007. Secretory mechanisms in cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23:495-517.
249. Stinchcombe, J. C., E. Majorovits, G. Bossi, S. Fuller, and G. M. Griffiths. 2006. Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature* 443:462-5.
250. Stowers, L., D. Yelon, L. J. Berg, and J. Chant. 1995. Regulation of the polarization of T cells toward antigen-presenting cells by Ras-related GTPase CDC42. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:5027-31.
251. Sugihara, K., S. Asano, K. Tanaka, A. Iwamatsu, K. Okawa, and Y. Ohta. 2002. The exocyst complex binds the small GTPase RalA to mediate filopodia formation. *Nat Cell Biol* 4:73-8.
252. Suzuki, J., Y. Yamazaki, G. Li, Y. Kaziro, and H. Koide. 2000. Involvement of Ras and Ral in chemotactic migration of skeletal myoblasts. *Mol Cell Biol* 20:4658-65.
253. Swan, K. A., J. Alberola-Ila, J. A. Gross, M. W. Appleby, K. A. Forbush, J. F. Thomas, and R. M. Perlmutter. 1995. Involvement of p21ras distinguishes positive and negative selection in thymocytes. *Embo J* 14:276-85.
254. Takai, Y., T. Sasaki, and T. Matozaki. 2001. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81:153-208.
255. Takaya, A., T. Kamio, M. Masuda, N. Mochizuki, H. Sawa, M. Sato, K. Nagashima, A. Mizutani, A. Matsuno, E. Kiyokawa, and M. Matsuda. 2007. R-Ras regulates exocytosis by Rgl2/Rlf-mediated activation of RalA on endosomes. *Mol Biol Cell* 18:1850-60.
256. Takaya, A., Y. Ohba, K. Kurokawa, and M. Matsuda. 2004. RalA activation at nascent lamellipodia of epidermal growth factor-stimulated Cos7 cells and migrating Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* 15:2549-57.
257. Tavano, R., R. L. Contento, S. J. Baranda, M. Soligo, L. Tuosto, S. Manes, and A. Viola. 2006. CD28 interaction with filamin-A controls lipid raft accumulation at the T-cell immunological synapse. *Nat Cell Biol* 8:1270-6.
258. TerBush, D. R., T. Maurice, D. Roth, and P. Novick. 1996. The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 15:6483-94.
259. TerBush, D. R., and P. Novick. 1995. Sec6, Sec8, and Sec15 are components of a multisubunit complex which localizes to small bud tips in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 130:299-312.
260. Tian, X., G. Rusanescu, W. Hou, B. Schaffhausen, and L. A. Feig. 2002. PDK1 mediates growth factor-induced Ral-GEF activation by a kinase-independent mechanism. *Embo J* 21:1327-38.
261. Topham, N. J., and E. W. Hewitt. 2009. Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? *Immunology* 128:7-

- 15.
262. Trambas, C. M., and G. M. Griffiths. 2003. Delivering the kiss of death. *Nat Immunol* 4:399-403.
263. Trinchieri, G. 1989. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 47:187-376.
264. Tseng, Y. S., J. C. Lee, C. Y. Huang, and H. S. Liu. 2009. Aurora-A overexpression enhances cell-aggregation of Ha-ras transformants through the MEK/ERK signaling pathway. *BMC Cancer* 9:435.
265. Tskvitaria-Fuller, I., A. Seth, N. Mistry, H. Gu, M. K. Rosen, and C. Wulfing. 2006. Specific patterns of Cdc42 activity are related to distinct elements of T cell polarization. *J Immunol* 177:1708-20.
266. Urano, T., R. Emkey, and L. A. Feig. 1996. Ral-GTPases mediate a distinct downstream signaling pathway from Ras that facilitates cellular transformation. *Embo J* 15:810-6.
267. van Dam, E. M., and P. J. Robinson. 2006. Ral: mediator of membrane trafficking. *Int J Biochem Cell Biol* 38:1841-7.
268. Vitale, N., J. Mawet, J. Camonis, R. Regazzi, M. F. Bader, and S. Chasserot-Golaz. 2005. The Small GTPase RalA controls exocytosis of large dense core secretory granules by interacting with ARF6-dependent phospholipase D1. *J Biol Chem* 280:29921-8.
269. Walczak, H., M. A. Degli-Esposti, R. S. Johnson, P. J. Smolak, J. Y. Waugh, N. Boiani, M. S. Timour, M. J. Gerhart, K. A. Schooley, C. A. Smith, R. G. Goodwin, and C. T. Rauch. 1997. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *Embo J* 16:5386-97.
270. Wallin, R. P., V. Screpanti, J. Michaelsson, A. Grandien, and H. G. Ljunggren. 2003. Regulation of perforin-independent NK cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol* 33:2727-35.
271. Wang, H., C. Owens, N. Chandra, M. R. Conaway, D. L. Brautigan, and D. Theodorescu. Phosphorylation of RalB Is Important for Bladder Cancer Cell Growth and Metastasis. *Cancer Res.*
272. Wang, H., B. Wei, G. Bismuth, and C. E. Rudd. 2009. SLP-76-ADAP adaptor module regulates LFA-1 mediated costimulation and T cell motility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:12436-41.
273. Wang, K. L., and B. D. Roufogalis. 1999. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin stimulates GTP binding to the ras-related protein ral-A. *J Biol Chem* 274:14525-8.
274. Wang, L., G. Li, and S. Sugita. 2004. RalA-exocyst interaction mediates GTP-dependent exocytosis. *J Biol Chem* 279:19875-81.
275. Wang, X., Y. X. Zhou, W. Qiao, Y. Tominaga, M. Ouchi, T. Ouchi, and C. X. Deng. 2006. Overexpression of aurora kinase A in mouse mammary epithelium induces genetic instability preceding mammary tumor formation. *Oncogene* 25:7148-58.
276. Wange, R. L., and L. E. Samelson. 1996. Complex complexes: signaling at the TCR. *Immunity* 5:197-205.
277. Ward, S. G. 1996. CD28: a signalling perspective. *Biochem J* 318 ( Pt 2):361-77.
278. Watanabe, T., J. Noritake, and K. Kaibuchi. 2005. Roles of IQGAP1 in cell polarization and migration. *Novartis Found Symp* 269:92-101; discussion 101-5, 223-30.
279. Webster, R. L., and R. P. Johnson. 2005. Delineation of multiple subpopulations of natural killer cells in rhesus macaques. *Immunology* 115:206-14.
280. Wenham, M., S. Grieve, M. Cummins, M. L. Jones, S. Booth, R. Kilner, P. J. Ancliff, G. M. Griffiths, and A. D. Mumford. Two patients with Hermansky Pudlak syndrome type 2 and novel mutations in AP3B1. *Haematologica* 95:333-7.
281. Werlen, G., B. Hausmann, and E. Palmer. 2000. A motif in the alphabeta T-cell receptor controls positive selection by modulating ERK activity. *Nature* 406:422-6.
282. Wiley, S. R., K. Schooley, P. J. Smolak, W. S. Din, C. P. Huang, J. K. Nicholl, G.



- R. Sutherland, T. D. Smith, C. Rauch, C. A. Smith, and et al. 1995. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3:673-82.
283. Wolthuis, R. M., B. Bauer, L. J. van 't Veer, A. M. de Vries-Smits, R. H. Cool, M. Spaargaren, A. Wittinghofer, B. M. Burgering, and J. L. Bos. 1996. RalGDS-like factor (Rlf) is a novel Ras and Rap 1A-associating protein. *Oncogene* 13:353-62.
284. Wolthuis, R. M., and J. L. Bos. 1999. Ras caught in another affair: the exchange factors for Ral. *Curr Opin Genet Dev* 9:112-7.
285. Wolthuis, R. M., N. D. de Ruiter, R. H. Cool, and J. L. Bos. 1997. Stimulation of gene induction and cell growth by the Ras effector Rlf. *Embo J* 16:6748-61.
286. Wolthuis, R. M., B. Franke, M. van Triest, B. Bauer, R. H. Cool, J. H. Camonis, J. W. Akkerman, and J. L. Bos. 1998. Activation of the small GTPase Ral in platelets. *Mol Cell Biol* 18:2486-91.
287. Wolthuis, R. M., F. Zwartkruis, T. C. Moen, and J. L. Bos. 1998. Ras-dependent activation of the small GTPase Ral. *Curr Biol* 8:471-4.
288. Wu, C., C. Orozco, J. Boyer, M. Leglise, J. Goodale, S. Batalov, C. L. Hodge, J. Haase, J. Janes, J. W. Huss, 3rd, and A. I. Su. 2009. BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. *Genome Biol* 10:R130.
289. Wu, H., G. Rossi, and P. Brennwald. 2008. The ghost in the machine: small GTPases as spatial regulators of exocytosis. *Trends Cell Biol* 18:397-404.
290. Wu, J. C., T. Y. Chen, C. T. Yu, S. J. Tsai, J. M. Hsu, M. J. Tang, C. K. Chou, W. J. Lin, C. J. Yuan, and C. Y. Huang. 2005. Identification of V23RalA-Ser194 as a critical mediator for Aurora-A-induced cellular motility and transformation by small pool expression screening. *J Biol Chem* 280:9013-22.
291. Wu, S., S. Q. Mehta, F. Pichaud, H. J. Bellen, and F. A. Quijcho. 2005. Sec15 interacts with Rab11 via a novel domain and affects Rab11 localization in vivo. *Nat Struct Mol Biol* 12:879-85.
292. Yamaguchi, A., T. Urano, T. Goi, and L. A. Feig. 1997. An Eps homology (EH) domain protein that binds to the Ral-GTPase target, RalBP1. *J Biol Chem* 272:31230-4.
293. Yamauchi, J., J. R. Chan, and E. M. Shooter. 2003. Neurotrophin 3 activation of TrkC induces Schwann cell migration through the c-Jun N-terminal kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14421-6.
294. Yoshizaki, H., N. Mochizuki, Y. Gotoh, and M. Matsuda. 2007. Akt-PDK1 complex mediates epidermal growth factor-induced membrane protrusion through Ral activation. *Mol Biol Cell* 18:119-28.
295. Zhang, X. M., S. Ellis, A. Sriratana, C. A. Mitchell, and T. Rowe. 2004. Sec15 is an effector for the Rab11 GTPase in mammalian cells. *J Biol Chem* 279:43027-34.
296. Zhang, Z. X., L. Yang, K. J. Young, B. DuTemple, and L. Zhang. 2000. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med* 6:782-9.
297. Zhou, H., J. Kuang, L. Zhong, W. L. Kuo, J. W. Gray, A. Sahin, B. R. Brinkley, and S. Sen. 1998. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet* 20:189-93.
298. Zur Stadt, U., K. Beutel, S. Kolberg, R. Schneppenheim, H. Kabisch, G. Janka, and H. C. Hennies. 2006. Mutation spectrum in children with primary hemophagocytic lymphohistiocytosis: molecular and functional analyses of PRF1, UNC13D, STX11, and RAB27A. *Hum Mutat* 27:62-8.





## Ral GTPases regulate cell-mediated cytotoxicity in natural killer cells<sup>1</sup>

(en revisión)

Jesús Sánchez-Ruiz, Raquel Mejías, Domingo F. Barber and Ana González-García\*

Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología/CSIC, Darwin 3, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid, Spain

\*Corresponding author: Tel: +34 91 585-4664, Fax: + 34 91 372-0493, e-mail: [aglez@cnb.csic.es](mailto:aglez@cnb.csic.es)

Running title: Ral function in lytic granule-mediated cytotoxicity

### Abstract

Natural killer (NK) cells are key components of the immune response to virally-infected and tumor cells. Recognition of target cells initiates a series of events in NK cells that culminates in target destruction *via* directed secretion of lytic granules. Ral proteins are members of the Ras superfamily of small GTPases; they regulate vesicular trafficking and polarized granule secretion in several cell types. Here we address the role of Ral GTPases in cell-mediated cytotoxicity. Using a human NK cell line, we show that both Ral isoforms, RalA and RalB, are activated rapidly after target cell recognition. Furthermore, silencing of RalA and RalB impaired NK cell cytotoxicity. RalA regulated granule polarization towards the immunological synapse and the subsequent process of degranulation, whereas RalB regulated degranulation, but not polarization of lytic granules. Analysis of the molecular mechanism indicated that Ral activation in NK cells leads to assembly of the exocyst, a protein complex involved in polarized secretion. This assembly is required for degranulation, as interference with expression of the exocyst component Sec5 led to reduced degranulation and impaired cytotoxicity in NK cells. Our results thus identify a role for Ral in cell-mediated cytotoxicity, implicating these GTPases in lymphocyte function.

## **Introduction**

Cytotoxic lymphocytes (CTL) and natural killer cells (NK) are essential for the elimination of tumor and virally infected cells. In CTL and NK cells, recognition of target cells triggers several signaling cascades that culminate in the formation of the immunological synapse. The synapse allows directional secretion of lytic granules to the target cell membrane. These granules contain perforin, granzyme and other hydrolytic enzymes able to induce apoptosis in target cells. Cell-mediated cytotoxicity proceeds through several precisely regulated steps; target recognition is followed by extensive reorganization of the actin cytoskeleton and formation of a stable conjugate between the cytotoxic and the target cell. Shortly after conjugate formation, the secretory machinery is polarized. The microtubule-organizing center (MTOC), normally located near the nuclear membrane, moves towards the contact zone between the two cells. The lytic granules then move along the microtubules towards the synapse, when they reach the plasma membrane at the secretion site, the granules dock and fuse to the membrane, releasing their enzymatic content (1). Several molecules such as Rab27, Munc13-4 and syntaxin 11 are implicated in granule docking and fusion (2-4), but the molecular mechanisms that regulate granule secretion are not yet fully understood.

The Ral GTPases belong to the Ras superfamily of small GTPases. Mammals have two Ral genes, *RalA* and *RalB*, that encode ubiquitous proteins with 85% sequence identity (5). Ral proteins mediate some Ras functions in the cell, since certain Ral guanine exchange factors (GEF) that promote Ral activation can interact directly with active Ras. Ral GTPases regulate gene transcription, vesicular trafficking, migration and cytokinesis, and contribute to tumor development. To date, three Ral effectors have been identified: RalBP1 (6), the exocyst complex (7, 8), and the ZonaB transcription factor (9). Both RalA and RalB also bind constitutively to phospholipase D1 and phospholipase C- $\delta$ 1 and are needed for their activation (10-12).

The exocyst is a protein complex involved in tethering post-Golgi secretory vesicles to specific plasma membrane domains. It is composed of eight evolutionarily conserved subunits, Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 and Exo84 (13). The exocyst is involved in establishing epithelial polarity, membrane delivery, polarized growth and polarized secretion (14). Exocyst complex function is regulated by several small GTPases including Ral and members of the Rab and Rho families. Active RalA and RalB interact directly with the exocyst subunits Exo84 and Sec5 (7, 8, 15), although RalB



binds to these proteins less efficiently than RalA (16). Ral GTPases regulate exocyst assembly, and disruption of Ral interaction with the exocyst alters protein targeting to the basolateral membrane in polarized epithelial cells (7). The exocyst also mediates Ral functions such as cell transformation, cytokinesis and cell migration. As Ral GTPases participate in polarized secretion, we studied Ral function in the regulation of NK cytotoxicity and analyzed their effect on granule polarization and degranulation through exocyst assembly.

## Materials and Methods

### Cells and reagents

The human NK-like YTS tumor cell line and the HLA class I-negative 721.221 B lymphoblastoid cell line were cultured in RPMI medium with 10% FBS. The *Drosophila* cell line SC2 B7.1/ICAM1 was maintained in Schneider medium containing 2 mM L-glutamine and 10% FBS. Expression of transfected ligands in SC2 cells was induced by 24 h incubation with 1 mM CuSO<sub>4</sub>.

The following antibodies were used: anti-RalA (BD Biosciences), -RalB (Upstate), -perforin (Kamiya Biomedical), - $\alpha$ -tubulin (DM1A; Calbiochem), -Sec5 (Proteintech), -Sec8 (BD Biosciences), -Sec10 (AbCam) and -CD107a (BD Pharmingen).

### siRNA and shRNA

The following synthetic siRNAs were used (Dharmacon): RalA (5'-GACAGGUUUCUGUAG AAGAdTdT-3'), RalB (5'-GGUGAUCAUGGUUGGCAGCdTdT-3') and Sec5 (5'-GGUCGGA AAGACAAGGCAGAUdTdT-3'). siRNA was transfected in YTS cells using the Amaxa Nucleofector System.

shRNA lentiviral plasmids (pLKO.1-puro, Sigma Aldrich) were stably infected in YTS cells to downregulate RalA and RalB expression; we used the sequences RalA1 (CCGGCGAGCTAATG TTGACAAGGTACTCGAGTACCTTGTC AACATTAGCTCGTTTTT), RalA2 (CCGGCGATG AGTTTGTGGAGGACTACTCGAGTAGTCCTCCACAAACTCATCGTTTTT), RalB1 (CCGG CAAGGTGTTCTTTGACCTAATCTCGAGATTAGGTCAAAGAACACCTTGTTTTTG) and RalB2 (CCGGCCTTTACAGCAACTGCCGAATCTCGAGATTCGGCAGTTGCTGTAAAGG TTTTTG).

### Generation of mCTL and cell activation

OVA-specific CTL were generated by coincubating OTI mouse splenocytes (17) with mitomycin-

treated splenocytes (1 mg/ml, 90 min) preloaded with OT-I peptide (SIINFEKL). After 24 h, IL-2 (100 IU/ml) was added and cells allowed to differentiate for 6 days. All animal experiments were performed in accordance with national and EU guidelines, with the approval of the Centro Nacional de Biotecnología Animal Ethics Committee.

Before cell activation, OTI mCTL and YTS cells were starved (2 h) in RPMI containing 0.1% low endotoxin BSA (Sigma). YTS cells were activated by cocubation with SC2 B7.1/ICAM target cells at a 1:1 ratio for various times at 37°C. To activate mCTL, cells were incubated with anti-CD3 (1 µg/ml, 20 min, 4°C), washed, and incubated with anti-Armenian and Syrian hamster IgG (1 µg/ml; BD Pharmingen) (times indicated, 37°C). After activation, cells were washed with cold PBS and lysed as described below.

#### **Ral pulldown experiments and immunoprecipitation**

Cells were lysed (30 min) in PBS with 1% Triton-X 100, 5 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM PMSF, and 1 mg/ml each aprotinin and leupeptin. Lysates containing 500 µg protein were incubated with GST-RalBP1 RBD-conjugated glutathione-Sepharose beads (18) (1 h). Beads were washed once with lysis buffer and twice with 25 mM Tris (pH 7.2), boiled, and samples analyzed by Western blot using anti-RalA or -RalB antibodies.

For immunoprecipitation, cells were lysed with 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 0.1 mM DTT, 1% Triton-X 100 and 10% glycerol (30 min, 4°C). The resulting extract (500 µg) was incubated with the indicated antibodies (2 µg) and precipitated with Protein A-coupled Sepharose beads. Beads were washed once with lysis buffer and three times with 50 mM Tris-HCl pH 7.5, boiled and analyzed in Western blot.

#### **Immunofluorescence**

Cells were plated on poly-L-lysine-pretreated coverslips and incubated (10 min, 37°C), then fixed with ice-cold 100% methanol (3 min) and washed in PBS. Cells were blocked with BSA + 0.1% Triton-X 100, 10% heat-inactivated goat serum and 0.5% BSA (30 min), then stained with primary antibody and incubated with fluorochrome-coupled secondary antibodies. After washing in PBS, coverslips were mounted with PBS + 50% glycerol and analyzed with an Olympus FlowView confocal microscope.

#### **Conjugation, degranulation and cytotoxicity assays**

YTS cells were stained with PKH67 Green Fluorescent Cell Linker and 721.221 cells with PKH26



Red Fluorescent Cell Linker (both from Sigma-Aldrich). YTS and 721.221 cells were coincubated at a 1:2 ratio for different times, fixed in 4% paraformaldehyde and analyzed by FACS. Events positive for red and green fluorescence were considered conjugates, and the percentage of conjugation was calculated as (conjugated YTS cells/total YTS cells) x 100.

For degranulation assays, YTS cells were stained with PKH26 and incubated with 721.221 cells at a 1:2 ratio with 4 nM monensin and FITC-labeled anti-human CD107a or an isotype control antibody (4 h, 37°C), after which samples were analyzed by flow cytometry.

To assay cytotoxicity, target 721.221 cells ( $5 \times 10^3$ ) and various concentrations of effector YTS cells were cultured in RPMI with 10% Alamar blue (overnight, 37°C; (19)). Samples were analyzed using a CytoFluor 2350 (Millipore) with an excitation wavelength of 530 nm and reading at 590 nm. The specific percentage of cytotoxicity was calculated as  $100 \times ((AF \text{ target cells} - (AF \text{ experimental} - AF \text{ effector cells}))/AF \text{ target cells})(19)$ , where AF represents (sample fluorescence – fluorescence of the culture medium) (19).

### **Polarization assays**

YTS cells were incubated with 721.221 target cells at a 1:4 ratio (15 min, 37°C) and cells were prepared on coverslips as above. Contacts were analyzed by confocal microscopy.

### **Statistical analysis**

Two-tailed Student's *t* test was calculated using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software). Unless otherwise indicated, data represent the mean  $\pm$  SD.  $P < 0.05$  was considered significant.

## **Results**

### **RalA and RalB are activated in cytotoxic cells**

Initiation of NK cell cytotoxic function requires signaling through several intracellular pathways, including activation of the Ras oncogene (20, 21). We used YTS cells, a thymic lymphoma-derived NK cell line, to determine whether Ral GTPases mediate some Ras functions in natural cytotoxicity. YTS-mediated cytotoxicity is dependent on CD28 and LFA-1 interaction (22), we therefore stimulated YTS with SC2 *Drosophila* cells expressing B7.1 and ICAM1 (23). Levels of GTP-loaded RalA and RalB were subsequently determined by pulldown assays, using GST/RalBP1 Ral-binding domain (RBD) as bait (18). RalA and RalB showed rapid, transient activation with similar kinetics. Both isoforms exhibited biphasic activation, with a first peak of Ral activation at 3 min post-YTS stimulation; active Ral levels then decreased almost to basal levels and a second activation peak was observed at 15 min post-stimulation (Fig. 1A).

To analyze whether Ral activation was a general event during cell-mediated cytotoxicity or was NK cell-specific, we examined Ral-GTP levels in anti-CD3-stimulated primary mouse CTL. We found a transient increase in RalA-GTP levels shortly after stimulation, similar to that observed for YTS cells (Fig. 1B); in contrast, there was only slight RalB activation. Activation of Ral GTPases might thus be a general mechanism that regulates cell-mediated cytotoxicity.

### **RalA and RalB localize to the lytic granules**

To get insight into Ral function during cytotoxicity, we determined Ral subcellular localization in YTS cells by confocal microscopy. Ral GTPases are geranyl-geranylated and associate to the plasma membrane and vesicular structures (24). In several cell types with secretory function such as platelets, endothelial cells and neurons, Ral localizes to secreted granules (25-27). We costained YTS cells with anti-RalA or -RalB and anti-perforin antibody as a marker of lytic granules. Both Ral isoforms colocalized with perforin in resting YTS cells (Fig. 2A, B, upper panels). Stimulation of YTS cells with the MHC-I-deficient B cell line 721.221 led to Ral translocation to the effector-target interface, where it continued to colocalize with perforin-containing granules (Fig. 2A, B, lower panels). In conjunction with the Ral activation observed after cytotoxicity induction, these data suggest a role for Ral in cell-mediated cytotoxicity.

### **Interference with Ral impairs YTS cytotoxic response**



To examine the role of Ral GTPases in NK cell function, we used siRNA to silence RalA and RalB in YTS cells, followed by cytotoxicity assays using 721.221 as target. Despite partial RalA knockdown, the siRNA reduced YTS cell killing of target cells (Fig. 3A); interference with RalB also impaired cytotoxicity, although to a lesser extent than RalA (Fig. 3B). Both RalA and RalB siRNA were specific and reduced expression of the corresponding isoform by ~80% (Fig. 3C).

We also generated stable YTS cell lines expressing lentiviral vector-driven short hairpin (sh) RNA for RalA and RalB (Fig. 3D). Results in these cells were similar to those in transiently transfected cells; both RalA shRNA- and RalB shRNA-expressing YTS cells showed reduced Ral isoform expression and reduced cytotoxicity compared to controls, with a more pronounced effect in RalA shRNA-expressing cells (Fig. 3E, F).

To confirm that the cytotoxic machinery is unaffected by RalA or RalB knockdown, we measured perforin levels in silenced YTS cells; RalA shRNA- and RalB shRNA-expressing YTS cells and controls showed similar perforin levels (Fig. 3G). Reduction of RalB and, more clearly, of RalA thus resulted in reduced cell-mediated cytotoxicity.

### **Ral GTPases regulates granule polarization and secretion**

Efficient cell-mediated killing requires the completion of three steps: formation of a stable conjugate with target cells, polarization of the secretory machinery and finally, granule secretion. To determine which of these processes is regulated by activation of Ral GTPases, we first analyzed the effect of Ral silencing on YTS conjugate formation with 721-221 target cells by two-color FACS analysis. Interference with neither RalA nor RalB affected YTS cell conjugation with target cells (Fig. 4A).

Ral is linked to various polarized secretion events that require vesicle targeting to specific membrane domains; these include basolateral secretion in epithelia (16), synaptic vesicle release in neurons (28), and secretion of Weibel-Palade bodies in endothelial cells (29). Ral might thus be involved in lytic granule polarization during cell-mediated cytotoxicity. To analyze the effects of Ral silencing on granule polarization, we induced conjugate formation between YTS cells stably expressing RalA shRNA and RalB shRNA and target 721.221 cells, then stained for perforin and tubulin as markers of lytic granules and the MTOC, respectively (Fig. 4B). Incubation with target cells led to MTOC reorientation and perforin polarization to the contact zone in control YTS cells; in cells expressing RalA shRNA, however, we observed aberrant localization of both MTOC and lytic granules (Fig. 4B).

Quantification of conjugates showing MTOC reorientation and perforin polarization to the contact zone showed that RalA knockdown led to a significant decrease in the percentage of cells in which the secretory machinery was polarized (Fig. 4C); in contrast, RalB silencing did not affect polarization (Fig. 4D).

We determined whether, in addition to regulating lytic granule polarization, Ral is implicated in their secretion. To assess possible degranulation defects, we measured levels of anti-CD107a (lysosome-associated membrane protein 1, LAMP1) in YTS cells activated with target 721.221 cells. CD107a is located at the lytic granule membrane, and forms part of the cell membrane after granule fusion; cell surface CD107a expression is therefore considered a degranulation marker (30). Incubation with target cells induced a significant increase in membrane CD107a levels in control cells, as predicted, but did not notably increase degranulation of YTS cells in the absence of RalA or RalB (Fig. 4E).

The results show that both RalA and RalB participate in cell-mediated cytotoxicity; RalA regulates granule polarization and secretion, while RalB mediates only the latter step.

### **Interaction with target cells induces exocyst assembly**

RalGTPases interact with several effector proteins, including the exocyst components Sec5 and Exo84 (7, 8). Assembly of the exocyst complex is necessary for a large number of cell functions involving targeted membrane delivery, and Ral activation is essential for the assembly and localization of the octameric exocyst complex (7, 8). To determine whether the cytotoxic response in YTS cells requires exocyst assembly, we immunoprecipitated RalA and RalB and tested for associated Sec8. After CD28/LFA-1 stimulation, both RalA and RalB coimmunoprecipitated with Sec8 with kinetics resembling those of Ral activation (Fig. 5A). Since Ral GTPases do not bind directly to the Sec8 exocyst subunit, these results indicate that triggering of the cytotoxic response induces exocyst assembly. To determine whether Ral/Sec8 interaction was dependent on Ral activation, we performed a pull-down assay and analyzed the exocyst proteins associated to active Ral. Sec5, one of the exocyst components that binds directly to Ral GTPases, interacted with active RalA and RalB; Sec8 levels also paralleled those of active RalA and RalB, suggesting that exocyst assembly depends on Ral activation (Fig. 5B).

The unassembled exocyst exists as hemicomplexes distributed in distinct cell locations; these hemicomplexes interact to form the functional octameric complex (8). We used immunofluorescence and confocal imaging to examine the subcellular localization of different exocyst subunits in YTS cells.



Staining for Sec5 showed a punctate pattern compatible with vesicular localization. These vesicles differ from lytic granules, however, since Sec5 did not colocalize with perforin (Fig. 5C). After YTS cells were incubated with 721.221 target cells, Sec5-containing vesicles colocalized partially with lytic granules (Fig. 5C).

Analysis of the cellular location of other exocyst proteins in unstimulated YTS cells showed Sec8 colocalization with perforin, indicating that some exocyst components are found in lytic granules (Fig. 5D); a fraction of Sec8 also appeared to be lytic granule-independent. In contrast, Sec10 localized more diffusely in cytoplasm, and did not colocalize with perforin or Sec8 (Fig. 5D). In accordance with the biochemical data for exocyst assembly (Fig. 5A), YTS conjugate formation with 721.221 cells led to Sec8 and perforin translocation to the contact zone, where they colocalized with a large Sec10 fraction (Fig. 5D). These findings suggest exocyst assembly at the contact zone during cytotoxicity, and indicate a possible role for the exocyst in lytic granule polarization and secretion.

Analysis of the cellular location of other exocyst proteins before stimulation of YTS cells showed that a fraction of Sec8 colocalizes with perforin, indicating that some exocyst components are found in lytic granules in unstimulated cells (Fig. 5D). In contrast, Sec10 localized more diffusely in cytoplasm, and did not colocalize with perforin or Sec8 (Fig. 5D). Incubation of YTS with target cells confirmed fusion of perforin-positive lytic granules with vesicles containing exocyst components. Indeed, YTS conjugate formation with 721.221 cells led to Sec8 and perforin translocation to the contact zone, where they colocalized with a large fraction of Sec10 (Fig. 5D); this result is in agreement with the biochemical data for exocyst assembly (Fig. 5A). These findings show exocyst assembly at the contact zone during cytotoxicity, suggesting a role for the exocyst in lytic granule polarization and secretion.

### **Sec5 knockdown reduces cytotoxicity and degranulation in YTS cells**

To test whether impaired cytotoxicity in Ral-deficient cells was due to defective exocyst assembly, we silenced Sec5 in YTS cells using siRNA (Fig. 6A) and tested their ability to kill 721.221 target cells in an Alamar blue assay. Interference with Sec5 impaired YTS cytolytic capacity, similar to results obtained after RalA silencing (Fig. 6B). Analysis of the mechanism involved indicated that Sec5 silencing did not affect YTS cell capacity to form stable conjugates with target cells (Fig. 6C). At difference from RalA interference, MTOC reorganization and lytic granule polarization to the immunological synapse were also unaffected in Sec5-silenced cells (Fig. 6D). Nonetheless, interference with Sec5 reduced

CD107 translocation to the YTS cell plasma membrane after activation with target cells (Fig. 6E), supporting a role for exocyst assembly during granule secretion.



## Discussion

Here we show that Ral GTPases regulate cell-mediated cytotoxicity in NK cells. Both RalA and RalB are activated rapidly in YTS cells after interaction with target cells, and interference with either Ral isoform impaired YTS capacity to kill target cells. Analysis of the essential stages involved in cytotoxicity indicated that RalA regulates polarization of the lytic machinery to the immunological synapse as well as the degranulation step; in contrast, RalB regulates only the latter step in cytotoxicity. Study of the molecular mechanism underlying Ral modulation of cytotoxicity showed that RalA and RalB regulated exocyst assembly, and that this complex is needed for YTS degranulation and efficient killing of target cells.

Ral GTPases are associated to the plasma membrane and to vesicular structures within the cell. In epithelial cells, RalA and RalB are found in the endosomal compartment (16, 31); we observed no RalA or RalB colocalization with endosomal markers in YTS cells (not shown), suggesting that these GTPases have a different location in NK cells. In some secretory cells, Ral localizes to secreted vesicles (25-27). In NK cells, we found that both RalA and RalB associated with lytic granules, which constitute a specialized type of lysosome called secretory lysosomes (32); Ral GTPases associate to other secretory lysosomes such as the dense granules in platelets (27). This lysosome association is restricted to secretory lysosomes, as we did not detect colocalization of RalGTPases and the lysosomal marker LAMP2 in 293T cells (not shown).

RalA and RalB share 85% amino acid sequence identity; despite this similarity, RalA and RalB are reported to have some specific, non-overlapping functions. For instance, both isoforms contribute to oncogenesis, but RalA is needed for anchorage-independent cell growth and RalB regulates tumor cell survival (33); RalA regulates stabilization of the intracellular bridge during cytokinesis, whereas RalB is required for abscission (34). We found that both isoforms contributed to cell-mediated cytotoxicity, although our results suggest distinct functions for RalA and RalB. Interference with RalA impaired granule polarization and secretion, whereas RalB knockdown affected granule secretion, but not polarization of the cytotoxic machinery. RalA involvement in two separate cytotoxic steps could explain the greater effect of silencing this isoform on cytotoxicity.

A critical step in cell-mediated cytotoxicity is the directed secretion of lytic granules at the immunological synapse, by which lytic molecules are delivered specifically to the target cell and

neighboring cells are protected from damage. The octameric exocyst complex regulates polarized vesicle secretion in several cell types. In basal conditions, exocyst hemicomplexes are located in distinct vesicle compartments (8). We observed that Sec8 is found mainly in lytic granules, while Sec5 and Sec10 localize to other vesicles. Prior to their secretion at the immunological synapse, lytic granules must mature through heterotypic vesicle fusion (35, 36). In YTS cells, interaction with target cells promoted Ral-mediated exocyst assembly as well as Sec5 and Sec10 relocalization to the lytic granules (Fig. 7C, D); Ral-mediated exocyst assembly might thus trigger heterotypic vesicle fusion, leading to granule maturation. Patients with deficiencies in Rab27 and Munc13-4, the proteins responsible for heterotypic vesicle assembly during cytotoxicity (35, 36), show impaired cytotoxicity and defects in granule secretion (2, 3) similarly to the alterations observed in Ral-silenced cells.

In addition to regulation of granule secretion, RalA also controls polarization of the secretory machinery in a Sec5-independent manner (Fig. 4C, 6C). Polarization is dependent on microtubules and the actin cytoskeleton (37), and Ral GTPases modulate cytoskeleton dynamics through interaction with RalBP1 and filamin (38, 39). Further study is required to determine whether these effectors are downstream of Ral in cell-mediated cytotoxicity.



## **Acknowledgements**

We thank L. Sanz and M. García for mouse genotyping, R. Spada for helping with SC2 cell culture, A.C. Carrera for helpful discussions and C. Mark for editorial assistance.

## **<sup>1</sup>Footnotes**

1. JSR receives a JAE fellowship from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas. AGG holds a Ramón y Cajal contract from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN). This work was supported by the MICINN (SAF2007-60490 to AGG and SAF2008-00471 to DFB), the Madrid Regional Government (CCG06-CSIC/SAL-0904 to AGG) and the Carlos III Health Institute Cooperative Research Thematic Network (RETICS program), Spanish Ministry for Health & Consumer Affairs (RD08/0075/0015, RIER, to DFB).

## References

1. Stinchcombe, J. C., and G. M. Griffiths. 2007. Secretory mechanisms in cell-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23: 495-517.
2. Feldmann, J., I. Callebaut, G. Raposo, S. Certain, D. Bacq, C. Dumont, N. Lambert, M. Ouachee-Chardin, G. Chedeville, H. Tamary, V. Minard-Colin, E. Vilmer, S. Blanche, F. Le Deist, A. Fischer, and G. de Saint Basile. 2003. Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell* 115: 461-473.
3. Menasche, G., E. Pastural, J. Feldmann, S. Certain, F. Ersoy, S. Dupuis, N. Wulffraat, D. Bianchi, A. Fischer, F. Le Deist, and G. de Saint Basile. 2000. Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat. Genet.* 25: 173-176.
4. zur Stadt, U., S. Schmidt, B. Kasper, K. Beutel, A. S. Diler, J. I. Henter, H. Kabisch, R. Schneppenheim, P. Nurnberg, G. Janka, and H. C. Hennies. 2005. Linkage of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) type-4 to chromosome 6q24 and identification of mutations in syntaxin 11. *Hum. Mol. Genet.* 14: 827-834.
5. Feig, L. A. 2003. Ral-GTPases: approaching their 15 minutes of fame. *Trends Cell Biol* 13: 419-425.
6. Cantor, S. B., T. Urano, and L. A. Feig. 1995. Identification and characterization of Ral-binding protein 1, a potential downstream target of Ral GTPases. *Mol. Cell. Biol.* 15: 4578-4584.
7. Moskalenko, S., D. O. Henry, C. Rosse, G. Mirey, J. H. Camonis, and M. A. White. 2002. The exocyst is a Ral effector complex. *Nat. Cell Biol.* 4: 66-72.
8. Moskalenko, S., C. Tong, C. Rosse, G. Mirey, E. Formstecher, L. Daviet, J. Camonis, and M. A. White. 2003. Ral GTPases regulate exocyst assembly through dual subunit interactions. *J. Biol. Chem.* 278: 51743-51748.
9. Frankel, P., A. Aronheim, E. Kavanagh, M. S. Balda, K. Matter, T. D. Bunney, and C. J. Marshall. 2005. RalA interacts with ZONAB in a cell density-dependent manner and regulates its transcriptional activity. *EMBO J.* 24: 54-62.
10. Jiang, H., J. Q. Luo, T. Urano, P. Frankel, Z. Lu, D. A. Foster, and L. A. Feig. 1995. Involvement of Ral GTPase in v-Src-induced phospholipase D activation. *Nature* 378: 409-412.
11. Luo, J. Q., X. Liu, S. M. Hammond, W. C. Colley, L. A. Feig, M. A. Frohman, A. J. Morris, and



- D. A. Foster. 1997. RalA interacts directly with the Arf-responsive, PIP2-dependent phospholipase D1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235: 854-859.
12. Sidhu, R. S., R. R. Clough, and R. P. Bhullar. 2005. Regulation of phospholipase C-delta1 through direct interactions with the small GTPase Ral and calmodulin. *J Biol Chem* 280: 21933-21941.
  13. TerBush, D. R., T. Maurice, D. Roth, and P. Novick. 1996. The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 15: 6483-6494.
  14. He, B., and W. Guo. 2009. The exocyst complex in polarized exocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21: 537-542.
  15. Sugihara, K., S. Asano, K. Tanaka, A. Iwamatsu, K. Okawa, and Y. Ohta. 2002. The exocyst complex binds the small GTPase RalA to mediate filopodia formation. *Nat. Cell Biol.* 4: 73-78.
  16. Shipitsin, M., and L. A. Feig. 2004. RalA but not RalB enhances polarized delivery of membrane proteins to the basolateral surface of epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.* 24: 5746-5756.
  17. Hogquist, K. A., S. C. Jameson, W. R. Heath, J. L. Howard, M. J. Bevan, and F. R. Carbone. 1994. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76: 17-27.
  18. Wolthuis, R. M., B. Franke, M. van Triest, B. Bauer, R. H. Cool, J. H. Camonis, J. W. Akkerman, and J. L. Bos. 1998. Activation of the small GTPase Ral in platelets. *Mol. Cell. Biol.* 18: 2486-2491.
  19. Nociari, M. M., A. Shalev, P. Benias, and C. Russo. 1998. A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* 213: 157-167.
  20. Lee, S. H., S. Yun, J. Lee, M. J. Kim, Z. H. Piao, M. Jeong, J. W. Chung, T. D. Kim, S. R. Yoon, P. D. Greenberg, and I. Choi. 2009. RasGRP1 is required for human NK cell function. *J. Immunol.* 183: 7931-7938.
  21. Purdy, A. K., and K. S. Campbell. 2009. SHP-2 expression negatively regulates NK cell function. *J. Immunol.* 183: 7234-7243.
  22. Azuma, M., M. Cayabyab, D. Buck, J. H. Phillips, and L. L. Lanier. 1992. Involvement of CD28 in MHC-unrestricted cytotoxicity mediated by a human natural killer leukemia cell line. *J. Immunol.* 149: 1115-1123.
  23. Bryceson, Y. T., M. E. March, D. F. Barber, H. G. Ljunggren, and E. O. Long. 2005. Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. *J. Exp.*

- Med.* 202: 1001-1012.
24. Kinsella, B. T., R. A. Erdman, and W. A. Maltese. 1991. Carboxyl-terminal isoprenylation of ras-related GTP-binding proteins encoded by *rac1*, *rac2*, and *ralA*. *J. Biol. Chem.* 266: 9786-9794.
  25. Bielinski, D. F., H. Y. Pyun, K. Linko-Stentz, I. G. Macara, and R. E. Fine. 1993. Ral and Rab3a are major GTP-binding proteins of axonal rapid transport and synaptic vesicles and do not redistribute following depolarization stimulated synaptosomal exocytosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1151: 246-256.
  26. de Leeuw, H. P., P. M. Wijers-Koster, J. A. van Mourik, and J. Voorberg. 1999. Small GTP-binding protein RalA associates with Weibel-Palade bodies in endothelial cells. *Thromb. Haemost.* 82: 1177-1181.
  27. Mark, B. L., O. Jilkina, and R. P. Bhullar. 1996. Association of Ral GTP-binding protein with human platelet dense granules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225: 40-46.
  28. Polzin, A., M. Shipitsin, T. Goi, L. A. Feig, and T. J. Turner. 2002. Ral-GTPase influences the regulation of the readily releasable pool of synaptic vesicles. *Mol. Cell. Biol.* 22: 1714-1722.
  29. Rondaij, M. G., R. Bierings, E. L. van Agtmaal, K. A. Gijzen, E. Sellink, A. Kragt, S. S. Ferguson, K. Mertens, M. J. Hannah, J. A. van Mourik, M. Fernandez-Borja, and J. Voorberg. 2008. Guanine exchange factor RalGDS mediates exocytosis of Weibel-Palade bodies from endothelial cells. *Blood* 112: 56-63.
  30. Alter, G., J. M. Malenfant, and M. Altfeld. 2004. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J. Immunol. Methods* 294: 15-22.
  31. Takaya, A., T. Kamio, M. Masuda, N. Mochizuki, H. Sawa, M. Sato, K. Nagashima, A. Mizutani, A. Matsuno, E. Kiyokawa, and M. Matsuda. 2007. R-Ras regulates exocytosis by Rgl2/Rlf-mediated activation of RalA on endosomes. *Mol. Biol. Cell* 18: 1850-1860.
  32. Blott, E. J., and G. M. Griffiths. 2002. Secretory lysosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 122-131.
  33. Chien, Y., and M. A. White. 2003. RAL GTPases are linchpin modulators of human tumour-cell proliferation and survival. *EMBO Rep.* 4: 800-806.
  34. Cascone, I., R. Selimoglu, C. Ozdemir, E. Del Nery, C. Yeaman, M. White, and J. Camonis. 2008. Distinct roles of RalA and RalB in the progression of cytokinesis are supported by distinct RalGEFs. *EMBO J.* 27: 2375-2387.



35. Menager, M. M., G. Menasche, M. Romao, P. Knapnougel, C. H. Ho, M. Garfa, G. Raposo, J. Feldmann, A. Fischer, and G. de Saint Basile. 2007. Secretory cytotoxic granule maturation and exocytosis require the effector protein hMunc13-4. *Nat. Immunol.* 8: 257-267.
36. Wood, S. M., M. Meeths, S. C. Chiang, A. G. Bechensteen, J. J. Boelens, C. Heilmann, H. Horiuchi, S. Rosthoj, O. Rutynowska, J. Winiarski, J. L. Stow, M. Nordenskjold, J. I. Henter, H. G. Ljunggren, and Y. T. Bryceson. 2009. Different NK cell-activating receptors preferentially recruit Rab27a or Munc13-4 to perforin-containing granules for cytotoxicity. *Blood* 114: 4117-4127.
37. Banerjee, P. P., R. Pandey, R. Zheng, M. M. Suhoski, L. Monaco-Shawver, and J. S. Orange. 2007. Cdc42-interacting protein-4 functionally links actin and microtubule networks at the cytolytic NK cell immunological synapse. *J. Exp. Med.* 204: 2305-2320.
38. Boissel, L., N. Houssin, A. Chikh, A. Rynditch, L. Van Hove, and J. Moreau. 2007. Recruitment of Cdc42 through the GAP domain of RLIP participates in remodeling of the actin cytoskeleton and is involved in *Xenopus* gastrulation. *Dev. Biol.* 312: 331-343.
39. Ohta, Y., N. Suzuki, S. Nakamura, J. H. Hartwig, and T. P. Stossel. 1999. The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 2122-2128.

### Figure legends

**Figure 1.** RalA and RalB are activated after induction of a cytotoxic response. A, YTS NK cells were coincubated with SC2 target cells expressing B7/ICAM-1 at a 1:1 ratio for the indicated times. RalA and RalB-GTP levels were analyzed by pulldown assay followed by Western blot using anti-RalA or -RalB antibodies. Graphs show mean  $\pm$  SD of Ral signals in arbitrary units (AU), normalized for Ral levels at  $t = 0$  ( $n = 4$ ). B, Primary mouse CTL were stimulated with anti-CD3 antibodies for the indicated times. Levels of active RalA and RalB were determined as above. Data were quantitated as in A ( $n = 3$ ).

**Figure 2.** RalA and RalB localize to the lytic granules in YTS cells. YTS cells were incubated alone or with 721.221 target cells at a 1:4 ratio (20 min), fixed, stained with anti-RalA (A) or -RalB (B) (both green) and anti-perforin (red) and analyzed by confocal microscopy. \*denotes 721.221 target cells.

**Figure 3.** RalA and RalB regulate cytotoxicity in YTS cells. YTS cells were transiently transfected with control, RalA (A) or RalB (B) siRNA, and their ability to lyse 721.221 cells was determined by Alamar blue assay at different effector/target (E:T) cell ratios. Data are shown as mean  $\pm$  SD of triplicates from one representative experiment of three performed. C, YTS cells were transfected with control, RalA or RalB siRNA, and RalA and RalB levels were analyzed by Western blot. D, Western blot analysis of RalA and RalB levels in YTS cells stably expressing lentiviral vector-driven RalA, RalB or control shRNA, as indicated. E,F, The percentage of specific cytotoxicity against 721.221 target cells of YTS cells expressing control or RalA shRNA (E) and control or RalB shRNA (F) was determined by Alamar blue assay. Data are shown as mean  $\pm$  SD of triplicates from one representative experiment of three performed. G, Western blot analysis of perforin levels in control-, RalA- and RalB shRNA-expressing cells.

**Figure 4.** Effect of RalGTPases in conjugate formation, polarization and degranulation. A, YTS cells stably expressing control or RalA shRNA (left), or control or RalB shRNA (right) were labeled with PKH67 and coincubated with PKH26-labeled 721.221 target cells at a 1:2 E:T ratio. The percentage of conjugation was calculated as (conjugated YTS cells/total YTS cells)  $\times$  100. The mean  $\pm$  SD of three independent experiments is shown. Differences between groups were not significant. *n.s.*, not significant. B, YTS cells stably expressing control, RalA or RalB shRNA were incubated alone or with 721.221 target cells, fixed, stained with anti- $\alpha$ -tubulin and -perforin antibodies and analyzed by confocal

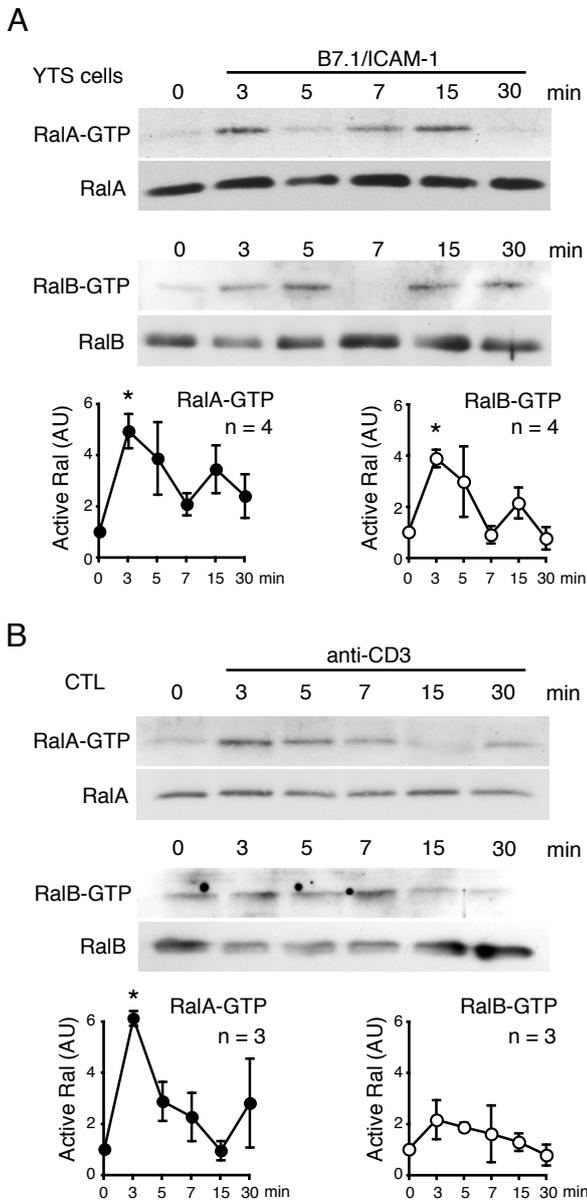
microscopy. \*denotes 721.221 target cells. Quantification of MTOC and lytic granule polarization frequencies in control- vs. RalA- (C), or control- vs. RalB- (D) silenced YTS cells. Data show mean  $\pm$  SD of three independent experiments; at least 50 conjugates were scored in each experiment. \* $p < 0.01$ , two-tailed Student's *t*-test. E, YTS cells stably expressing control, RalA (left) or RalB (right) shRNA were labeled with PKH26 and incubated with 721.221 target cells at a 1:2 ratio. The assay was performed in the presence of antibody to the degranulation marker CD107a; cells were then harvested and analyzed by flow cytometry. Graphs show the percentage of CD107a<sup>+</sup> (degranulating) cells within the PKH26-labeled population (mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). Statistical differences were determined using a two-tailed Student's *t*-test, \* $p < 0.05$ .

**Figure 5.** Ral GTPases regulate exocyst assembly during the cytotoxic response. A, YTS cells were stimulated with SC2 target cells expressing B7/ICAM-1 for the indicated times. Lysates were immunoprecipitated with anti-RalA or -RalB antibodies and analyzed by Western blot with anti-Sec8 antibody; as a protein loading control, Sec8 levels were tested in whole cell lysates (bottom). Graphs show mean  $\pm$  SD of Sec8 signals in arbitrary units (AU) normalized for Sec8 levels at  $t = 0$  ( $n = 4$ ) \* $p < 0.05$ , two-tailed Student's *t*-test. B, YTS cells were stimulated as in A, and lysates incubated with GST-RalBP1 RBD-conjugated beads to pull down active RalGTPases. Levels of GTP-bound RalA, RalB and associated Sec5 or Sec8 were determined by Western blot; as controls, whole cell lysates were tested with anti-RalA, -RalB, -Sec5 and -Sec8 antibodies (center). After incubation with anti-RalA, membranes were stripped and incubated with anti-RalB. Graphs show mean  $\pm$  SD of RalA-GTP, RalB-GTP, Sec5 and Sec8 signals in arbitrary units (AU) normalized for the levels at  $t = 0$  ( $n = 4$ ) \* $p < 0.05$ , two-tailed Student's *t*-test. C, Confocal microscopy of YTS cells alone or incubated with 721.221 target cells, then stained with anti-perforin (red) and -Sec5 (green). D, Cells were treated as in C, and stained with anti-perforin (green), -Sec8 (red) and -Sec10 (blue).

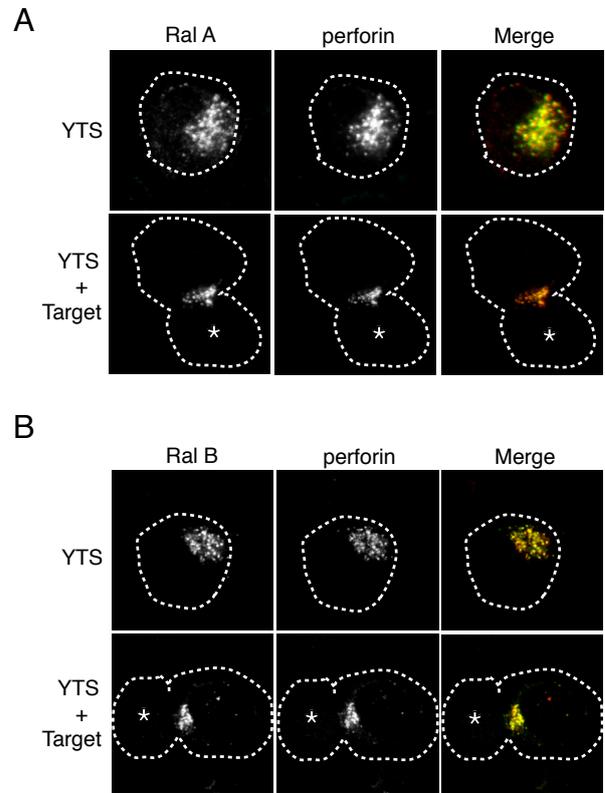
**Figure 6.** Sec5 regulates cytotoxicity in YTS cells. A, YTS cells were transfected with control or Sec5 siRNA as indicated, and Sec5, RalA and RalB levels were determined by Western blot. B, The percentage of specific cytotoxicity against 721.221 target cells of control- or Sec5 RNAi-expressing YTS cells was determined by Alamar blue assay. Data show mean  $\pm$  SD of triplicates of one representative experiment of three performed. C, Conjugate formation between 721.221 target cells and YTS cells transiently transfected with control or Sec5 siRNA as indicated (mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). D, Quantification of MTOC

and lytic granule polarization frequencies in control and Sec5-silenced YTS cells. Data show mean  $\pm$  SD of three independent experiments; at least 50 conjugates were scored in each experiment. E, The percentage of CD107a<sup>+</sup> (degranulating) cells is shown in control and Sec5 siRNA-transfected YTS cells after coincubation with 721.221 target cells (mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). Statistical differences were determined using a two-tailed Student's *t*-test, \* $p < 0.005$ .

**Figure 1**



**Figure 2**





**Figure 3**

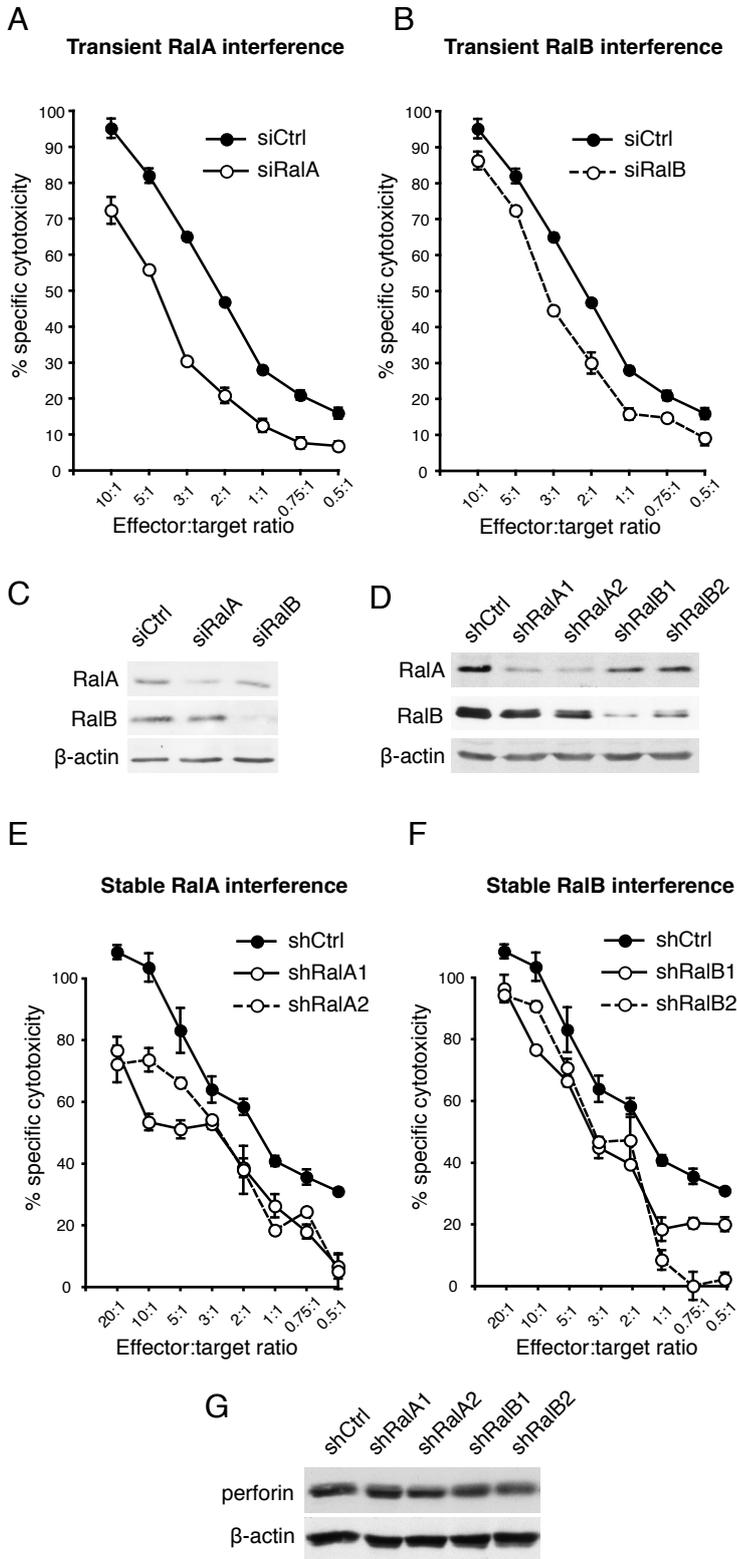
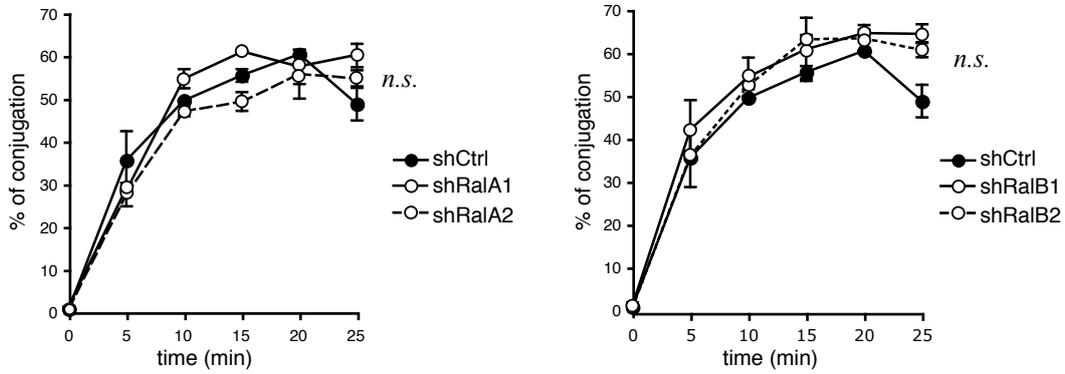
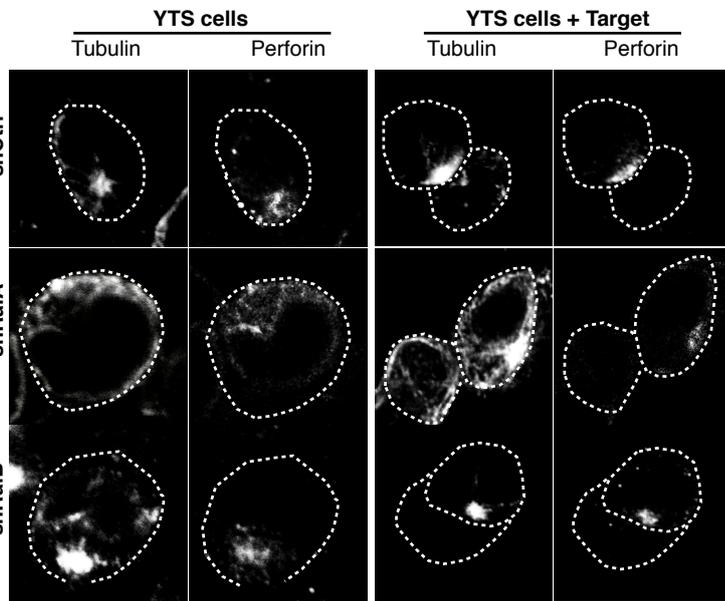


Figure 4

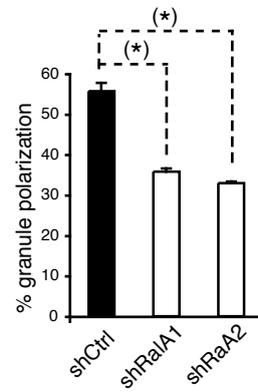
A



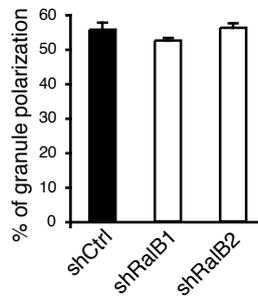
B



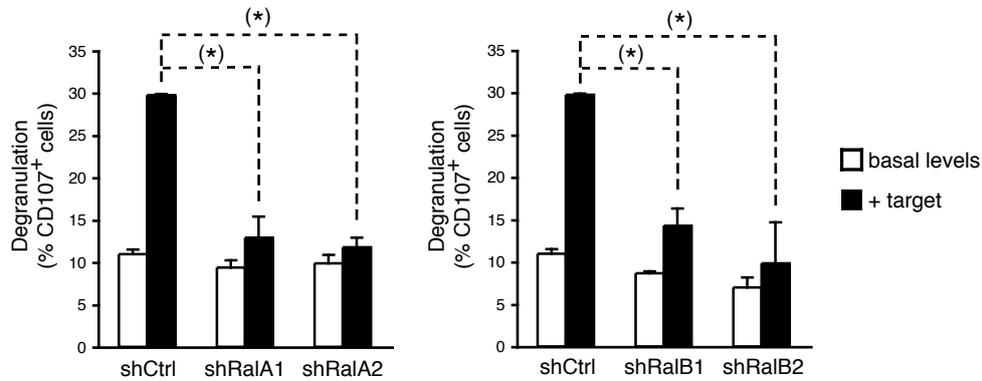
C



D

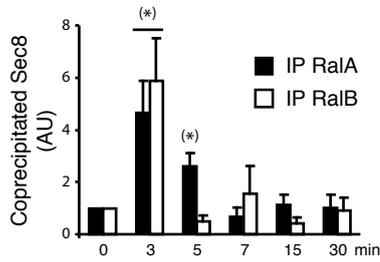
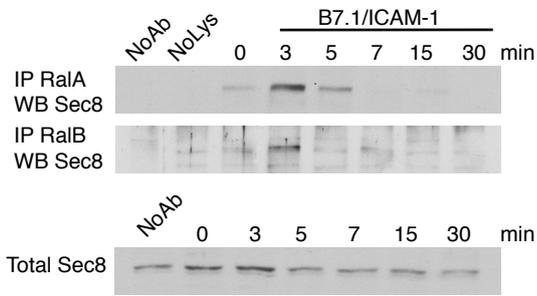


E

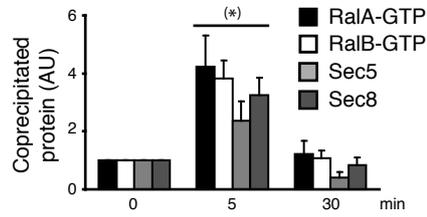
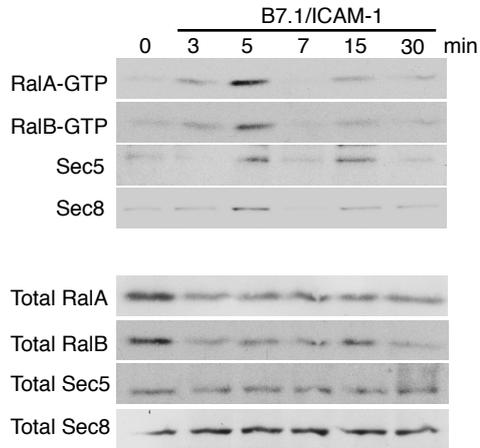


**Figure 5**

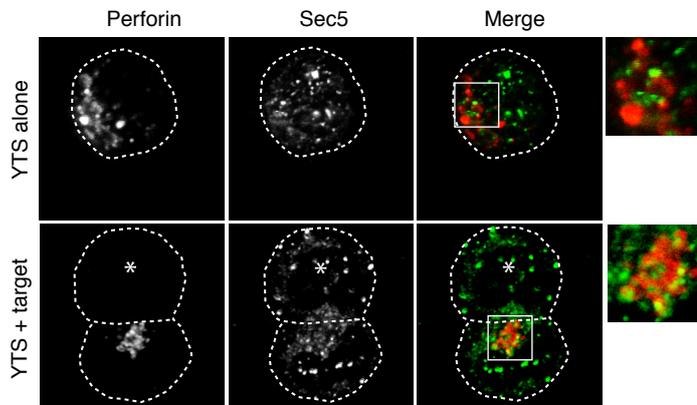
**A**



**B**



**C**



**D**

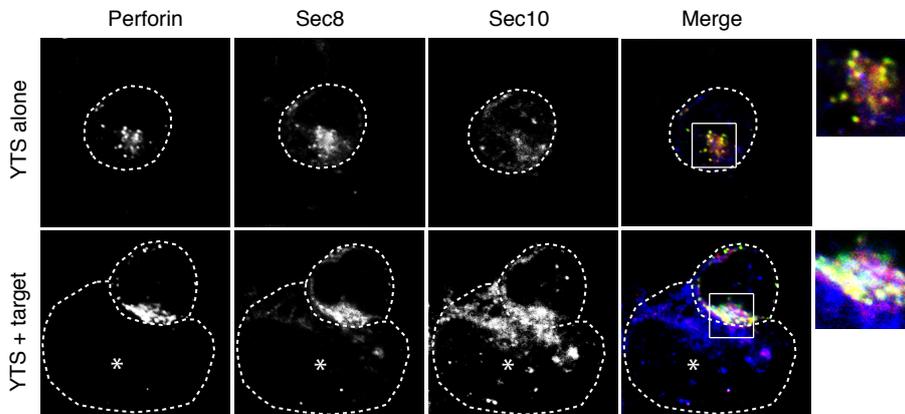


Figure 6

