

*Departamento de Biología Molecular  
Facultad de Ciencias  
Universidad Autónoma de Madrid*

**Tesis doctoral**

**Función de RalGDS en cáncer asociado a  
colitis y en el desarrollo de la célula T**

**Verónica Sánchez Alonso**

**Madrid 2014**



**Departamento de Biología Molecular  
Facultad de Ciencias  
Universidad Autónoma de Madrid**

**Tesis doctoral**

# **Función de RalGDS en cáncer asociado a colitis y en el desarrollo de la célula T**

**Doctorando: Verónica Sánchez Alonso  
Directora de Tesis: Ana María González García**

**Departamento de Inmunología y Oncología**

**Centro Nacional de Biotecnología**

**Madrid 2014**



# AGRADECIMIENTOS



Llegó el momento de escribir los agradecimientos y eso quiere decir que ya estoy a puntito de llegar a la meta de esta carrera que ha durado cuatro años y medio. Una carrera llena de obstáculos, con subidas y bajadas, con momentos llenos de alegría y momentos de desesperación. Una carrera en la que parece que compites con los demás pero en realidad sólo lo haces contigo mismo. Y mirando hacia atrás, cuando dieron el pistoletazo de salida, veo que he cambiado, que me conozco mejor. Y eso ya es un motivo para dar las gracias.

Pero este apartado no está para que yo eche un discurso sobre la superación, sobre cómo este trabajo te pone entre la espada y la pared y te hace decidir sobre si lo mejor es seguir o abandonarlo. Este apartado es para vosotros. Los que habéis conseguido que no me vuelva loca (un poquito más de lo que estoy) y habéis logrado que no tirara la toalla ante las dificultades que han ido apareciendo.

Debo comenzar con mis compañeros de la Universidad de Alcalá. Gracias a Eva por ser mi primera entrenadora. Porque a pesar de que estabas liada escribiendo la tesis sacaste tiempo para que yo no estuviera más perdida de lo que estaba. Gracias a Borja por ser un gran compañero de laboratorio y un buen amigo. Sé que si hubiera tenido la oportunidad de quedarme allí hubiéramos hecho un gran equipo. Gracias a Eva, Adri, Anuska, Valdehita, Sandra y Ana Bajo. Por aceptarme en vuestro grupo sin ser una Prieto, por darme consejos, por animarme cuando lo necesitaba, por esos momentos en las comidas tan imprescindibles. Y sobre todo gracias a Sandra. Me alegra muchísimo que hiciéramos el mismo máster porque así he podido conocerte mejor. Eres una de mis mejores amigas y no con todas he podido compartir puesto de trabajo. Me siento muy agradecida por ello.

Tras el entrenamiento en la Universidad de Alcalá llegó la carrera en el CNB. Me sentí afortunada, y aún me siento, de obtener una beca FPI. Gracias a Anita por confiar en mí y darme la oportunidad de trabajar en ciencia. Y gracias también a Ana Clara por aceptarme como una más de su grupo. Gracias a todos aquellos que han pasado por el laboratorio 413. Amit, Ángeles, Marisa, Isa, Vincenzo, Esther, Susana, Jesús, Miguel, Rosa, Ariel, Albert, Cris. Con algunos de vosotros he compartido pocos momentos, pero guardo un buen recuerdo. Gracias a Javi por hacerme sonreír. A Vicen por hacerme reír y por esas conversaciones tan trascendentes que hemos tenido. Han sido pocas pero intensas. A Carmen y a Lore porque siempre habéis estado dispuestas a ayudarme, sobre todo en la recta final en la que yo sola no he podido con todo. Y por nuestras charlas. Gracias a Abel, aunque a veces me hayas sacado de quicio con tus preguntitas de examen ha sido un placer tenerte tan cerca y no solo por tus piropos. Se ha notado mucho tu ausencia. A Cinthya y a Patri por ser tan trabajadoras y por querer aprender más de lo que se os exige. Patri, gracias a ti el último año no ha sido tan duro. Me ha encantado compartir conversaciones, experimentos y cervezas. Y gracias a tres personas que han sido un pilar fundamental durante la tesis, María, Vir y Chechu. A tres amigos con los que he reído, he aprendido, he salido de juerga y me he relajado en la piscina (trabajar en verano ahora tiene otro significado). María, podría decir que eres una gran trabajadora, inteligente, siempre dispuesta a ayudar y a hacer más de lo que se espera de ti. Pero eso ya lo sabe todo el mundo. Yo quiero darte las gracias porque has sido mi amiga nada más conocernos, porque me has dado consejos, porque has querido escuchar los míos, porque has estado ahí tanto en los momentos buenos como en los malos. A Vir porque a pesar de que somos bien distintas me has aceptado tal como soy y en la distancia sigues siendo mi amiga, sigues preocupándote por mí, sigues aconsejándome (lo sé, soy un poco pardi todavía). Y a Chechu porque simplemente eres genial. Porque gracias a tu positividad has hecho que creyera en mí. Y encima has sido quien me ha enseñado a trabajar. Desde que os habéis ido del laboratorio he notado mucho vuestra ausencia. Gracias por esa huella que habéis dejado en mí.

Por supuesto quiero dar las gracias a mis compañeros de comida. Y no sólo os doy las gracias intentando que no me volváis a llamar *Vero la mala*. Quiero daros las gracias por los momentos que he vivido con vosotros en las comidas. Esos momentos que me han ayudado a relajarme y olvidarme del estrés del laboratorio y que han hecho la estancia en el CNB más agradable. José Miguel, Coral y Checa, gracias.

Gracias también a Antonio por hacerme sonreír, a Pili y a Laura por vuestro interés y a todos mis compañeros del DIO. En especial a Katy, Pedro, Denise, Eva, Sheila, Manuela, Bea, Graciela, Dimitri, Gema, Miriam, Laura, Paloma, Rafal y Teresa. Si no estáis en esta lista no os lo toméis a mal. Todos habéis aportado un granito de arena a mi estancia en el DIO pero estas personas me han ayudado en momentos más concretos. También quería agradecer a Sylvia y Susana de microscopía y a Lucio, Mercedes, Eber y Raquel del animalario porque, aunque sólo hicieran su trabajo, su forma de hacerlo ha facilitado el mío.

Profesionalmente creo que he dado las gracias a todo el mundo, y por si alguien se me escapa, ¡gracias! Pero llega el momento de agradecer a aquellas personas que siempre han estado y están ahí. A mi familia y amigos. Comienzo por esa familia que podemos elegir, los amigos. Decidimos quiénes están dentro de nuestra vida y quiénes no. Y estas personas nos demuestran día a día porque siguen en nuestro círculo. A Carmen, esa asturiana que volvió a traer la alegría al CNB. Malena y Elena, sé que últimamente no nos hemos visto lo suficiente, hablamos lo que podemos y parece que es poco. Pero sé que estáis ahí y espero que no dudéis de que yo también lo estoy. Sandra y Sonia, las *súper nenas*. Sonia, es un placer tenerte cerca no solo porque eres una gran persona sino porque siempre demuestras tu interés por todo lo que hago. Y Sandra, qué más puedo decirte. Somos amigas pero además hemos estudiado juntas, hemos trabajado juntas, ¡hasta hemos vivido juntas! Gracias por todo, en especial por ese 31 de enero. A las *corkis*, Irlanda ha sido el mejor viaje de mi vida solo porque me dio la oportunidad de conoceros. Esther, parece que estás ausente pero nunca es así y además te encanta presumir de amiga que trabaja con ratones. Laia, eres un encanto. Nos hemos quejado de hablar poco pero estamos de acuerdo en que no es necesario. Siempre estaremos apoyándonos. María, ¡qué haría yo sin ti! A veces creo que somos muy diferentes y que no nos comprendemos, pero luego me doy cuenta que eso da absolutamente igual. Me siento afortunada de tenerte como amiga. Y Bea, no podemos tener vidas más similares, en todos los aspectos. Espero que algún día podamos compartir trabajo, o por lo menos ciudad. Es duro que una de tus mejores amigas viva tan lejos. Gracias a las cuatro por hacerme sentir tan especial. Y gracias a Marta, María, Andrea, Lara, Rebe, Julia, Ángel, Rubén, Alberto, Alfonso, Guille y Masha. Por vuestro interés en lo que hago, en cómo estoy y por animarme cuando lo necesito. En especial a Marta. Eres mi mejor amiga y con eso lo digo todo, no necesito adornarlo más. Y a María, no hay nadie que sea más humano y honesto que tú. Gracias a las dos por mantenerme en vuestro círculo.

Gracias a las personas más importantes de mi vida. Mi familia. A vosotros no os he podido elegir pero creo que no se puede ser más afortunado que yo al pertenecer a esta familia. Papá y mamá, me emociono solo con pensar en vosotros. Habéis luchado por nosotros y gracias a vosotros hemos superado momentos difíciles. Siento que a veces no demuestro toda la gratitud que siento hacia vosotros dos, porque aunque discutamos y muestre este carácter que sé que os desespera no lo hago por maldad y me duele haceros daño. Gracias por apoyarme incondicionalmente, por ayudarme a demostrar lo que valgo y por no dejar que nadie me pise. No sé lo que me deparara el futuro pero todo lo bueno que me ocurra se debe a vosotros. A Pati, esa persona que es hermana, amiga y mentora. Casi nunca te demuestro lo que me importas y lo que te quiero. Eres una persona por la que sentir admiración es casi obligado. Nunca me has fallado y espero que no sientas que yo lo he hecho. A Jandro, ¡qué diferentes somos! Las situaciones que hemos vivido me han llevado a admirarte como persona. Sin querer me has dado lecciones de la vida que me hacen valorarte más y más. Vosotros cuatro me hacéis sentir orgullosa de lo que soy porque lo que soy, o seré, o he sido, es por vosotros y gracias a vosotros. Os quiero.

Por supuesto hay más gente de mi familia a la que quiero dar las gracias. A los dos nuevos integrantes Diego y Miriam, gracias por hacer felices a mis hermanos. A mi abuela Marcela porque eres una luchadora nata y ejemplo a seguir. A mi *lala* Ufe, ya no estás aquí pero se te echa de menos. A mis abuelos Leoncio y Daniel, ya casi no me acuerdo de vosotros pero os doy las gracias por haber



creado a mis padres. A mis tíos Loli, Pilu y Luisito. Siempre os habéis preocupado por nosotros y sé que hemos sido como unos hijos. Y a ese enano llamado Álvaro que me alegra cada día.

Después de haber llorado a moco tendido por la emoción que siento al hablar de mi familia, quería agradecer a todas esas personas que, aunque no han estado involucradas directamente en el transcurso de esta tesis, sí lo han estado en mi vida. Personas que para bien o para mal me han ayudado a que me enfrente a la vida y, por consiguiente, a esta carrera de la que comienzo a ver la meta.



**A mis padres y hermanos**



*“¡No me digas lo que no puedo hacer!”*

John Locke, Perdidos



# ÍNDICE







|   |           |
|---|-----------|
| <b>ABREVIATURAS</b>   | <b>23</b> |
| <b>SUMMARY</b>  | <b>29</b> |
| <b>INTRODUCCIÓN</b>   | <b>33</b> |
| La ruta RalGDS/Ras  | 35        |
| ◆ La proteína RalGDS  | 36        |
| ◆ La proteína Ral   | 37        |
| Cáncer de colon asociado a inflamación                              | 40        |
| ◆ Cáncer e inflamación  | 40        |
| <i>¿Cómo se genera el ambiente inflamatorio en el tumor?</i>        | 40        |
| <i>La enfermedad inflamatoria intestinal</i>                        | 42        |
| <i>El cáncer colorrectal</i>  | 42        |
| ◆ La respuesta inmune en el tracto gastrointestinal                 | 43        |
| <i>Respuesta inmune innata</i>                                      | 43        |
| <i>Respuesta inmune adaptativa</i>                                  | 45        |
| ◆ RalGDS/Ral en cáncer e inflamación                                | 47        |
| <i>RalGDS/Ral en cáncer</i>   | 47        |
| <i>RalGDS/Ral en el sistema inmune</i>                              | 48        |
| <i>RalGDS/Ral como nexo entre cáncer e inflamación</i>              | 48        |
| La célula T y el timo   | 50        |
| ◆ Desarrollo de la célula T   | 50        |
| ◆ La cascada de señalización del receptor de células T              | 51        |
| ◆ RalGDS/Ral y la célula T  | 53        |
| <b>OBJETIVOS</b>  | <b>55</b> |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>   | <b>59</b> |
| <b>RESULTADOS</b>   | <b>71</b> |
| RalGDS en el desarrollo de tumores de colon asociados a inflamación | 73        |
| ◆ Efecto de la deficiencia de RalGDS en el epitelio del colon       | 76        |
| ◆ Efecto de la deficiencia de RalGDS en la inmunidad innata         | 79        |

|   |            |
|---|------------|
| RalGDS en el desarrollo de la célula T en el timo                             | 87         |
| ◆ El sistema inmune en ratones RalGDS <sup>-/-</sup>                          | 89         |
| ◆ Desarrollo de la célula T en el timo de ratones RalGDS <sup>-/-</sup> xOT-I | 90         |
| ◆ Estudio de la selección positiva en ratones RalGDS <sup>-/-</sup> xOT-I     | 94         |
| ◆ Análisis del papel de Ral en la expresión de membrana del receptor TCR-CD3  | 94         |
| ◆ Estudio de la selección negativa  | 97         |
| ◆ Análisis de la ruta de señalización del TCR                                 | 98         |
| <b>DISCUSIÓN</b>  | <b>101</b> |
| RalGDS en el desarrollo de tumores de colon asociados a inflamación           | 103        |
| RalGDS en el desarrollo de la célula T en el timo                             | 111        |
| <b>CONCLUSIONES</b>   | <b>115</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b>   | <b>119</b> |

|                  |   |           |
|------------------|---|-----------|
| <b>Tabla 1</b>   | Proteínas pertenecientes a la superfamilia Ras y sus funciones celulares  | <b>35</b> |
| <b>Tabla 2</b>   | Diferenciación de las células Th0   | <b>46</b> |
| <b>Tabla 3</b>   | Poblaciones de timocitos según la expresión de membrana de distintos marcadores   | <b>50</b> |
| <b>Tabla 4</b>   | Composición de los tampones utilizados  | <b>61</b> |
| <b>Tabla 5</b>   | Secuencias de los shRNAs de RalA y RalB utilizados en la infección de células Jurkat  | <b>61</b> |
| <b>Tabla 6</b>   | Anticuerpos utilizados en los experimentos de <i>Western blot</i>   | <b>63</b> |
| <b>Tabla 7</b>   | Criterios utilizados en la determinación del DAI de los experimentos de inflamación aguda del colon                         | <b>64</b> |
| <b>Tabla 8</b>   | Anticuerpos utilizados en citometría en el estudio del desarrollo de los timocitos  | <b>65</b> |
| <b>Tabla 9</b>   | Anticuerpos utilizados para determinar los infiltrados inflamatorios en el colon por citometría de flujo                    | <b>66</b> |
| <b>Tabla 10</b>  | Anticuerpos utilizados en las tinciones de inmunofluorescencia en las muestras de colon                                     | <b>67</b> |
| <b>Tabla 11</b>  | Secuencias de los oligonucleótidos usados en la qRT-PCR   | <b>68</b> |
| <b>Tabla 12</b>  | Expresión de las distintas RalGEFs en el epitelio de colon de ratón   | <b>78</b> |
| <b>Esquema 1</b> | Protocolo experimental usado en los ratones RalGDS-Villin-Cre para la inducción de tumores de colon asociados a inflamación | <b>77</b> |
| <b>Esquema 2</b> | Protocolo experimental utilizado para el ensayo de reconstitución de médula ósea  | <b>93</b> |



|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Figura 1</b>  | Ciclo GDP/GTP de las proteínas G pequeñas de la superfamilia Ras  | 35 |
| <b>Figura 2</b>  | Estructura de la proteína RalGDS  | 36 |
| <b>Figura 3</b>  | Alineamiento de las secuencias de las proteínas RalA y RalB de humano   | 37 |
| <b>Figura 4</b>  | Estructura de la proteína Ral y representación esquemática de los eventos intracelulares desencadenados tras la activación de Ral | 39 |
| <b>Figura 5</b>  | Rutas que conectan inflamación y cáncer   | 41 |
| <b>Figura 6</b>  | Activación de macrófagos  | 44 |
| <b>Figura 7</b>  | Desarrollo de la célula T en el timo  | 52 |
| <b>Figura 8</b>  | Cascada de señalización del TCR   | 53 |
| <b>Figura 9</b>  | DAI de la inflamación aguda en el colon de ratones RalGDS <sup>-/-</sup>  | 76 |
| <b>Figura 10</b> | DAI de la inflamación aguda en el colon de ratones RalGDS <sup>f/f</sup> /Villin-Cre <sup>-</sup>                                 | 77 |
| <b>Figura 11</b> | Experimento de inducción de tumores en el colon asociados a inflamación en ratones RalGDS <sup>f/f</sup> /Villin-Cre <sup>-</sup> | 78 |
| <b>Figura 12</b> | Activación de la GTPasa Ral en las criptas del colon de ratones RalGDS <sup>f/f</sup> /Villin-Cre <sup>-</sup>                    | 79 |
| <b>Figura 13</b> | DAI de la inflamación aguda en el colon de ratones RalGDS <sup>f/f</sup> /LysM-Cre <sup>-</sup>                                   | 80 |
| <b>Figura 14</b> | Tinción de H&E en los colones de ratones RalGDS <sup>f/f</sup> /LysM-Cre <sup>-</sup>   | 81 |
| <b>Figura 15</b> | Composición de los infiltrados inflamatorios en el colon de ratones RalGDS <sup>f/f</sup> /LysM-Cre <sup>-</sup>                  | 82 |
| <b>Figura 16</b> | Polarización hacia los fenotipos M1 y M2 en BMDM de ratones RalGDS <sup>f/f</sup> /LysM-Cre <sup>-</sup>                          | 83 |
| <b>Figura 17</b> | Choque séptico inducido por LPS en ratones RalGDS <sup>f/f</sup> /LysM-Cre <sup>-</sup>   | 83 |
| <b>Figura 18</b> | Tinción de IF de las enzimas iNOS y arginasa I en los colones de ratones RalGDS <sup>f/f</sup> /LysM-Cre <sup>-</sup>             | 84 |
| <b>Figura 19</b> | Experimento de inducción de tumores en el colon asociados a inflamación en ratones RalGDS <sup>f/f</sup> /LysM-Cre <sup>-</sup>   | 84 |

|                  |  |           |
|------------------|--|-----------|
| <b>Figura 20</b> | Composición de los infiltrados inflamatorios en el colon de ratones RalGDS <sup>-/-</sup>                                    | <b>85</b> |
| <b>Figura 21</b> | Experimento de inducción de tumores en el colon asociados a inflamación en ratones RalGDS <sup>-/-</sup>                     | <b>86</b> |
| <b>Figura 22</b> | Poblaciones linfoides de periferia de ratones RalGDS <sup>-/-</sup>  | <b>89</b> |
| <b>Figura 23</b> | Poblaciones en el timo de ratones RalGDS <sup>-/-</sup>  | <b>90</b> |
| <b>Figura 24</b> | Poblaciones hematopoyéticas de bazo de ratones RalGDS <sup>-/-</sup>   | <b>91</b> |
| <b>Figura 25</b> | Poblaciones hematopoyéticas de nódulos linfáticos de ratones RalGDS <sup>-/-</sup>   | <b>91</b> |
| <b>Figura 26</b> | Poblaciones en el timo de ratones RalGDS <sup>-/-</sup> xOT-I  | <b>92</b> |
| <b>Figura 27</b> | Poblaciones en el timo tras reconstitución con médula ósea de ratones RalGDS <sup>-/-</sup> xOT-I                            | <b>93</b> |
| <b>Figura 28</b> | Expresión de superficie de los marcadores de selección positiva CD5, CD69 y TCRβ-CD3ε en ratones RalGDS <sup>-/-</sup> xOT-I | <b>95</b> |
| <b>Figura 29</b> | Expresión total de CD3ε en ratones de ratones RalGDS <sup>-/-</sup> xOT-I  | <b>96</b> |
| <b>Figura 30</b> | Expresión de superficie de CD3ε en células Jurkat que expresan niveles disminuidos de RalA y RalB                            | <b>96</b> |
| <b>Figura 31</b> | Expresión de superficie de CD3ε en ratones de ratones RalGDS <sup>-/-</sup>  | <b>97</b> |
| <b>Figura 32</b> | Expresión de las regiones Vβ8, Vβ3, Vβ5 y Vβ11 en ratones BALB/c.RalGDS <sup>-/-</sup>                                       | <b>98</b> |
| <b>Figura 33</b> | Activación de las proteínas implicadas en selección positiva y negativa en ratones RalGDS <sup>-/-</sup> xOT-I               | <b>99</b> |

# ABREVIATURAS







|              |   |
|--------------|---|
| <b>AOM</b>   | azoximetano   |
| <b>AP-2</b>  | complejo de la proteína adaptadora 2                    |
| <b>APC</b>   | <i>adenomatous polyposis coli</i>                       |
| <b>APCs</b>  | células presentadoras de antígeno                       |
| <b>Arf</b>   | factor de ribosilación del ADP                          |
| <b>Bax</b>   | proteína parecida a Bcl-2                               |
| <b>Bak</b>   | antagonista homólogo de Bcl-2                           |
| <b>Bcl</b>   | proteína de linfoma B                                   |
| <b>BCR</b>   | receptor de células B                                   |
| <b>BMDM</b>  | macrófagos derivados de médula ósea                     |
| <b>BSA</b>   | suero fetal bovino                                      |
| <b>CAC</b>   | cáncer colorrectal asociado a colitis                   |
| <b>CaM</b>   | calmodulina   |
| <b>CCND1</b> | gen que codifica la ciclina D1                          |
| <b>CD</b>    | enfermedad de Crohn                                     |
| <b>CD_</b>   | grupo de diferenciación_                                |
| <b>Cdc42</b> | proteína de control del ciclo de la división celular 42 |
| <b>CM</b>    | medio condicionado                                      |
| <b>COX2</b>  | ciclooxigenasa 2  |
| <b>CRC</b>   | cáncer colorrectal                                      |
| <b>cTEC</b>  | célula epitelial tímica cortical                        |
| <b>CXCR4</b> | receptor de quimioquina tipo C-X-C                      |
| <b>DAG</b>   | diacilglicerol  |
| <b>DAI</b>   | índice de la actividad de la enfermedad                 |
| <b>D-Gal</b> | D-galactosamina   |
| <b>DMEM</b>  | <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>               |
| <b>DN</b>    | timocito doble negativo                                 |
| <b>DNA</b>   | ácido desoxirribonucleico                               |
| <b>DP</b>    | timocito doble positivo                                 |
| <b>DSS</b>   | dextran sulfato de sodio                                |
| <b>DTT</b>   | ditiotreitól  |
| <b>ECL</b>   | quimioluminiscencia amplificada                         |
| <b>EDTA</b>  | ácido etilendiaminotetraacético                         |
| <b>EGF</b>   | factor de crecimiento epidérmico                        |
| <b>EGTA</b>  | ácido etilenglicol-tetraacético                         |
| <b>EH</b>    | dominio de homología Eps15                              |
| <b>ERK</b>   | quinasa regulada por señales extracelulares             |

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| <b>ETP</b>                     | progenitores tímicos tempranos                               |
| <b>Exo</b>                     | proteína relacionada con la endocitosis                      |
| <b>FAP</b>                     | poliposis adenomatosa familiar                               |
| <b>FCS</b>                     | suero fetal de ternera                                       |
| <b>fMLP</b>                    | péptido formil-metil-leucina-fenilalanina                    |
| <b>GAP</b>                     | proteína activadora de la actividad GTPasa                   |
| <b>GEF</b>                     | factor de intercambio de nucleótidos de guanina              |
| <b>GDP</b>                     | guanosín difosfato   |
| <b>GPCR</b>                    | receptor acoplado a proteínas G                              |
| <b>Grb2</b>                    | proteína de unión al factor de crecimiento 2                 |
| <b>GST</b>                     | glutación S-transferasa                                      |
| <b>GTP</b>                     | guanosín trifosfato  |
| <b>GTPasa</b>                  | guanosín trifosfatasa  |
| <b>H&amp;E</b>                 | hematoxilina y eosina  |
| <b>HBSS</b>                    | solución salina equilibrada de <i>Hank</i>                   |
| <b>HIF1<math>\alpha</math></b> | factor inducible por hipoxia 1 $\alpha$                      |
| <b>HNPCC</b>                   | cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis       |
| <b>IBD</b>                     | enfermedad inflamatoria intestinal                           |
| <b>IEL</b>                     | linfocito intraepitelial                                     |
| <b>IF</b>                      | inmunofluorescencia  |
| <b>IFN</b>                     | interferón   |
| <b>Ig</b>                      | inmunoglobulina  |
| <b>IL</b>                      | interleuquina  |
| <b>iNOS</b>                    | sintasa inducible del óxido nítrico                          |
| <b>IP3</b>                     | inositol-1,4,5-trifosfato                                    |
| <b>IRF</b>                     | factor regulador de interferón                               |
| <b>ITAM</b>                    | motivo de activación basado en inmunorreceptores de tirosina |
| <b>JAK</b>                     | proteína quinasa activadora de <i>Janus</i>                  |
| <b>JNK</b>                     | proteína quinasa N-terminal c-jun                            |
| <b>LAT</b>                     | adaptador de la activación en la célula T                    |
| <b>Lck</b>                     | quinasa específica de linfocitos                             |
| <b>LPL</b>                     | linfocito de la lámina propia                                |
| <b>LPS</b>                     | lipopolisacárido   |
| <b>MAPK</b>                    | proteína quinasa activada por mitógenos                      |
| <b>M-CSF</b>                   | <i>macrophage colony-stimulating factor</i>                  |
| <b>MEK</b>                     | quinasa de las MAPK  |
| <b>MHC</b>                     | complejo mayor de histocompatibilidad                        |

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>MKK</b>                    | quinasa de las MAPK  |
| <b>mTEC</b>                   | célula epitelial tímica de la médula                                 |
| <b>NFAT</b>                   | factor nuclear de célula T activadas                                 |
| <b>NF<math>\kappa</math>B</b> | factor nuclear <i>kappa</i> B  |
| <b>NK</b>                     | célula <i>natural killer</i>   |
| <b>NSAIDs</b>                 | drogas antiinflamatorias no esteroideas                              |
| <b>PA</b>                     | ácido fosfatídico  |
| <b>PBMC</b>                   | células mononucleares de sangre periférica                           |
| <b>PBS</b>                    | tampón fosfato   |
| <b>PCNA</b>                   | antígeno nuclear de células en proliferación                         |
| <b>PDK1</b>                   | quinasa 1 dependiente de PI3K  |
| <b>PH</b>                     | dominio de homología a plekstrina                                    |
| <b>PI3K</b>                   | fosfatidilinositol-3-quinasa   |
| <b>PKA</b>                    | proteína quinasa A   |
| <b>PKC</b>                    | proteína quinasa C   |
| <b>PLC</b>                    | fosfolipasa C  |
| <b>PLD</b>                    | fosfolipasa D  |
| <b>PMN</b>                    | leucocito polimorfonuclear   |
| <b>PMSF</b>                   | fluoruro de p-metilsulfato   |
| <b>PRR</b>                    | receptor de reconocimiento de patrones                               |
| <b>Rab</b>                    | proteína relacionada con Ras en cerebro                              |
| <b>Raf</b>                    | factor asociado a Ras  |
| <b>Ral</b>                    | proteína similar a Ras   |
| <b>RalBP1</b>                 | proteína 1 de unión a Ral  |
| <b>RalGDS</b>                 | estimulador de la disociación de GDP en las proteínas Ral            |
| <b>RalGEF</b>                 | factor de intercambio de nucleótidos de guanina en las proteínas Ral |
| <b>RalGPS</b>                 | GEF de Ral con dominio PH  |
| <b>Ran</b>                    | proteína nuclear relacionada con Ras                                 |
| <b>Ras</b>                    | proteína de sarcoma de rata  |
| <b>RasGRP</b>                 | proteína liberadora de los nucleótidos de guanina de Ras             |
| <b>RBD</b>                    | dominio de unión a Ras   |
| <b>REM</b>                    | motivo de intercambio Ras  |
| <b>Rgl</b>                    | proteína parecida al factor de disociación de GDP                    |
| <b>Rho</b>                    | proteína homóloga de Ras   |
| <b>Rlf</b>                    | factor parecido a RalGDS   |
| <b>RLIP</b>                   | proteína lisosomal de interacción con Rab                            |
| <b>RNA</b>                    | ácido ribonucleico   |

|                        |   |
|------------------------|---|
| <b>RNS</b>             | especie reactiva de nitrógeno                                 |
| <b>ROS</b>             | especie reactiva de oxígeno                                   |
| <b>rpm</b>             | revoluciones por minuto                                       |
| <b>RT-PCR</b>          | reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real            |
| <b>S1P<sub>1</sub></b> | receptor 1 de esfingosina-1-fosfato                           |
| <b>Sec</b>             | proteína relacionada con la secreción                         |
| <b>SDS</b>             | dodecil sulfato sódico  |
| <b>SDS-PAGE</b>        | electroforesis en geles de poliacrilamida                     |
| <b>SEM</b>             | error estándar de la media                                    |
| <b>SH2</b>             | dominio de homología a Src 2                                  |
| <b>shRNA</b>           | <i>small hairpin</i> RNA                                      |
| <b>SI</b>              | sistema inmune  |
| <b>SLP76</b>           | proteína de leucocitos que contiene dominios de SH2 de 76 kDa |
| <b>SOS</b>             | proteína <i>son of Sevenless</i>                              |
| <b>SP</b>              | timocito de una sola positividad                              |
| <b>Src</b>             | proteína de sarcoma   |
| <b>STAT</b>            | transductor de señales y activadores de la transcripción      |
| <b>TBK</b>             | quinasa de unión a <i>Tank</i>                                |
| <b>TCR</b>             | receptor de células T   |
| <b>TGF</b>             | factor de crecimiento transformante                           |
| <b>Th</b>              | célula T cooperadora  |
| <b>TLR</b>             | receptor tipo <i>Toll</i>                                     |
| <b>TNF</b>             | factor de necrosis tumoral                                    |
| <b>Tris</b>            | Tris (hidroximetil) aminometano                               |
| <b>TSP</b>             | progenitor que alimenta al timo                               |
| <b>Treg</b>            | célula T reguladora   |
| <b>UC</b>              | colitis ulcerosa  |
| <b>ZAP70</b>           | proteína quinasa de 70 kDa asociada a la cadena $\zeta$       |
| <b>ZO1</b>             | proteína ZO1 de uniones estrechas                             |
| <b>ZONAB</b>           | factor asociado a la caja Y de ZO1                            |

# SUMMARY



RalGDS is one of the proteins that mediate the activation of the small G protein Ral downstream of the Ras GTPase. Ral has several functions in oncogenesis and vesicle transport and it also participates in different processes within the immune system. Cancer and inflammation are two processes highly related in several diseases, such as colitis-associated cancer. Our aim in this project was to analyze the role of the RalGDS/Ral pathway in colitis-associated cancer studying the effects in colon carcinogenesis and in colon inflammation. Here, we show that RalGDS regulates colitis-associated cancer by modulating colon inflammation. Our results demonstrate that RalGDS participates in colon acute inflammation through different cells in different stages of the disease. RalGDS is necessary for the inflammatory response in early stages of the colon inflammation probably acting through the CD4<sup>+</sup> T cells of the lamina propria. However, RalGDS is also essential in myeloid cells for the resolution of the colon inflammation. Our research shows new data about the importance of the RalGDS/Ral pathway in an *in vivo* model of inflammation-associated cancer.

Additionally to this study, we have also analyzed the function of the protein RalGDS in the development of the T cell in the thymus. Previous work in our group has demonstrated that Ral GTPases, activated by RalGDS protein, regulate cell-mediated cytotoxicity in NK cells and CD8<sup>+</sup> cells. Our aim was to analyze the role of the RalGDS/Ral pathway in the functionality of the T cell and its development in the thymus. Here we show that the lack of RalGDS provokes a defect in positive and negative selection during thymocyte development. This developmental block does not result in fewer cells in periphery due to compensatory mechanisms. The absence of RalGDS is affecting the TCR signaling pathway. Our research shows an unknown role for the protein RalGDS in the development of the T cell.





# INTRODUCCIÓN



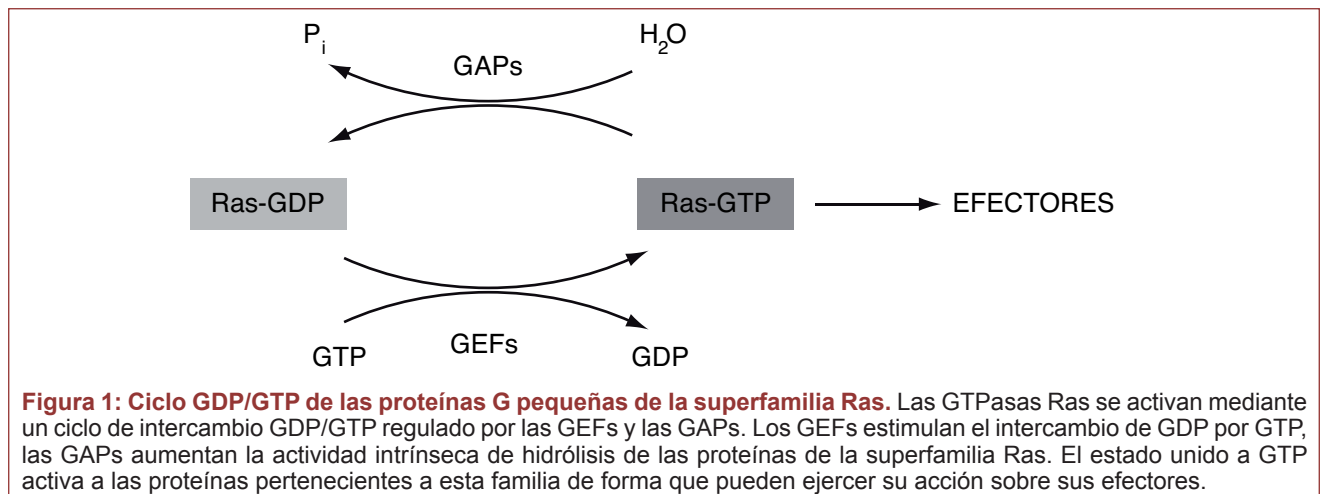
## La ruta RalGDS/Ral

La superfamilia Ras de proteínas G pequeñas o GTPasas está compuesta por más de un centenar de proteínas con capacidad de unión a nucleótidos de guanina. Tienen un tamaño pequeño, de entre 20 y 30 kDa y se clasifican en cinco familias: Ras, Rho, Arf, Rab y Ran. Participan en numerosos procesos, indicados en la **tabla 1**.

| Familia    | Miembros   | Función celular  |
|------------|--|--|
| <b>Ras</b> | H-Ras, K-Ras, M-Ras, N-Ras, R-Ras, Rheb, RalA, RalB, Rap1, Rap2, TC21, Rin, Rit                      | Ciclo celular, apoptosis, exocitosis                             |
| <b>Rho</b> | RhoA, RhoB, RhoC, RhoD, RhoE, RhoG, RhoH, Rac1, Rac2, Rac3, cdc42, Rnd1, Rnd2, RIF, CHP, WRCH1, TC10 | Ciclo celular, apoptosis, regulación del citoesqueleto de actina |
| <b>Arf</b> | Arf1- Arf6   | Transporte vesicular, regulación del citoesqueleto de actina     |
| <b>Rab</b> | Rab1 - Rab63   | Transporte vesicular   |
| <b>Ran</b> | Ran  | Importación nuclear  |

**Tabla 1: Proteínas pertenecientes a la superfamilia Ras y sus funciones celulares.** Adaptado de Oxford *et al.*, 2003.

Estas proteínas G pequeñas tienen alta afinidad de unión por guanosín difosfato (GDP) y guanosín trifosfato (GTP) y muestran actividades bajas de hidrólisis de GTP y de intercambio de GDP/GTP. Las proteínas GEFs (factores de intercambio de nucleótidos de guanina) estimulan el intercambio de GDP por GTP (Cherfils *et al.*, 1999). Las proteínas GAPs (proteínas activadoras de la actividad GTPasa) aumentan la actividad intrínseca de hidrólisis de GTP (Donovan *et al.*, 2002). Ambas regulan el ciclo de activación de las GTPasas de la superfamilia Ras (**figura 1**). La unión a GTP provoca cambios en la disposición espacial de las regiones *Switch I* y *Switch II* de las proteínas G pequeñas facilitando la interacción con moléculas efectoras. La región *Switch I* es el principal sitio de unión del efector y la *Switch II* interacciona con los GEFs. Por lo general, al estado unido a GTP se le denomina estado activo ya que se encuentra más asociado con localizaciones de membrana que el estado unido a GDP (Oxford *et al.*, 2003; Wennerberg *et al.*, 2005).

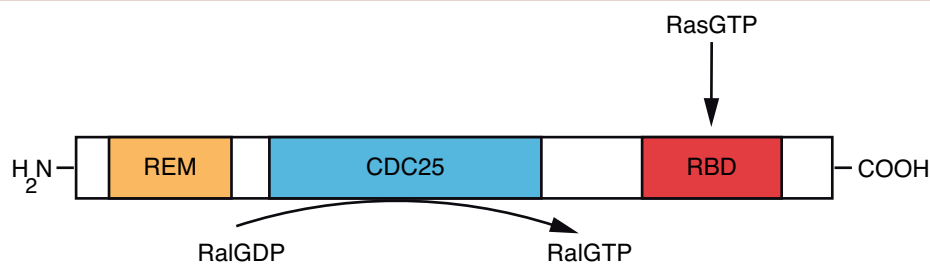


**Figura 1: Ciclo GDP/GTP de las proteínas G pequeñas de la superfamilia Ras.** Las GTPasas Ras se activan mediante un ciclo de intercambio GDP/GTP regulado por las GEFs y las GAPs. Los GEFs estimulan el intercambio de GDP por GTP, las GAPs aumentan la actividad intrínseca de hidrólisis de las proteínas de la superfamilia Ras. El estado unido a GTP activa a las proteínas pertenecientes a esta familia de forma que pueden ejercer su acción sobre sus efectores.

Dentro de esta superfamilia, las proteínas más estudiadas han sido las de la familia de Ras debido sobre todo a su importancia en el cáncer humano. Se expresan de forma ubicua y se localizan en la parte interna de la membrana plasmática. Diversas señales procedentes de la activación de receptores asociados o con actividad intrínseca tirosina quinasa, de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y de segundos mensajeros, como calcio o diacilglicerol, activan a Ras (Bos, 1998). La activación de Ras produce la consecuente activación de las proteínas efectoras pertenecientes a la familia Raf, a la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y a los factores de intercambio de nucleótidos de guanina de las proteínas Ral (RalGEFs). La serina-treonina quinasa Raf es el efector de Ras más caracterizado. La cascada de señalización Raf/MEK/ERK tiene un papel principal en proliferación y supervivencia. PI3K es un heterodímero compuesto por la subunidad reguladora p85 y la subunidad catalítica p110. Ras activa a este complejo uniéndose directamente a p110. La activación de PI3K provoca la activación de Akt que está implicado en numerosos procesos celulares como crecimiento celular, proliferación, diferenciación, motilidad, supervivencia y tráfico intracelular. Las RalGEFs son las proteínas encargadas de conectar a Ras con la proteína G pequeña Ral (Wolthuis *et al.*, 1999).

### ◆ La proteína RalGDS

RalGDS (estimulador de la disociación de GDP en la proteína Ral) es una de las proteínas intercambiadoras de nucleótidos de guanina en las proteínas Ral, RalGEFs, junto con Rgl, Rgl2/Rlf (Rlf es la homóloga de Rgl2 en ratón) y Rgl3. Todos los miembros de la familia RalGEFs comparten una estructura común: un dominio central de homología CDC25, un motivo de intercambio Ras (REM) en el extremo N-terminal y un dominio de unión a Ras (RBD) en el extremo C-terminal (**figura 2**). Estos dominios caracterizan a las RalGEFs: actúan como intercambiadores de nucleótidos de guanina gracias al dominio CDC25 y median la interacción entre Ras y Ral a través del RBD. En estado basal, RalGDS se encuentra en una conformación cerrada donde el extremo N-terminal, probablemente a través de REM, se asocia al dominio catalítico bloqueando su actividad GTPasa (Ferro *et al.*, 2010).



**Figura 2: Estructura de la proteína RalGDS.** La proteína RalGDS contiene tres dominios estructurales: un dominio central CDC25, un dominio de intercambio Ras, REM, en el extremo N-terminal y un dominio de unión a Ras, RBD, en el extremo C-terminal. Estos dominios son los responsables de la interacción entre las proteínas G pequeñas Ras y Ral (adaptado de Ferro *et al.*, 2010).

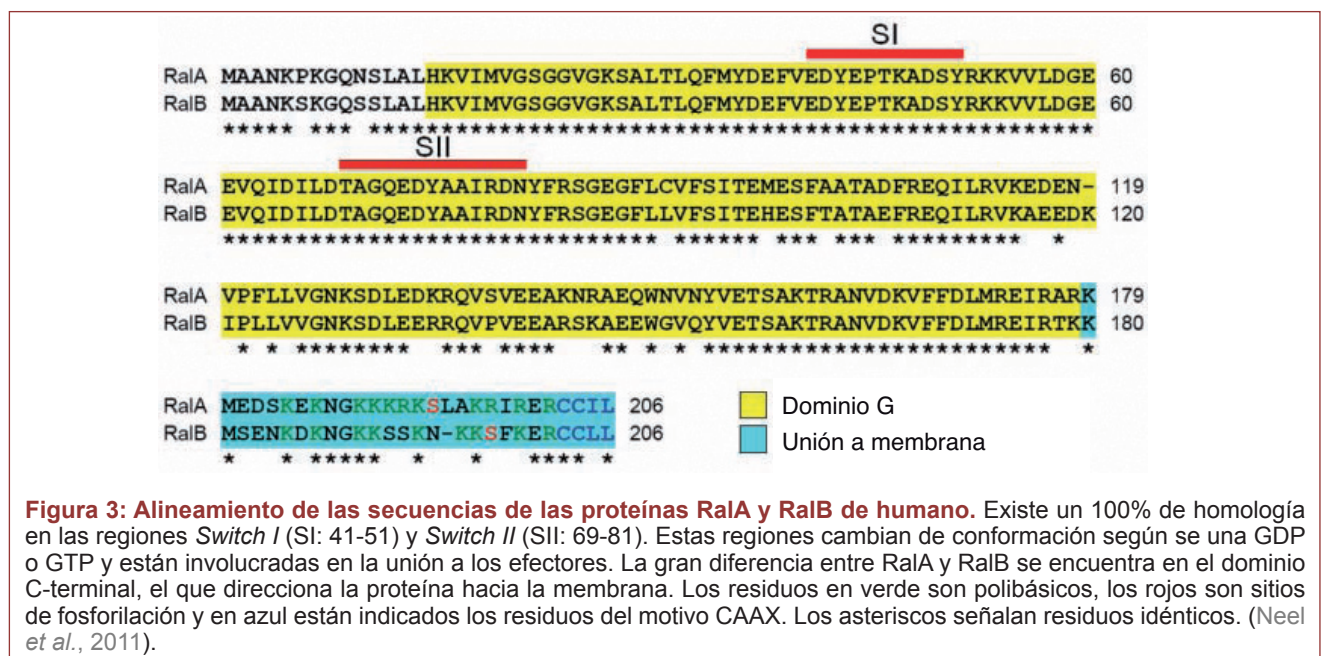
La interacción entre Ras-GTP y RalGDS no produce ningún cambio conformacional en RalGDS ni aumenta su actividad GTPasa intrínseca, tan solo provoca su translocación a la membrana donde se encuentra Ral (Kishida *et al.*, 1997; Matsubara *et al.*, 1999). El aumento de la actividad GTPasa de RalGDS se produce tras la activación de PI3K, otro de los efectores de Ras. El extremo N-terminal de la quinasa 1 dependiente de PI3K (PDK1) se asocia con el extremo N-terminal de RalGDS liberando al dominio catalítico de RalGDS e incrementando su actividad GTPasa intrínseca (Tian *et al.*, 2002). Por lo tanto, la activación de RalGDS se produce como consecuencia de su translocación a membrana, involucrando a RBD, y del incremento de su actividad GTPasa provocado por la ruta de señalización Ras/PI3K/PDK1, involucrando a la región N-terminal. PKC actúa como regulador negativo de la activación de RalGDS a través de la fosforilación del dominio N-terminal, de forma que éste no se disocia del dominio catalítico (Rusanescu *et al.*, 2001).

La proteína RalGDS también puede activarse de forma independiente de Ras. El complejo RalGDS/ $\beta$ -arrestina se encuentra en forma inactiva en el citoplasma. Esta interacción no incluye a los dominios CDC25 y RBD. La estimulación de las células con el péptido formil-metil-leucina-fenilalanina (fMLP) provoca la disociación de este complejo, permitiendo la translocación de RalGDS a la membrana y la asociación de  $\beta$ -arrestina a los GPCRs unidos con fMLP (Bhattacharya *et al.*, 2002).

Otras RalGEFs como RalGPS1 y RalGPS2 no contienen RBD por lo que no se activan directamente por Ras. En su lugar tienen dominios de homología a pleckstrina y existen evidencias de su activación por fosfolípidos o por la proteína adaptadora Grb2 (Neel *et al.*, 2011).

### ◆ La proteína Ral

Existen dos genes de Ral, RalA y RalB, localizados en los cromosomas 2 y 7 respectivamente. Las proteínas codificadas tienen la misma organización estructural y comparten aproximadamente un 85% de la secuencia proteica (Neel *et al.*, 2011; **figura 3**).



**Figura 3: Alineamiento de las secuencias de las proteínas RalA y RalB de humano.** Existe un 100% de homología en las regiones *Switch I* (SI: 41-51) y *Switch II* (SII: 69-81). Estas regiones cambian de conformación según se una GDP o GTP y están involucradas en la unión a los efectores. La gran diferencia entre RalA y RalB se encuentra en el dominio C-terminal, el que direcciona la proteína hacia la membrana. Los residuos en verde son polibásicos, los rojos son sitios de fosforilación y en azul están indicados los residuos del motivo CAAX. Los asteriscos señalan residuos idénticos. (Neel *et al.*, 2011).

En la **figura 4** se muestra la disposición de los distintos dominios de Ral. Al extremo N-terminal se une una fosfolipasa D, PLD, o fosfolipasa C- $\delta$ 1, PLC- $\delta$ 1. El extremo C-terminal contiene un sitio de unión a calmodulina y un motivo CAAX de modificaciones geranyl-geranyl. El resto de la proteína es un dominio GTPasa que incluye motivos de unión a GTP (motivos I a IV). Las regiones *Switch I* y *Switch II* median las interacciones dependientes de GTP con las proteínas efectoras. Tras la unión de GTP, los mayores cambios conformacionales se producen en las regiones *Switch* (van Dam *et al.*, 2006).

Las proteínas Ral se expresan de forma ubicua aunque son más abundantes en testículos, cerebro y trombocitos. Pueden ser activadas de tres formas distintas: a través de su ciclo GDP/GTP regulado por distintas GEFs y GAPs, a través de la unión de calmodulina y a través de la fosforilación de residuos de serina (van Dam *et al.*, 2006). En RalA, la quinasa Aurora A fosforila la serina 194 (Wu *et al.*, 2005) y la quinasa PKA la serina 183 (Wang *et al.*, 2010). En RalB, la quinasa PKC se encarga de la fosforilación de la serina 198 (Wang *et al.*, 2010).

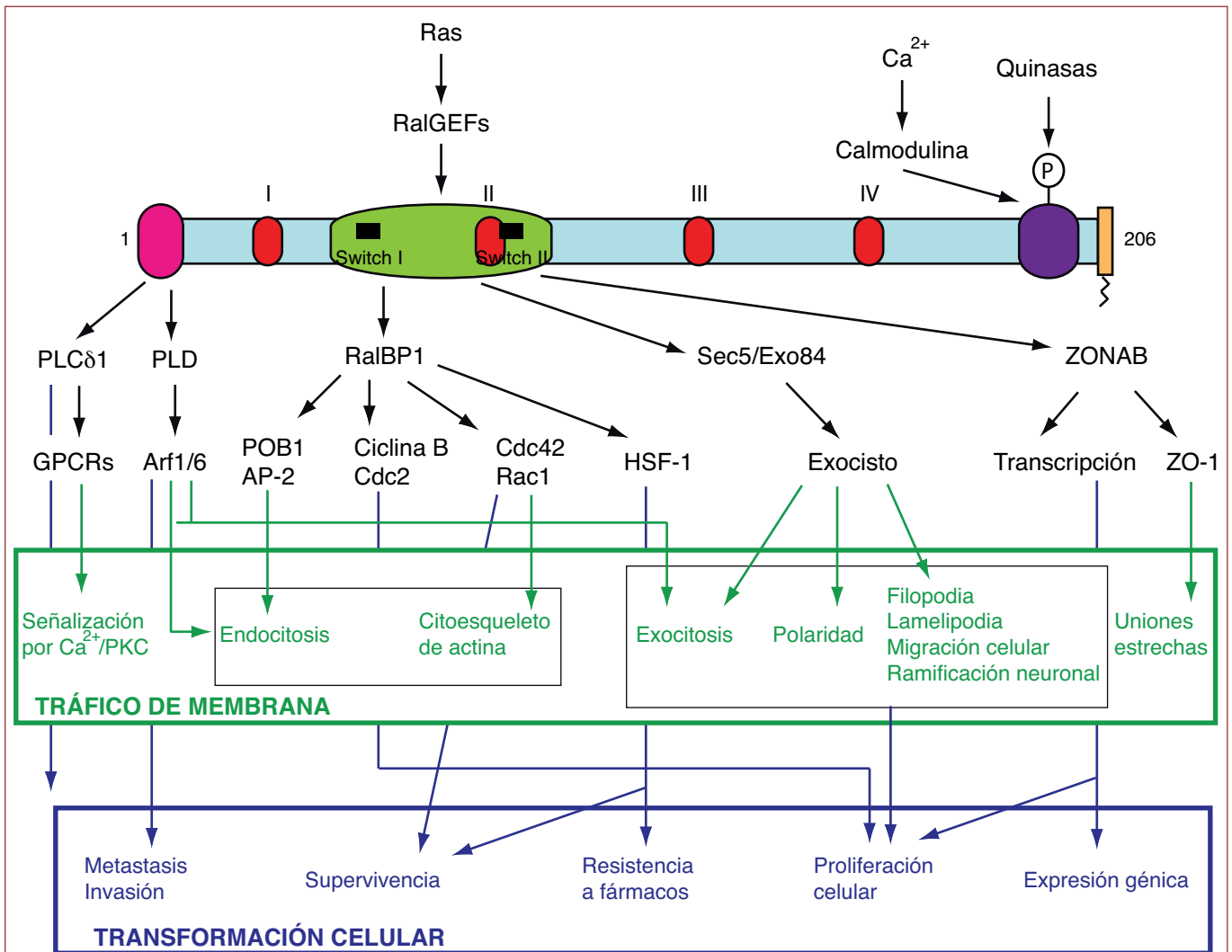
Se conocen como efectores de Ral aquellos que se unen de forma dependiente de GTP en la zona

de interacción con los efectores. Estos efectores son RalBP1, el exocisto y ZONAB. Calmodulina, PLD y PLC- $\delta$ 1 son proteínas de unión a Ral independientes de GTP (van Dam *et al.*, 2006).

- RalBP1 o RLIP (proteína 1 de unión a Ral; proteína lisosomal de interacción con Rab). Contiene un dominio GAP que aumenta la actividad GTPasa de Cdc42 y Rac1, ambos relacionados con el reordenamiento del citoesqueleto. RalBP1 interactúa con proteínas relacionadas con la endocitosis. A través de su región N-terminal se une al complejo adaptador AP-2 que forma parte de los procesos de endocitosis mediada por clatrina. Su región C-terminal se asocia con proteínas que contienen dominios EH, como REPS1 y REPS2, que son fosforiladas en respuesta a la estimulación con el factor de crecimiento epidérmico EGF y que se encargan de la endocitosis de receptores. Además, la interacción entre RalBP1 y la región N-terminal de Epsin provoca la migración celular e invasión (Mott *et al.*, 2010).
- Exocisto. El exocisto es un complejo multiproteico responsable del apropiado direccionamiento y anclaje de vesículas secretoras a dominios específicos de la membrana, incluyendo la superficie basolateral de células epiteliales, sitios de formación de sinapsis, plano de abscisión mitótica, etc. Ral interactúa directamente con Exo84 y Sec5, dos de las ocho subunidades del exocisto, y promueve el ensamblaje y función del complejo. La unión Ral-exocisto es esencial en el mantenimiento de la polaridad, movilidad y citoquinesis de la célula. En ausencia de Ral el ensamblaje o estabilidad del exocisto se reduce (Moskalenko *et al.*, 2002).
- Factor de transcripción *Y-box* ZONAB. Es una proteína asociada a las uniones estrechas. En cultivos epiteliales de baja densidad ZONAB se encuentra en el núcleo y participa en la activación de genes que promueven la progresión del ciclo celular como CCND1 o PCNA. La formación de uniones estrechas entre células epiteliales permite a ZO1 reclutar a ZONAB a la membrana impidiendo la transcripción de genes (Bodemann *et al.*, 2008). El aumento de la densidad celular redistribuye a RalA a la membrana para unirse a ZONAB regulando así el ciclo celular y la proliferación (Frankel *et al.*, 2005).
- Calmodulina. Es el mayor regulador en las rutas de señalización dependientes de calcio. RalA y RalB se unen a CaM de forma dependiente de calcio. Esta unión requiere prenilación de la caja CAAX en el extremo C-terminal de Ral. La presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y CaM aumenta la unión de GTP a Ral. La activación de Ral mediada por CaM tiene efectos sobre la exocitosis regulada (van Dam *et al.*, 2006).
- PLD. PLD hidroliza fosfatidilcolina a ácido fosfatídico, PA, y colina. El PA es un segundo mensajero en una gran cantidad de eventos de señalización, incluido el transporte vesicular. Ral se une a PLD de forma independiente de GTP pero no tiene efectos directos sobre su activación. Colabora en la unión de otra proteína G pequeña, Arf1 o Arf6, que activan a PLD. Los principales efectos de la activación de PLD mediada por Ral son la endocitosis y la exocitosis (van Dam *et al.*, 2006).
- PLC- $\delta$ 1. La familia PLC hidroliza fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato a los segundos mensajeros inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). Tanto RalA como RalB se unen y activan a PLC- $\delta$ 1 sin el requerimiento de Arf (Sidhu *et al.*, 2005).

A través de todos estos efectores y proteínas de unión a Ral, Ral regula procesos de transporte vesicular y oncogénesis. Estos procesos se resumen en la **figura 4**. Se ha observado que RalA y RalB tienen distintas funciones (Neel *et al.*, 2011) que se explicarán más adelante. Esta diferente funcionalidad se debe a la diferente localización subcelular de ambas proteínas ya que son idénticas al 100% en los residuos relacionados en la interacción con los efectores. Mientras que RalA se encuentra en la membrana plasmática y en endosomas, RalB se localiza principalmente asociado a endosomas. La localización subcelular de Ral está regulada tanto por su activación como por su fosforilación y

esta diferente distribución subcelular permite a RalA y a RalB ejercer funciones distintas teniendo los mismos efectores.



**Figura 4: Estructura de la proteína Ral y representación esquemática de los eventos intracelulares desencadenados tras la activación de Ral.** Las proteínas Ral contienen 4 motivos de unión a GTP e hidrólisis (marcados del I al IV) conservados en todas las GTPasas. Los aminoácidos en el extremo N-terminal unen PLCδ1 y PLD1. La zona de interacción con los efectores (zona verde de la estructura, contiene las regiones *Switch I* y *Switch II*) une las dianas RalBP1, las subunidades Sec5 y Exo84 del exocisto y ZONAB. Al extremo C-terminal se une calmodulina y se encuentran los sitios susceptibles de fosforilación. Ral se activa por RalGEFs, por Ca<sup>2+</sup> y por diversas quinasas. Las proteínas efectoras de Ral (RalBP1, Sec5, Exo84 y ZONAB) y las proteínas de unión a Ral (calmodulina, PLD y PLCδ1) activan diversas rutas intracelulares relacionadas con el tráfico de membrana (verde) y la transformación celular (azul) (adaptado de van Dam *et al.*, 2006).

## Cáncer de colon asociado a inflamación

### ◆ Cáncer e inflamación

Existen numerosos estudios epidemiológicos y moleculares que relacionan el cáncer y la inflamación a través de las siguientes observaciones (Mantovani *et al.*, 2008):

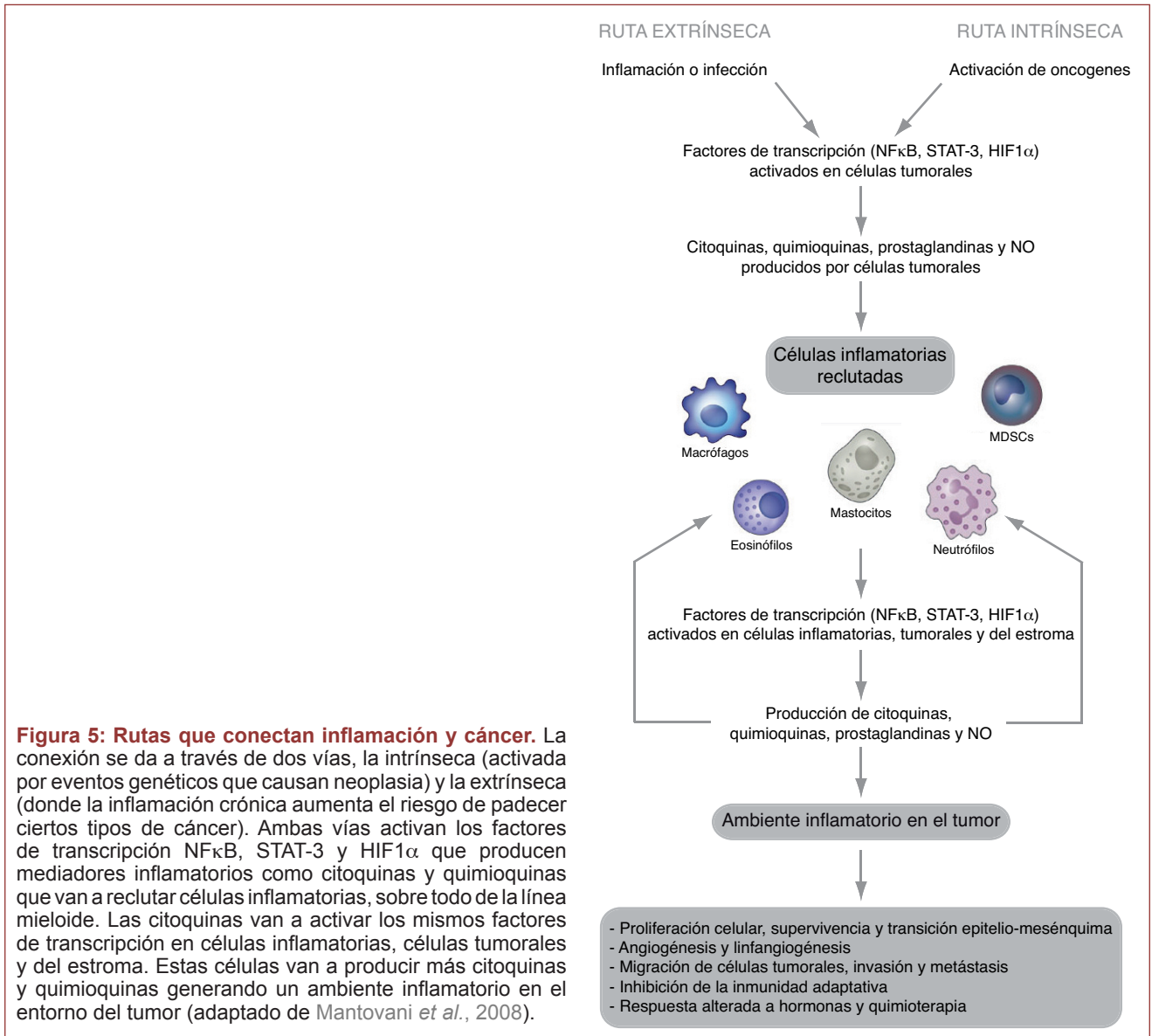
- Las enfermedades inflamatorias aumentan el riesgo de desarrollar distintos tipos de cáncer como de vejiga, cervical, gástrico, intestinal, esofágico, ovárico, de próstata y de tiroides.
- Las drogas antiinflamatorias no esteroideas, NSAIDs, reducen el riesgo de padecer ciertos tipos de cáncer, como el de colon o el de mama, y reducen la mortalidad causada por estas enfermedades.
- Las rutas de señalización relacionadas con la inflamación operan bajo mutaciones oncogénicas, como en los genes *RAS*, *MYC* o *RET*.
- Las células inflamatorias, quimioquinas y citoquinas están presentes en todos los tumores en estadios tempranos de desarrollo.
- Las terapias que utilizan como dianas los mediadores inflamatorios (como  $TNF\alpha$  o  $IL1\beta$ ), los factores de transcripción involucrados en inflamación (como  $NF\kappa B$  o  $STAT-3$ ) o células inflamatorias disminuyen la incidencia y expansión del cáncer.
- La sobreexpresión de citoquinas inflamatorias y la transferencia adoptiva de células inflamatorias fomentan el desarrollo de tumores.

La conexión cáncer-inflamación se da a través de dos posibles vías, intrínseca y extrínseca. La vía intrínseca se activa por eventos genéticos que causan neoplasia, como por ejemplo activación de oncogenes por mutaciones, reordenamientos cromosómicos o inactivación de genes supresores de tumores. Las células así transformadas producen mediadores inflamatorios, generando un ambiente inflamatorio en tumores que inicialmente no tienen causa inflamatoria, como ocurre en los tumores de mama. En la vía extrínseca, las condiciones inflamatorias o infecciosas preexistentes aumentan el riesgo de padecer cáncer en ciertos órganos como el colon, páncreas o próstata. Ambas vías convergen resultando en la activación de factores de transcripción, principalmente  $NF\kappa B$ ,  $STAT3$  y  $HIF1\alpha$  en los tumores. Estos factores de transcripción coordinan la producción de mediadores inflamatorios, incluyendo citoquinas, quimioquinas, prostaglandinas y óxido nítrico que reclutan y activan leucocitos, sobre todo de la línea mieloide. Las citoquinas activan los factores de transcripción que acabamos de mencionar en las células inflamatorias, las estromales y las del tumor, amplificando la respuesta y produciendo más mediadores inflamatorios que contribuyen al desarrollo del tumor a través de distintos mecanismos que incluyen inducción de inestabilidad genómica, alteración de eventos epigenéticos y consecuente expresión génica inadecuada, aumento de proliferación y resistencia a apoptosis, inducción de angiogénesis y remodelación tisular con consecuente invasión de células tumorales y metástasis (figura 5).

### ¿Cómo se genera el ambiente inflamatorio en el tumor?

En los procesos de inflamación, los neutrófilos y eosinófilos son los primeros efectores reclutados. Los monocitos, que se diferencian hacia macrófagos, migran a las zonas dañadas guiados por factores quimiotácticos. Una vez activados, los macrófagos son la principal fuente de factores de crecimiento y citoquinas que afectan a las células endoteliales, epiteliales y mesenquimales. Las infecciones





persistentes inducen inflamación crónica. Los leucocitos y otras células fagocíticas de esta inflamación crónica generan especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, ROS y RNS. Estas especies reactivas forman peroxinitritos, agentes mutagénicos que al interactuar con el DNA en el epitelio proliferante originan alteraciones genómicas permanentes como mutaciones, deleciones y reordenamientos. En los tejidos inflamados no hay apoptosis o programas de reparación resultando en la replicación del DNA y proliferación de células que han perdido el control de crecimiento normal. La inflamación normal está autolimitada porque la producción de citoquinas antiinflamatorias sigue a las proinflamatorias, sin embargo, en la inflamación crónica persisten los factores iniciadores o hay un fallo en los mecanismos requeridos para resolver la inflamación. Las quimioquinas son factores solubles que regulan la migración direccional de leucocitos durante estados de inflamación. Se ha observado que los tejidos neoplásicos también generan estos factores quimiotácticos. El componente inflamatorio de una neoplasia en desarrollo incluye una población diversa de leucocitos: neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, eosinófilos, mastocitos y linfocitos. Todos son capaces de producir una gran cantidad de citoquinas, ROS y RNS, metaloproteínas de matriz y otros mediadores solubles como TNFα, interleuquinas e interferón, lo que desemboca en la persistencia de un microambiente rico en agentes genotóxicos, factores de crecimiento y metaloproteasas que favorecen el desarrollo tumoral (Coussens *et al.*, 2002).

El 15-20% de las muertes asociadas a cáncer en el mundo están relacionadas con procesos

inflamatorios como infecciones microbianas, enfermedades autoinmunes o inflamaciones crónicas (Balkwill *et al.*, 2001). La inflamación crónica del intestino, como la que se da en la enfermedad inflamatoria intestinal, está asociada con el desarrollo de cáncer colorrectal.

### ***La enfermedad inflamatoria intestinal***

La enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) es un grupo de enfermedades genéticas complejas caracterizadas por una innecesaria o exagerada respuesta inmune inflamatoria a la flora microbiana residente en la luz del tracto intestinal. Dentro de esta enfermedad se encuentran la colitis ulcerosa (UC) y la enfermedad de Crohn (CD). La UC es una enfermedad inflamatoria no transmural que se restringe al colon. La CD, por el contrario, es transmural y puede afectar a cualquier parte del tracto gastrointestinal, desde la boca al ano (Baumgart, 2009). Los factores ambientales y el tipo de vida influyen en el desarrollo de IBD y su incidencia ha aumentado en el sur de Europa, Asia y países en desarrollo en los últimos años (Molodecky *et al.*, 2012). La IBD suele aparecer en la segunda o tercera década de la vida y acaba siendo una enfermedad crónica.

Las superficies mucosas son interfaces físicas del sistema inmune con el mundo exterior. Todo el tracto intestinal está protegido por mucosa y contiene tejido linfoide asociado a mucosa. Hospeda flora microbiana compuesta por más de 500 especies de bacterias. Esta flora microbiana tiene funciones esenciales para el intestino como la absorción de nutrientes, la fortificación de la barrera mucosa, el metabolismo de xenobióticos, la angiogénesis y la maduración intestinal post-natal (Baumgart *et al.*, 2007). El equilibrio entre la flora microbiana y la respuesta de defensa del huésped en la barrera intestinal tiene un papel principal en el inicio y patogénesis de IBD. Cuando los patógenos cruzan esta barrera se genera una respuesta inflamatoria. La IBD se origina cuando la respuesta de defensa es exagerada. Puede deberse a varias causas: presencia de patógenos persistentes, defectos en la barrera intestinal, inapropiadas respuestas inmunes a antígenos normales o fallo en el silenciamiento de la respuesta inmune una vez que el patógeno se ha eliminado (McGuckin *et al.*, 2009).

Diversos estudios en pacientes que sufren IBD en cualquiera de sus dos vertientes, UC o CD, han dado a conocer que K-Ras se encuentra mutado en estas enfermedades (Lyda *et al.*, 2000; Heinzlmann *et al.*, 2002).

### ***El cáncer colorrectal***

El intestino grueso es la parte final del aparato digestivo. Está formado por el ciego, el colon y el recto. El colon se divide anatómicamente en ascendente, transversal, descendente y sigmoide, aunque histológicamente no es posible distinguirlos. La función del colon es la de absorber agua y electrolitos y almacenar y propulsar los residuos fecales para la evacuación (Irving *et al.*, 1992).

El cáncer colorrectal, CRC, es el tercer tipo de cáncer más diagnosticado y la tercera causa de muerte en los Estados Unidos (Siegel *et al.*, 2012). La población susceptible de sufrir CRC es la formada por adultos de más de 50 años y suele afectar más a hombres que a mujeres. Su incidencia ha disminuido en los últimos años debido a la detección precoz, en cambio ha aumentado en adultos menores de 50 años ya que éstos no entran dentro del grupo de riesgo. La mortalidad también ha disminuido gracias a la mejora en la prevención, detección y tratamiento. CRC produce metástasis en hígado, pulmones, cavidad abdominal y ovarios.

Existen diversos tipos de CRC según la causa que los origine (Kraus *et al.*, 2009). En el CRC hereditario se incluye el cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis (HNPCC o síndrome de

Lynch) y la poliposis adenomatosa familiar (FAP). El HNPCC se debe a la inestabilidad genómica y la FAP a mutaciones en el gen APC. El CRC puede tener causa inflamatoria, donde se encuentra la IBD. Se denomina CRC asociado a colitis (CAC). Y por último, también se encuentra el CRC esporádico que está definido por la secuencia adenoma-carcinoma de Fearon y Vogelstein (Fearon *et al.*, 1990). En esta secuencia los tumores colorrectales son resultado de la activación de oncogenes e inactivación de genes supresores de tumores; son necesarias al menos cuatro o cinco mutaciones para la transformación maligna; y la acumulación total de las alteraciones prevalece sobre su aparición cronológica y determina las características biológicas del tumor.

A diferencia del CRC esporádico, el CAC no sigue la secuencia adenoma-carcinoma de Fearon y Vogelstein. Los eventos moleculares que definen cada tipo de CRC ocurren en distinto orden temporal. Por ejemplo, la pérdida de función de APC es un evento temprano en el CRC esporádico, mientras que en CAC es un evento tardío. Las mutaciones en p53 ocurren de forma tardía en el CRC esporádico mientras que son eventos tempranos en CAC. K-Ras se encuentra mutado tanto en CRC esporádico como en CAC y está relacionado con la progresión de adenomas a carcinomas (Rogler, 2013).

El riesgo de desarrollar CAC correlaciona positivamente con la severidad y duración de la inflamación que se produce en IBD (Rogler, 2013).

## ◆ La respuesta inmune en el tracto gastrointestinal

El sistema inmune (SI) del intestino recibe diariamente una enorme carga antigénica y es capaz de distinguir entre patógenos invasivos y antígenos inocuos procedentes de los alimentos y de la flora bacteriana (Mowat, 2003). La correcta interacción entre el SI innato (caracterizado por las respuestas inflamatorias de los granulocitos y macrófagos) y el SI adaptativo (caracterizado por las respuestas de los linfocitos) conduce a la homeostasis intestinal (Roberts-Thompson *et al.*, 2011).

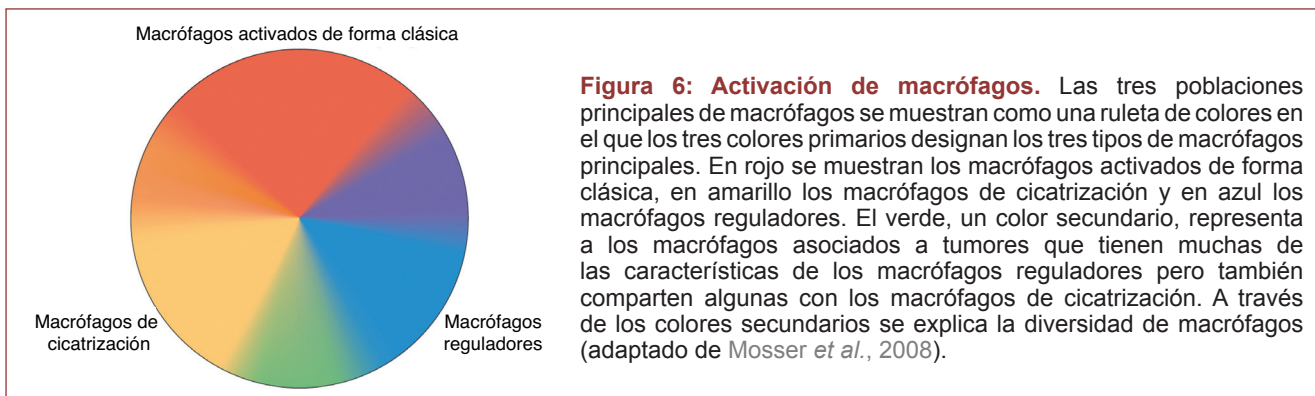
### *Respuesta inmune innata*

En el intestino, el componente innato del SI debe responder de forma rápida y efectiva a la invasión por parte de los patógenos sin provocar daños a la flora bacteriana o al huésped. Sus componentes principales son la barrera epitelial, las células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos), las células NKs, el ácido gástrico y las proteínas del intestino y del plasma como el complemento (Roberts-Thompson *et al.*, 2011). En IBD, la respuesta innata del SI se relaciona con la iniciación de la inflamación intestinal (Waldner *et al.*, 2009).

**Barrera epitelial:** es la primera línea de defensa del SI. El epitelio intestinal está recubierto de mucosa donde reside la flora microbiana y tiene un papel protector ya que restringe el paso de las bacterias (McGuckin *et al.*, 2009). Se han observado defectos en la mucosa en personas con UC y CD (Buisine *et al.*, 2001; Smithson *et al.*, 1997). Las uniones estrechas entre las células epiteliales del intestino también ejercen un papel en la protección impidiendo a los patógenos atravesar la barrera (Rescigno, 2013). Además, personas que padecen IBD tienen perforada la barrera epitelial (Soderholm *et al.*, 2002).

**Macrófagos:** están presentes en todos los tejidos pero el tracto gastrointestinal contiene el mayor número de ellos (Sheikh *et al.*, 2010). Se diferencian de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) que migran al tejido en estado basal o en respuesta a la inflamación. Las PBMCs proceden de un progenitor común mieloide de la médula ósea que también es precursor de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células dendríticas y mastocitos. Los monocitos migran de la sangre al tejido para reponer los macrófagos específicos de larga vida del tejido.

Los macrófagos son células fagocíticas que limpian los restos celulares generados por células que han entrado en apoptosis o tras remodelación tisular. Estos procesos de fagocitosis son independientes de la activación del SI. Los macrófagos, además, tienen una función dependiente del SI en la cual responden a estímulos endógenos tempranos que se producen tras una infección o daño. Los macrófagos se caracterizan por su plasticidad, que depende del estímulo y de lo que éste dure en el tiempo, y su heterogeneidad. Una vez en los tejidos, los macrófagos adquieren propiedades funcionales y morfológicas dirigidas por el tejido y el ambiente inmunológico. Se designan como macrófagos M1, o activados de forma clásica, y macrófagos M2, o activados de forma alternativa. Los macrófagos M2 incluyen cualquier tipo de macrófago que no sea M1, lo que origina un grupo de macrófagos M2 con características bien distintas. En la **figura 6** se muestra una clasificación más apropiada que refleja la plasticidad de los macrófagos (Mosser *et al.*, 2008).



### *Macrófagos activados de forma clásica o M1*

La exposición a  $IFN\gamma$  y  $TNF\alpha$  origina una población de macrófagos con capacidad microbicida o tumoricida elevada que secretan niveles elevados de citoquinas proinflamatorias, aniones superóxido y radicales de oxígeno y nitrógeno. Todo ello aumenta su capacidad de destrucción. El  $IFN\gamma$  está producido de forma transitoria por células NK y de forma más prolongada por células Th1, que mantienen a los macrófagos activos. Aunque estas células Th1 son específicas de antígeno, los macrófagos que inducen destruyen de forma indiscriminada. Los macrófagos M1 secretan citoquinas proinflamatorias, como  $TNF\alpha$ , IL1 o IL6, que son importantes en la defensa del huésped pero pueden ser nocivas. En la funcionalidad de los macrófagos M1 son importantes los TLRs, que activan factores de transcripción como STAT (tras la activación del receptor de  $IFN\gamma$ ),  $NF\kappa B$  y MAPK (tras la activación de TLR y del receptor de TNF). Este tipo de macrófagos aparecen en enfermedades autoinmunes como IBD. Si no se regulan bien, los macrófagos M1 producen daño en el tejido y predisponen a la transformación neoplásica (Mantovani *et al.*, 2007; Mosser *et al.*, 2008).

### *Macrófagos de cicatrización*

Pertencen al grupo de los macrófagos de activación alternativa o M2. Se desarrollan en respuesta a señales innatas o adaptativas, siendo IL4 una de estas señales. La producción temprana de IL4 convierte rápidamente a los macrófagos en una población capaz de promover la cicatrización. La IL4 estimula la actividad arginasa en los macrófagos permitiendo convertir arginina en ornitina, un precursor de poliaminas y colágeno que contribuye a la producción de la matriz extracelular. La respuesta Th2 es la primera inducida en alteraciones en las superficies mucosas como en el intestino. Esta respuesta genera IL4 e IL13 que provoca que los macrófagos fallen en la presentación de antígeno a la célula T, produzcan pocas citoquinas proinflamatorias y sean menos eficientes que los macrófagos M1 en producir ROS y RNS o en la destrucción de patógenos intracelulares. Los macrófagos de cicatrización secretan componentes de la matriz extracelular y expresan moléculas tipo chitinasa, como Ym1/2, con capacidad de unión a matriz, de ahí su función en la cicatrización. Estos macrófagos pueden provocar

fibrosis debido a actividades de regeneración de matriz desregulada y respuestas alérgicas exacerbadas (Mosser *et al.*, 2008).

### *Macrófagos reguladores*

También pertenecen al grupo de los macrófagos de activación alternativa o M2. Se activan en respuesta al sistema inmune innato y adaptativo y al estrés. Aparecen en los estadios tardíos de respuestas adaptativas para silenciar la respuesta inmune y limitar la inflamación a través de la producción de grandes cantidades de IL10, su característica más importante. La IL10 inhibe la producción y actividad de citoquinas proinflamatorias, lo que hace que los macrófagos reguladores sean potentes inhibidores de la inflamación. Disminuyen la producción de IL12, por lo que la relación IL10/IL12 define a los macrófagos reguladores (Mosser *et al.*, 2008). Además, la producción de la citoquina reguladora TGFβ por los macrófagos, tras la fagocitosis de células apoptóticas en presencia de estímulos proinflamatorios, contribuye a su función inmunorreguladora (Fadok *et al.*, 1998).

**Células NK:** son células efectoras del SI innato. Eliminan las células diana induciendo su apoptosis a través de dos vías: por exocitosis de granzima y perforina o por receptores de muerte (Martín-Fontecha *et al.*, 2004). En el intestino muestran un fenotipo diferente a las del resto del organismo y recuerdan a las células cooperadoras ya que promueven las respuestas contra los patógenos y mantienen el epitelio intestinal (Sanos *et al.*, 2010). Para su activación, las células NK necesitan IFNγ, IL15 e IL18 y producen IFNγ y TNFα (Sanos *et al.*, 2010).

Las células NK se encuentran elevadas en la mucosa inflamada de pacientes con IBD y su diferenciación está elevada en la lámina propia (Steel *et al.*, 2011). En IBD, las células NK del intestino muestran alteraciones en su activación y diferenciación que influye en la patogénesis de esta enfermedad (Ng *et al.*, 2009; Steel *et al.*, 2011; Shimamoto *et al.*, 2007).

**Células dendríticas:** son células presentadoras de antígeno (APCs). Presentan el espectro completo de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que son capaces de reconocer componentes microbianos específicos como lipopolisacárido, peptidoglicano, etc. Los PRRs les permiten distinguir entre la flora microbiana y los patógenos del intestino. Su función está regulada por su localización, número y estado de maduración. Analizan antígenos, muestran un fenotipo inmaduro e inducen la no respuesta de la célula T por estimulación de la diferenciación de las células Th0 a células Treg más que a Th1 o Th2, manteniendo la tolerancia a la flora microbiana. En IBD, las células dendríticas reconocen incorrectamente a la flora bacteriana e inducen una respuesta proinflamatoria tipo efectora. Esto podría deberse a una respuesta inapropiada de los PRRs (Baumgart *et al.*, 2007).

**Neutrófilos:** también llamados leucocitos polimorfonucleares (PMNs). Son los primeros sensores de la mucosidad intestinal. Actúan al comienzo de la inflamación destruyendo los patógenos invasores a través de su fagocitosis. Secretan la enzima mieloperoxidasa que produce ácido hipocloroso que oxida DNA, proteínas y lípidos. En IBD su reclutamiento y activación están aumentados y su infiltración correlaciona con la severidad de la enfermedad (Knutson *et al.*, 2013).

### ***Respuesta inmune adaptativa***

El SI adaptativo proporciona la respuesta inmunológica y es responsable de la memoria inmunológica. Se divide en dos tipos celulares: las células T, que organizan una respuesta mediada por células que luchan directamente contra los microbios intracelulares; y las células B, que generan una respuesta mediada por anticuerpos y protegen de microbios extracelulares y otras toxinas (Roberts-Thompson *et al.*, 2011). En IBD, el SI adaptativo interviene en el establecimiento y mantenimiento de la inflamación crónica (Waldner *et al.*, 2009).

**Células T cooperadoras (CD4+):** se denominan células Th. Muestran diversos fenotipos según el factor de diferenciación que estimule a la célula naïve (Th0) y el perfil de citoquinas que presenten (**tabla 2**).

| Célula T | Factor de diferenciación             | Citoquinas secretadas       |
|----------|--------------------------------------|-----------------------------|
| Th1      | IL12                                 | INF $\gamma$ , TNF $\alpha$ |
| Th2      | IL4                                  | IL4, IL5, IL13              |
| Th17     | IL23, IL6, TGF $\beta$ , IL1 $\beta$ | IL17A, IL17F, IL22          |
| Treg     | TGF $\beta$ , ácido retinoico        | IL10, TGF $\beta$           |
| Tr1      | IFN $\alpha$                         | IL10                        |

**Tabla 2: Diferenciación de las células Th0.** Las células T naïve o Th0 diferencian a células que promueven la inflamación (Th1, Th2 y Th17) y células que suprimen la inflamación (Treg y Tr1) (adaptado de Roberts-Thompson *et al.*, 2011).

Las células CD4+ tienen un papel principal en el mantenimiento de la inflamación crónica en IBD. El perfil Th2 es característico de UC dominado por la producción de TGF $\beta$  e IL5, mientras que el perfil Th1 se encuentra más asociado a CD con una producción característica de IFN $\gamma$  e IL2. La activación de APCs como células dendríticas o la estimulación directa de PRRs promueve la diferenciación a Th1 o Th2 (dependiendo de si es CD o UC). Los productos de estas células T efectoras activan a los macrófagos que producen citoquinas como TNF $\alpha$ , IL1 o IL6 que van a reclutar otras células del SI en el intestino provocando la inflamación crónica (Podolsky, 2002).

Las células Th17 también son importantes en la patogénesis de IBD. Parece que tienen diversas funciones como la eliminación de patógenos extracelulares que no han sido controlados de forma adecuada por células Th1 y Th2. Pero también tienen funciones proinflamatorias amplificando las respuestas inflamatorias (Roberts-Thompson *et al.*, 2011). Actualmente sus funciones en IBD no están claras.

**Células T citotóxicas (CD8+):** contribuyen a la inflamación intestinal a través de la expresión de perforina y granzima A que provoca la apoptosis de las células dianas. Aumentos en la infiltración de células CD8+ y expresión elevada de estas enzimas se encuentran en la mucosa intestinal de estados activos de UC y CD (Müller *et al.*, 1998). Además la expresión de perforina se correlaciona con daño tisular en UC (Souza *et al.*, 2005).

**Células T reguladoras (Treg):** derivan de las células Th0 y su función es la supresión de respuestas inmunes inapropiadas. Influyen sobre las células T efectoras produciendo IL10 o TGF $\beta$  cuyo papel es esencial en el mantenimiento de la homeostasis. También generan citoquinas antiinflamatorias (Gibson *et al.*, 2013). En IBD el balance entre células Th efectoras y Treg está desregulado y se encuentran valores bajos de Treg mientras que las Th17 están muy aumentadas (Eastaff-Leung *et al.*, 2010).

**Células T  $\gamma\delta$ :** los linfocitos intraepiteliales del tracto gastrointestinal están compuestos fundamentalmente por células T  $\gamma\delta$  (Kunisawa *et al.*, 2007). Su función se centra en promover la regeneración del epitelio dañado (Komano *et al.*, 1995) y controlar el paso de la flora bacteriana tras haberse producido un daño en el epitelio (Ismail *et al.*, 2009).

**Células B:** en condiciones normales, las células B secretan IgA que recubre el epitelio intestinal. La producción de grandes cantidades de IgA, que se une al antígeno de la flora microbiana, es una estrategia para mantener la protección inmunológica sin causar inflamación (Chorny *et al.*, 2010).

## ◆ **RalGDS/Ral en cáncer e inflamación**

### *RalGDS/Ral en cáncer*

La proteína oncogénica Ras ejerce sus funciones sobre tres rutas efectoras distintas, las Raf quinasas, PI3K y las RalGEFs, que activan a las GTPasas RalA y RalB. Esta última ruta ha sido la menos estudiada. Los primeros experimentos demostraron que mutantes de Ras que unen específicamente RalGEFs, pero no Raf quinasas o PI3K, promueven el crecimiento independiente de anclaje en líneas celulares humanas de fibroblastos, células epiteliales y astrocitos. En cambio, mutantes de Ras que unen exclusivamente Raf quinasas o PI3K, y no RalGEFs, no tienen este efecto, demostrando que Ras también ejerce sus funciones oncogénicas a través de esta ruta menos conocida (Hamad *et al.*, 2002).

Ral tiene niveles de activación crónica en tumores humanos en donde prevalecen las mutaciones en Ras como el páncreas (Lim *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2006; Vigil *et al.*, 2010), colon (Martin *et al.*, 2011), pulmón (Male *et al.*, 2012), carcinoma de células escamosas (Sowalsky *et al.*, 2010), y también en tumores no asociados a mutaciones en Ras como los de vejiga (Wang *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2007) y próstata (Yin *et al.*, 2007). Se ha observado que las mutaciones en Ral no son comunes, por lo que los efectos oncogénicos vienen a través de un cambio en su actividad, ya sea por aumento de la expresión de las GEFs (Osei-Sarfo *et al.*, 2011) o por disminución de la actividad de las GAPs (Saito *et al.*, 2013).

Los experimentos específicos sobre la pérdida de función de las isoformas de Ral indican que RalA es necesaria para la proliferación independiente de anclaje de células transformadas y RalB es esencial en la supervivencia de varias líneas tumorales (Chien *et al.*, 2003). Estos experimentos coinciden con otros realizados en células humanas (Lim *et al.*, 2006). Por tanto, ambas isoformas colaboran en el mantenimiento de la transformación oncogénica a través de la proliferación y de la supervivencia. Estudios realizados en líneas celulares humanas de vejiga y próstata (Oxford *et al.*, 2005) demuestran que RalB tiene un papel promigratorio mientras que RalA no tiene ningún efecto sobre la migración. Esto se puede explicar a través de la diferente localización de estas GTPasas. Aunque tienen los mismos efectores, la diferente distribución subcelular hace que se produzcan diferentes interacciones con los efectores de forma que ejercen funciones distintas.

Nuestro grupo está interesado en el estudio del cáncer colorrectal. En CRC, Ras actúa a través de la ruta RalGEF/Ral si la mutación se encuentra en K-Ras (Martin *et al.*, 2011) que es uno de los oncogenes más mutados en CRC (Markowitz *et al.*, 2009). Tanto RalA como RalB tienen altos niveles de activación en líneas celulares derivadas de CRC y en muestras humanas (Martin *et al.*, 2011). En CRC, RalA promueve el crecimiento independiente de anclaje y RalB lo suprime, teniendo un papel opuesto a RalA (Martin *et al.*, 2011) y desconocido hasta ese momento.

La mayoría de los estudios realizados para averiguar las funciones oncogénicas de la ruta RalGDS/Ral han sido hechos en líneas celulares. El grupo de C.J. Marshall ha generado ratones deficientes tanto en RalGDS como en RalA y RalB. Los ratones deficientes en RalGDS en un modelo animal de carcinogénesis dependiente de Ras desarrollan menos tumores y de menor tamaño que los ratones control (González-García *et al.*, 2005). Recientemente, este mismo grupo ha generado ratones deficientes en RalA y RalB y ha estudiado su implicación en el carcinoma de pulmón dependiente de K-Ras, observando que cualquiera de las dos isoformas es suficiente para el crecimiento tumoral y la delección de las dos isoformas bloquea la formación de tumores (Peschard *et al.*, 2012), demostrando que en el carcinoma de pulmón RalA y RalB tienen funciones redundantes.

### *RalGDS/Ral en el sistema inmune*

La GTPasa Ras está implicada en una gran variedad de procesos biológicos, entre los que se incluye el funcionamiento del sistema inmune. Tanto las células T como las B son altamente dependientes de la activación de Ras. En las células T, Ras promueve principalmente la maduración de los timocitos en estadios tempranos (Swan *et al.*, 1995; Swat *et al.*, 1996) y controla la producción de IL2 en linfocitos periféricos (Baldari *et al.*, 1992; Rayter *et al.*, 1992). Su activación constitutiva aumenta la respuesta primaria al antígeno en las células T (Crespi *et al.*, 2002). Esta alta dependencia de la célula T con Ras se explica a través de la rápida activación de Ras tras la estimulación del receptor de células T, TCR (Downward *et al.*, 1990). Ras ejerce todos estos efectos a través de sus tres rutas efectoras, las Raf quinasas, PI3K y las RalGEFs.

A continuación se muestran evidencias del papel desempeñado por RalGDS o por las GTPasas Ral en diversos aspectos del sistema inmune:

- RalB media la interacción entre TBK1 y Sec5. TBK1 es una quinasa con un papel central en la inmunidad innata en respuesta a infecciones por virus. Tanto RalB como Sec5 son necesarias para montar la respuesta de defensa y su función es dependiente de TBK1 (Chien *et al.*, 2006).
- Ras regula la diferenciación mieloide a través de las RalGEFs y no a través de Raf o PI3K (Omidvar *et al.*, 2006).
- RalA se activa bajo la estimulación del receptor de células B, BCR, en linfocitos B y esta activación es dependiente de Ras (de Gorter *et al.*, 2007).
- RalA y RalB están implicadas en la regulación de la fagocitosis en macrófagos. Actúan como moduladores de la fagocitosis ejerciendo funciones opuestas lo que se explica por la diferente interacción, de nuevo, con sus efectores. RalA favorece la fagocitosis a través de la activación de PLD mientras que RalB la regula de forma negativa (Corrotte *et al.*, 2010).
- Ambas GTPasas son necesarias en la citotoxicidad mediada por las células NKs para el ensamblaje del exocisto y para la secreción de los gránulos líticos. Además, RalA regula la polarización de la maquinaria lítica a la sinapsis inmunológica (Sánchez-Ruiz *et al.*, 2011).

### *RalGDS/Ral como nexo entre cáncer e inflamación*

Existen diversas moléculas que se consideran nexos entre cáncer e inflamación ya que intervienen en ambos procesos. Entre esas moléculas se encuentran NFκB, STAT3 y TBK1. Diversos estudios demuestran que la GTPasa Ral está involucrada en la funcionalidad de las tres.

**NFκB:** juega un papel principal en la inmunidad innata y en la inflamación y se le considera el nexo principal entre cáncer e inflamación. Tanto en el sistema inmune innato como en las células malignas, NFκB lidera la expresión de citoquinas inflamatorias, moléculas de adhesión, factores angiogénicos y enzimas como iNOS y COX2, que son importantes en la síntesis de mediadores inflamatorios (Porta *et al.*, 2009). Como funciones celulares, NFκB inhibe la apoptosis y estimula la proliferación celular además de la migración e invasión, lo que la hace importante en la progresión tumoral (DiDonato *et al.*, 2012).

En modelos específicos de tumores asociados a inflamación crónica como el CAC se ha demostrado que NFκB ejerce su función antiapoptótica en las células epiteliales intestinales a través de la inducción de Bcl. Además, su activación en los macrófagos de la lámina propia estimula la proliferación de las células epiteliales intestinales a través de la secreción de factores de crecimiento (Greten *et al.*, 2004).



La activación de la GTPasa Ral induce la activación de NFκB. Estos efectos se producen de forma independiente de RalBP1 y PLD1 (Henry *et al.*, 2000).

**STAT3:** forma parte de muchas rutas de señalización oncogénicas. Miembros de la familia de la IL6 activan la ruta JAK/STAT que interviene en respuestas biológicas como la respuesta inmune, la inflamación, la hematopoyesis o la oncogénesis. STAT3 tiene un papel principal transmitiendo las señales desde la membrana al núcleo (Hirano *et al.*, 2000). En CAC, la deficiencia de IL6 conduce a una disminución en la multiplicidad y tamaño de los tumores debido a los efectos de la IL6 mediados por STAT3 en proliferación y supervivencia (Grivennikov *et al.*, 2009).

La activación de la tirosina quisasa Src por la GTPasa Ral es esencial en la fosforilación de STAT3 inducida por EGF o IL6 (Goi *et al.*, 2000).

**TBK1:** es una quinasa que fosforila el factor de transcripción IRF3 en respuesta a infecciones por virus (Fitzgerald *et al.*, 2003; McWhirter *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2003). Tanto IRF3 como su homólogo IRF7 están implicados en la transformación oncogénica (Lubyova *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004) y se ha observado que TBK1 está activado de forma crónica en diversas líneas tumorales. Su función se centra en mantener la supervivencia celular y apoya la transformación oncogénica mediada por Ras (Chien *et al.*, 2006).

La activación de RalB promueve el ensamblaje de TBK1 con Sec5, lo que aumenta la actividad quinasa de TBK1 (Chien *et al.*, 2006).

Ral regula la activación de estas tres proteínas que son tres nexos fundamentales entre la inflamación y el cáncer. Por ello, creemos que la ruta RalGDS/Ral puede regular la formación de tumores asociados a inflamación mediante efectos intrínsecos en las células tumorales regulando su crecimiento o supervivencia y/o efectos extrínsecos en el microambiente tumoral regulando la inflamación tisular.

## La célula T y el timo

El timo es el órgano linfoide primario donde se generan las células T. Las células T son un arma esencial del sistema inmune para responder frente a infecciones. Hay una gran diversidad debido a la composición de su receptor que puede ser  $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$ , a la especificidad de antígeno y al potencial efector. La mayoría de las células T son  $\alpha\beta$ . Se encuentran en los órganos linfoides y reaccionan frente a péptidos presentados por los complejos de histocompatibilidad principales (MHC) de clase I y II. Las células T  $\gamma\delta$  no están restringidas por MHC y son mucho menos comunes que las  $\alpha\beta$  (Carpenter *et al.*, 2010). Se encuentran en abundancia en la mucosa del tracto gastrointestinal. El desarrollo de la célula T en el timo puede dividirse en tres grandes pasos: colonización tímica, divergencia de linajes  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$  y diferenciación total de las células  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$  para que adquieran propiedades inmunológicas y funciones efectoras.

Anatómicamente el timo se divide en una corteza externa donde tiene lugar la diferenciación de las células T y una médula interna donde las células terminan el proceso de maduración antes de salir del timo y llegar a los órganos linfoides secundarios (Ceredig *et al.*, 2002). El timo tiene un ambiente esencial para el desarrollo de las células T a partir de células madre hematopoyéticas. Estos progenitores multipotentes salen de la médula ósea y, según van al timo, son más restrictivos en sus opciones de destino.

### ◆ Desarrollo de la célula T

El desarrollo de los timocitos se sigue a través de la expresión de ciertos marcadores de superficie como son los co-receptores CD4 y CD8, las cadenas de CD3 y de TCR, y las moléculas de superficie CD44, CD25, CD117 y CD27 (**tabla 3**).

| Población     | Marcadores   |                                      |
|---------------|--|--------------------------------------|
| <b>DN</b>     | CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup>  |                                      |
| <b>DN1</b>    | CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD44 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup>                  |                                      |
| <b>DN2</b>    | CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD44 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>                  |                                      |
| <b>DN2a</b>   | CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD44 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD117 alto       |                                      |
| <b>DN2b</b>   | CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD44 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD117 intermedio |                                      |
| <b>DN3</b>    | CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD44 <sup>-</sup> CD25 <sup>+</sup>                  |                                      |
| <b>DN3a</b>   | CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD44 <sup>-</sup> CD25 <sup>+</sup> CD27 bajo        |                                      |
| <b>DN3b</b>   | CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD44 <sup>-</sup> CD25 <sup>+</sup> CD27 alto        |                                      |
| <b>DN4</b>    | CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD44 <sup>-</sup> CD25 <sup>-</sup>                  | DN: células dobles negativas.        |
| <b>DP</b>     | CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> TCRb intermedio                                      | DP: células dobles positivas.        |
| <b>CD4 SP</b> | CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>  | SP: células de una sola positividad. |
| <b>CD8 SP</b> | CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>  |                                      |

**Tabla 3: Poblaciones de timocitos según la expresión de membrana de distintos marcadores.**

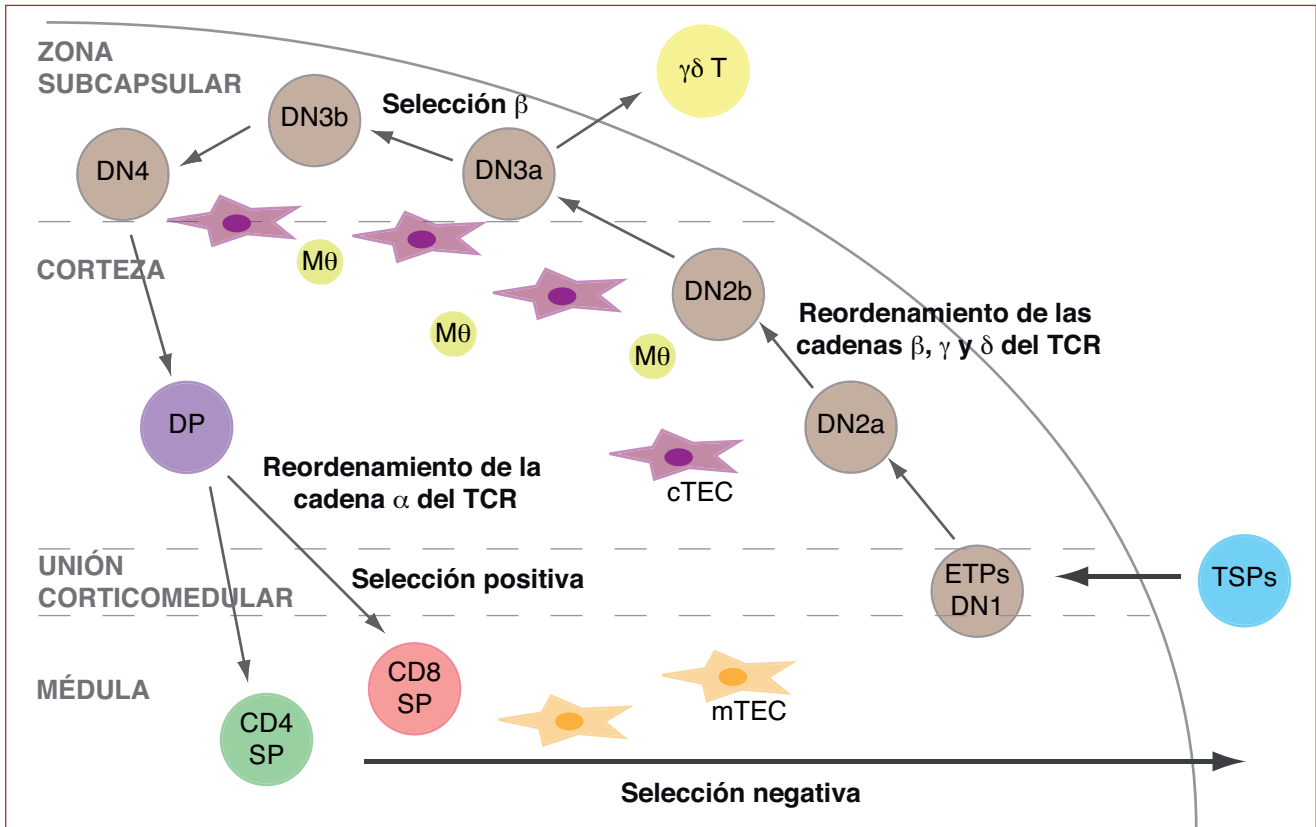
Los progenitores que alimentan al timo (TSPs) llegan a éste y una vez que encuentran el epitelio tímico pasan a ser progenitores tímicos tempranos (ETPs). Los ETPs todavía no están comprometidos hacia ningún linaje, pueden generar células NK, células dendríticas, células mieloides y células B, aunque el potencial para generar estas últimas es muy pequeño. Son células DN1 y tienen una expresión alta de CD117. Son los progenitores más eficientes en generar células T y residen en la

unión corticomedular del timo. Las células DN1 abandonan la unión corticomedular y migran hacia la zona subcapsular a través de la corteza donde reciben señales estimuladoras de células epiteliales tímicas corticales (cTECs) y fibroblastos diferenciándose a DN2. Esta población está caracterizada por el inicio del reordenamiento de las cadenas  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  del TCR. La IL7 es importante para la accesibilidad del locus de TCR $\gamma$ . Se ha visto que niveles altos de la cadena  $\alpha$  del receptor de IL7 dirigen al linaje  $\gamma\delta$  mientras que niveles bajos del mismo se encuentran en células  $\alpha\beta$ . La población DN2 se divide en dos subpoblaciones, DN2a y DN2b, según la expresión de CD117, alta o intermedia respectivamente. El paso de DN2 a DN3 se da en la zona subcapsular y se produce la especificación  $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$ . Los timocitos DN3 continúan reordenando las cadenas  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  para expresar TCRs funcionales. Las células  $\gamma\delta$  correctamente formadas salen del timo mientras que las  $\alpha\beta$  siguen su desarrollo de DN3a (con expresión de CD27 baja) a DN3b (con expresión de CD27 alta). En este momento se produce un punto de control llamado selección  $\beta$ . La selección  $\beta$  requiere que los precursores  $\alpha\beta$  señalicen a través de un preTCR funcional. Este preTCR consiste en una cadena  $\beta$  correctamente ordenada, las cadenas de CD3 y una cadena pT $\alpha$  invariante. Pasado el estadio DN3, los timocitos maduran hacia la población DN4 y viajan hasta llegar a la médula. En su paso por la corteza expresan los correceptores CD4 y CD8 tras la señalización por el preTCR adquiriendo el estado DP. Comienza el reordenamiento de la cadena  $\alpha$  del TCR. La especificidad y unión fuerte de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR, correctamente ensamblados, con los ligandos de MHC determinan la supervivencia y diferenciación de los timocitos DP. Estos timocitos interactúan con complejos MHC de péptidos propios presentados por cTECs (Kisielow *et al.*, 1988; Berg *et al.*, 1989) y entran en selección positiva. Si los TCRs no interactúan con los MHC y, por tanto, no señalizan a través del TCR, mueren por falta de estimulación. Aproximadamente el 90% de los timocitos DP mueren en este proceso. Los timocitos supervivientes, que expresan TCRs restringidos por MHC propios, silencian la expresión de uno de los dos correceptores pasando a ser CD4 SP o CD8 SP. Estas células SP migran hacia la médula y entran en selección negativa donde se eliminan los timocitos SP cuyos TCRs tienen gran afinidad por antígenos propios presentados por las células epiteliales tímicas de la médula (mTECs) y por las células dendríticas que han migrado de la periferia al timo (Gallegos *et al.*, 2004), reduciéndose la posibilidad de generar células T autorreactivas. Las células resultantes expresan el receptor 1 de esfingosina-1-fosfato, S1P<sub>1</sub>, que se requiere para la salida del timo a la circulación, donde la concentración del ligando de S1P<sub>1</sub> es mayor (Koch *et al.*, 2011). El esquema de la **figura 7** muestra el proceso de desarrollo de la célula T en el timo.

La selección positiva y la selección negativa son dos puntos de control en el desarrollo de los timocitos que originan células T que expresan TCRs restringidos por complejos de MHC propios y autotolerantes. De esta forma, el organismo se asegura que el repertorio de células T circulantes reconozcan los péptidos presentados por los complejos MHC y se disminuya la autorreactividad hacia los antígenos propios. Ambos procesos se producen a través del mismo receptor, aunque los efectos desencadenados son bien distintos: diferenciación en la selección positiva y apoptosis en la selección negativa (Starr *et al.*, 2003). Esta diferencia en la consecuencia de la activación del TCR se debe a la distinta afinidad de los ligandos que se unen al receptor.

### ◆ La cascada de señalización del receptor de células T

El complejo receptor de la célula T está compuesto por el TCR $\beta$ , las cadenas  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\zeta$  de CD3 y el pT $\alpha$  o TCR $\alpha$ , según sea preTCR o TCR. A pesar de que el mecanismo inicial de activación es distinto en el preTCR y en el TCR, las cascadas de señalización son similares. En el preTCR, la iniciación se produce por oligomerización independiente de ligando (Pang *et al.*, 2010) y en el TCR por el reconocimiento del complejo MHC-péptido (Smith-Garvin *et al.*, 2009). Ambos atraen a las tirosinas quinasas Lck y Fyn, pertenecientes a la familia Src, al complejo TCR-CD3 donde fosforilan los motivos de activación basados en inmunorreceptores de tirosina (ITAMS) de CD3 $\zeta$ . Estos ITAMs actúan como puntos de



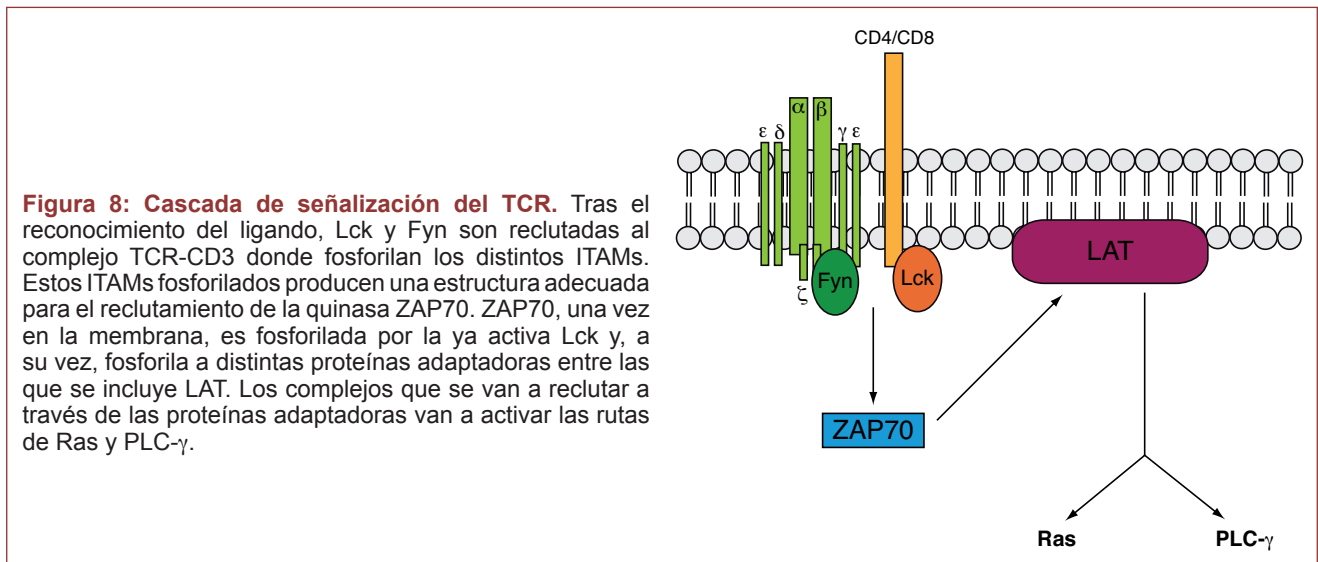
**Figura 7: Desarrollo de la célula T en el timo.** Los TSPs entran al timo por la unión corticomedular y se diferencian a ETPs que componen la subpoblación DN1. Los timocitos DN1, según viajan por la corteza del timo, diferencian a DN2 gracias a los estímulos procedentes de las cTECs, fibroblastos y macrófagos. En este punto comienza el reordenamiento de las cadenas β, γ y δ del TCR. Una vez que llegan a la zona subcapsular del timo, los timocitos DN2 diferencian a DN3. Los timocitos γδ están preparados para salir del timo mientras que los αβ siguen su desarrollo y entran en selección β. La diferenciación sigue hacia la subpoblación DN4, estos timocitos van a migrar hacia la médula por la corteza del timo. En la corteza aumentan la expresión de los correceptores CD4 y CD8 madurando hacia el estado DP y comienza el reordenamiento de la cadena α del TCR. Se produce la selección positiva y la selección negativa de forma que los timocitos resultantes, CD4 SP y CD8 SP, pueden salir del timo por la médula hacia los órganos linfoides periféricos (adaptado de Koch *et al.*, 2011).

anclaje para el reclutamiento y activación de la tirosina quinasa ZAP70. ZAP70 rápidamente fosforila a la proteína adaptadora de membrana LAT y a otras proteínas adaptadoras, en múltiples tirosinas de su cola citoplasmática que son esenciales para su función adaptadora. Las tirosinas fosforiladas de LAT actúan como sitios de unión de múltiples proteínas con dominios SH2. Los complejos reclutados por LAT provocan un aumento en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  que promueve la translocación de los factores de transcripción NFAT y NFκB, al igual que la activación de la GTPasa Ras (**figura 8**) (Germain *et al.*, 2002; Kortum *et al.*, 2013).

Dependiendo de si la señalización se da en la selección β, en la selección positiva o en la selección negativa, las proteínas activadas son distintas. Las tres requieren de las quinasas Lck y ZAP70 y de las proteínas adaptadoras LAT y SLP76. En la selección β son importantes las quinasas Fyn y Syk y la señalización a través de PI3K-Akt y de CXCR4 para el progreso de la subpoblación DN3 así como la ruta Ras-Raf-ERK. En la selección positiva son esenciales la señalización por PLCγ,  $Ca^{2+}$ /calmodulina y Ras-Raf-ERK. Y en la selección negativa PLCγ, JNK, p38, Bax y Bak, característicos de procesos apoptóticos (Starr *et al.*, 2003).

La diferente afinidad con que se une un ligando al TCR define la cascada de señalización que se genera y el efecto sobre el timocito. La activación de las MAPK es un ejemplo de ello (Starr *et al.*, 2003). Los ligandos que inducen selección negativa originan una activación de ERK intensa pero de corta duración; por el contrario, los ligandos que inducen selección positiva activan a ERK de forma menos

intensa pero de duración más prolongada (Werlen *et al.*, 2000; Mariathasan *et al.*, 2001). Esta activación de ERK más sostenida originada por ligandos de baja afinidad está provocada por la activación de Ras vía RasGRP. Las interacciones con ligandos de alta afinidad se producen a través de Grb2/SOS1 que provocan una activación de ERK más corta. Además, Grb2/SOS1 activan a p38 y JNK, necesarios en selección negativa (Starr *et al.*, 2003). La fosforilación de residuos diferentes en la proteína adaptadora LAT explica este diferente reclutamiento de RasGRP o Grb2/SOS1 (Wange *et al.*, 2000).



### ◆ RalGDS/Ral y la célula T

Como ya se ha comentado anteriormente, la GTPasa Ras regula gran cantidad de procesos biológicos entre los que se encuentra el sistema inmune. Ras se activa rápidamente tras la estimulación del TCR (Downward *et al.*, 1990) regulando diversos aspectos del desarrollo de la célula T incluyendo fases tempranas de la maduración de los timocitos y la selección positiva y negativa (Swan *et al.*, 1995; Swat *et al.*, 1996). También regula aspectos de la funcionalidad de la célula T como la producción de IL2, esencial para la proliferación de linfocitos periféricos (Baldari *et al.*, 1992). Además su inhibición correlaciona con la aparición de linfocitos T anérgicos (Fields *et al.*, 1996).

Ras ejerce estos efectos a través de sus tres rutas efectoras, las Raf quinasas, PI3K y las RalGEFs. En concreto, Ral se activa en linfocitos T tras la estimulación del TCR (Sánchez-Ruiz, 2011), por lo que creemos que la ruta RalGDS/Ral puede ejercer un papel en el desarrollo y funcionalidad de la célula T.



# OBJETIVOS





## RalGDS en el desarrollo de tumores de colon asociados a inflamación

La GTPasa Ras tiene un papel oncogénico ampliamente estudiado a través de las rutas efectoras que involucran a Raf y a PI3K. Las RalGEFs forman parte de la otra ruta efectora de Ras y se encargan de activar a las GTPasas Ral. Su estudio ha revelado que esta otra ruta también influye en la tumorigénesis mediada por Ras. Además, se ha demostrado que Ral activa diversas proteínas que actúan como nexos entre cáncer e inflamación, por lo que estamos interesados en estudiar si la vía RalGDS/Ral regula el cáncer de colon asociado a inflamación a través de efectos intrínsecos o de efectos extrínsecos en un modelo animal. Para ello, los objetivos que nos proponemos son los siguientes:

1. Estudio de la implicación de RalGDS en el desarrollo de la inflamación del colon.
2. Estudio de la implicación de RalGDS en la tumorigénesis del colon asociada a inflamación crónica.
3. Análisis del efecto de la deficiencia de RalGDS en el epitelio del colon y en la inmunidad innata en la inflamación del colon y en el desarrollo de tumores de colon asociados a inflamación.

## RalGDS en el desarrollo de la célula T en el timo

La GTPasa Ras, que regula la ruta de señalización RalGDS/Ral, controla diversas etapas en la maduración y funcionalidad de la célula T. Estudios llevados a cabo por nuestro grupo demuestran que la GTPasa Ral se activa en los linfocitos T tras la estimulación del TCR y es esencial en el ensamblaje del exocisto en la citotoxicidad de las células NK y CD8. Todo esto nos hace creer que RalGDS y/o Ral pueden tener un papel importante en el desarrollo y funcionalidad de la célula T. Los objetivos que nos proponemos para este estudio son los siguientes:

1. Análisis de la composición de las poblaciones linfoides y mieloides en la periferia de ratones deficientes en RalGDS.
2. Análisis del desarrollo de la célula T en el timo de ratones deficientes en RalGDS.
3. Análisis de los mecanismos moleculares responsables de los efectos observados.



# MATERIALES Y MÉTODOS





## Cultivo celular

Las células de adenocarcinoma colorrectal SW620 se cultivan en DMEM suplementado con 10% FBS, 1% L-glutamina y 1% penicilina/estreptomicina. Las células Jurkat se cultivan en RPMI suplementado con 10% FBS y 1% L-glutamina.

| Tampón   | Composición   | Uso   |
|--|---|---|
| <b>Bloqueo IF</b>                                    | 3% suero de cabra; 0,25% TX-100 en PBS  | Bloqueo inmunofluorescencia                         |
| <b>HBSS libre de Ca<sup>2+</sup> Mg<sup>2+</sup></b> | 8000mg/mL NaCl; 400 mg/mL KCl; 60mg/mL KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 1000mg/mL glucosa; 47,86mg/mL Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 350mg/mL bicarbonato de sodio; pH=7,4   | Aislamiento de criptas y linfocitos de colon        |
| <b>Lisis</b>   | 20mM Tris-HCl; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 1mM EGTA; 1% Tritón X-100; 2,5mM pirofosfato de sodio; 1mM β-glicerofosfato de sodio<br><br>En el momento de usar: 1mM ortovanadato de sodio; 1mM NaF; 1mM PMSF ; 1μg/mL leupeptina; 1μg/mL aprotinina; 1μg/mL ácido ocladaico | Lisis celular                                       |
| <b>Lisis de eritrocitos</b>                          | 0,14M NH <sub>4</sub> Cl; 0,017M Tris-base; pH=7,2  | Lisis de eritrocitos                                |
| <b>Tris-EDTA</b>                                     | 10mM Tris-base; 1mM EDTA; 0,05% Tween 20; pH=9  | Desenmascaramiento de antígeno, inmunofluorescencia |

Tabla 4: Composición de los tampones utilizados

## Infección estable de células Jurkat

Se utilizan células 293T como productoras de partículas virales. Para ello se transfectan utilizando JetPei (PolyPlus) con los shRNAs mostrados en la **tabla 5** (pLKO.1-puro, Sigma Aldrich) y los plásmidos VsVg y Pax2 que llevan la información necesaria para el empaquetamiento de los virus. Tras 48 horas se recoge el sobrenadante que se filtra en poros de 0,45 μm (GE Healthcare) para eliminar restos celulares que contaminen el medio enriquecido en virus y se añade polibreno a una concentración final de 5 μg/mL. El sobrenadante se añade a 450000 células Jurkat que se centrifugan a 1800 rpm a 37°C durante 70 minutos. Este ciclo se repite a las 24 horas. Para seleccionar las células Jurkat infectadas con los shRNAs se utiliza puromicina (Sigma Aldrich) a una concentración de 2 μg/mL durante 10 días.

| shRNA        | Secuencia   |
|--------------|---|
| 4865 (RaIA)  | CCGGCGCTGCAATTAGAGACAACACTACTCGAGTAGTTGTCTCTAATTGCAGCGTTTTT   |
| 4866 (RaIA)  | CCGGCGAGCTAATGTTGACAAGGTAAGTACTCGAGTACCTTGTCAACATTAGCTCGTTTTT |
| 4867 (RaIA)  | CCGGCGGAAGAAGGTAGTGCTAGATCTCGAGATCTAGCACTACCTTCTTCCGTTTTT     |
| 4868 (RaIA)  | CCGGCGATGAGTTTGTGGAGGACTACTCGAGTAGTCCTCCACAAACTCATCGTTTTT     |
| 72953 (RaIB) | CCGGCGTGATGAGTTAAAGTTGTATCTCGAGATACAACCTTTAACTCATCACGTTTTTG   |
| 72954 (RaIB) | CCGGGCCATTGAGATAACTACTTTCTCGAGAAAGTAGTTATCTCGAATGGCTTTTTG     |
| 72956 (RaIB) | CCGGCAAGGTGTTCTTTGACCTAATCTCGAGATTAGGTCAAAGAACACCTTGTTTTTG    |
| 72957 (RaIB) | CCGGGAGTTTGTAGAAGACTATGAACTCGAGTTCATAGTCTTCTACAAACTCTTTTTG    |

Tabla 5: Secuencias de los shRNAs de RaIA y RaIB utilizados en la infección de células Jurkat

## Activación de Ral y ensayo de pull-down

**Línea celular de adenocarcinoma colorrectal SW620:** las células SW620 se siembran en placas p60 en medio DMEM suplementado con 10% FBS, 1% L-glutamina y 1% penicilina/estreptomicina. Una vez en confluencia y tras 3 horas de privación de suero, se estimulan con LPS 0111:B4 (Sigma Aldrich) 10µg/mL a distintos tiempos (0, 3, 5 y 7 minutos) a 37°C y al 5% CO<sub>2</sub>, se retira el medio y se lava con PBS frío para posterior lisis de las células. El pull-down de Ral se realiza en 350 µg de lisado proteico.

**Criptas de ratones RalGDS<sup>fl/fl</sup>/Villin-Cre:** se utilizan 5 ratones RalGDS<sup>fl/fl</sup>/Villin-Cre<sup>-</sup> y 5 ratones RalGDS<sup>fl/fl</sup>/Villin-Cre<sup>+</sup> de 2 meses de edad para el aislamiento de las criptas colónicas. El colon cortado en trozos de 4-5 mm se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente en un balancín en tampón HBSS libre de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> (**tabla 4**), 1mM EDTA, 1mM EGTA, 0,5mM DTT. Los trozos de colon resultantes se lavan con PBS y se vortexean durante 20 segundos, realizando este paso dos veces. Las células se recuperan del PBS tras centrifugación a 1100 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se juntan las células procedentes de ratones RalGDS<sup>fl/fl</sup>/Villin-Cre<sup>-</sup> por un lado y de ratones RalGDS<sup>fl/fl</sup>/Villin-Cre<sup>+</sup> por otro y se siembran en placas p60 en medio DMEM sin FBS. Tras 3 horas, se procede a la estimulación con LPS 0111:B4 (Sigma Aldrich) 10µg/mL a distintos tiempos (0, 3, 5 y 7 minutos) a 37°C y al 5% CO<sub>2</sub>. Las células se lavan con PBS frío para su posterior lisis. El pull-down de Ral se realiza en 75 µg de lisado proteico.

**Pull-down de Ral:** esferas de sefarosa recubiertas con glutation (*Glutathione Sepharose 4B*, GE Healthcare) conjugadas con GST-RalBP1 RBD se incuban con la cantidad de lisado proteico disponible durante una hora a 4°C y en rotación. Se lavan tres veces con tampón de lisis y se preparan para posterior *Western blot*.

## Estimulación de los timocitos

Tras el procesado de las células procedentes del timo, se dejan en RPMI, sin FBS, suplementado con 0,75% BSA libre de endotoxina (Sigma Aldrich) durante 2 horas a 37°C al 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado ese tiempo, se incuban durante 20 minutos con anti-CD3ε (BD Biosciences Pharmingen) a una concentración de 1µg/mL a 4°C. Para inducir el entrecruzamiento de receptores, se estimulan las células con anti-IgG de hámster armenio y sirio (BD Biosciences Pharmingen) a una concentración de 1µg/mL a distintos tiempos (0, 1, 3, 7 y 15 minutos) a 37°C. Las células se lavan 2 veces con PBS frío para su posterior lisis.

## Lisis celular y Western blot

Para la lisis de las células obtenidas se usa el tampón de lisis celular indicado en la **tabla 4**. Después de 20 minutos de lisis, se centrifuga a 13000 rpm durante 20 minutos, todo ello a 4°C. La cantidad de proteína en el sobrenadante se cuantifica utilizando el sistema *Micro BCA Protein assay Kit* (Thermo Scientific, Pierce). Las proteínas se cargan en un gel de electroforesis desnaturante SDS-PAGE de porcentaje adecuado al peso de la proteína deseada y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa donde se examina la proteína de interés con anticuerpos específicos (**tabla 6**). Para revelar la membrana se utiliza el sistema de detección ECL (GE Healthcare). La cuantificación de las bandas de *Western blot* se realiza con el software *ImageJ 1.37v*.

| Anticuerpo           | Casa comercial               |
|----------------------|------------------------------|
| RalA                 | BD Transduction Laboratories |
| RalB                 | Millipore Upstate            |
| CD3                  | DAKO                         |
| pAkt (Thr308)        | Cell Signalling              |
| Akt                  | Cell Signalling              |
| pp38 (Thr180/Tyr182) | Cell Signalling              |
| p38                  | Cell Signalling              |
| pERK(Thr202/Tyr204)  | Cell Signalling              |
| ERK                  | Cell Signalling              |
| pTyr                 | Cell Signalling              |
| $\beta$ -Actina      | Cell Signalling              |

**Tabla 6: Anticuerpos utilizados en los experimentos de Western blot**

## Líneas de ratones

Los ratones  $RalGDS^{-/-}$  (129S2/SvPasCrl) han sido diseñados por Ana González García en el laboratorio de Chris Marshall (González-García A. *et al.*, 2005). Estos ratones se cruzan con ratones B6.SJL-Tg (Vil-Cre)997Gum/J ó B6.129P2-Lyz2<sup>tm1(cre)Ifo/J</sup> procedentes de *The Jackson Laboratory* para generar los ratones *knockout* condicionales  $RalGDS^{f/f}/Villin-Cre$  y  $RalGDS^{f/f}/LysM-Cre$ .

La línea de ratones transgénicos para el TCR OT-I (C57BL/6-Tg(Tcr $\alpha$ Tcr $\beta$ )1100Mjb/J) han sido generosamente donados por el laboratorio de Carlos Ardavin. Los ratones  $RalGDS^{-/-}$ xOT-I utilizados se encuentran en F6 en fondo C57.

Los ratones BALB/c proceden de *Harlan Laboratories* y se cruzan con los ratones  $RalGDS^{-/-}$  durante 4 generaciones.

Los ratones Ly5.1 ó CD45.1 (SJL/J) proceden de *The Jackson Laboratory*.

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

## Choque séptico

A una población homogénea de ratones  $RalGDS^{f/f}/LysM-Cre^{-}$  y  $RalGDS^{f/f}/LysM-Cre^{+}$  se les inyecta de forma intraperitoneal 50  $\mu$ g por ratón de LPS 0111:B4 (Sigma Aldrich) y 20 mg por ratón de D-galactosamina (Sigma Aldrich).

## Inducción de inflamación aguda en el colon

A una población homogénea de ratones control y ratones transgénicos se les suministra dextran sulfato de sodio, DSS, (MP Biomedicals) al 3,5% en peso en el agua de bebida durante 6 días. A día 20 se sacrifican en cámara de CO<sub>2</sub> y se les extrae el colon que se limpia y se enrolla para posterior estudio por inmunohistoquímica. Durante los 20 días que dura el experimento, se recogen datos sobre el peso, consistencia de las heces y existencia de sangre en heces para calcular el índice de la actividad de la enfermedad, DAI, que se determina según la puntuación mostrada en la **tabla 7**.

| Puntuación | Peso                   | Consistencia de las heces | Sangre en heces                            |
|------------|------------------------|---------------------------|--|
| 0          | > 99% del peso inicial | Normal                    | Negativo                                   |
| 1          | > 95% del peso inicial |                           |  |
| 2          | > 90% del peso inicial | Blando                    | Positivo sólo bajo el test hemoFEC (Roche) |
| 3          | > 85% del peso inicial |                           |  |
| 4          | < 85% del peso inicial | Diarrea                   | Positivo a simple vista                    |

**Tabla 7: Criterios utilizados en la determinación del DAI de los experimentos de inflamación aguda de colon**

## Inducción de tumores de colon asociados a inflamación

A una población homogénea de ratones control y ratones transgénicos se les inyecta azoximetano, AOM, (Sigma Aldrich) por vía intraperitoneal a una concentración de 11 mg por kg de ratón. Al quinto día tras la inyección, se les suministra DSS, (MP Biomedicals) al 2,5% en peso en el agua de bebida durante 5 días, seguido de agua de bebida sin DSS durante 15 días. Estos ciclos de DSS/agua se repiten varias veces. Los ratones se sacrifican en cámara de CO<sub>2</sub> a los 15 días del último ciclo de DSS y se les extrae el colon. Los tumores son analizados bajo una lupa Leica MZ APO conectada a una cámara. El tamaño se determina mediante el programa *ImageJ 1.37v*.

## Reconstitución de médula ósea

Se utilizan un ratón RalGDS<sup>+/+</sup>xOT-I y uno RalGDS<sup>-/-</sup>xOT-I, ambos CD45.2, y un ratón CD45.1 que se sacrifican en cámara de CO<sub>2</sub>. Se sacan y se limpian los fémures en esterilidad. Con agujas de 21G (BD Microlance) se extrae la médula de la luz de los huesos con PBS estéril. Las células recogidas se centrifugan a 1000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se lavan 3 veces con PBS. Tras contar las células obtenidas de cada ratón, se mezclan células RalGDS<sup>+/+</sup>xOT-I con células CD45.1 en proporción 1:1 y células RalGDS<sup>-/-</sup>xOT-I con células CD45.1 en proporción 1:1. Se inyectan de forma intravenosa 2x10<sup>6</sup> células a ratones CD45.1 previamente irradiados a 10Gy, formando dos grupos, ratones CD45.1 con médula RalGDS<sup>+/+</sup>xOT-I y ratones CD45.1 con médula RalGDS<sup>-/-</sup>xOT-I. A los dos meses se sacrifican los ratones en cámara de CO<sub>2</sub> y se les extrae el timo y el bazo para posterior procesamiento de los órganos y análisis de las células por citometría de flujo.

## Citometría de flujo

*Extracción y procesamiento de órganos linfoides:* los timos, bazos y/o nódulos linfáticos inguinales de los ratones fueron extraídos y disgregados en RPMI en un colador de células de 40 µm (BD Falcon). Tras la lisis de eritrocitos se tiñeron 2x10<sup>6</sup> células por cada combinación de anticuerpos y se utilizó un



citómetro *Cytomics FC500* o *GALLIOS* (Beckman Coulter) para realizar las mediciones.

*Permeabilización de las células para citometría:* la tinción intracelular para analizar por citometría de flujo se realiza con el kit *IntraPrep™ Permeabilization Reagent* (Beckman Coulter).

*Combinaciones de anticuerpos para citometría:*

CD11b<sup>PE</sup> F4/80<sup>FITC</sup> Gr1<sup>PECy7</sup>  
 CD3<sup>FITC</sup> CD4<sup>PECy7</sup> CD8<sup>PE</sup> B220<sup>APC</sup>  
 CD4<sup>PECy7</sup> CD8<sup>PE</sup> CD25<sup>FITC</sup> CD69<sup>biot</sup> Av<sup>SPRD</sup>  
 CD4<sup>PECy7</sup> CD8<sup>PE</sup> CD44<sup>APC</sup> CD25<sup>FITC</sup> CD3ε<sup>biot</sup> Av<sup>EF450</sup>  
 CD4<sup>PECy7</sup> CD8<sup>PE</sup> CD44<sup>APC</sup> CD25<sup>FITC</sup> TCRβ<sup>biot</sup> Av<sup>EF450</sup>  
 CD4<sup>PECy7</sup> CD8<sup>PE</sup> CD44<sup>FITC</sup> CD62L<sup>APC</sup>  
 CD4<sup>PECy7</sup> CD8<sup>PE</sup> CD5<sup>FITC</sup> CD69<sup>biot</sup> Av<sup>SPRD</sup>  
 CD4<sup>PECy7</sup> CD8<sup>APC</sup> Vβ3<sup>FITC</sup> Vβ11<sup>biot</sup> Av<sup>PE</sup>  
 CD4<sup>PECy7</sup> CD8<sup>APC</sup> Vβ5<sup>PE</sup> Vβ8<sup>biot</sup> Av<sup>FITC</sup>  
 T3.70<sup>FITC</sup> CD4<sup>PECy7</sup> CD8<sup>PE</sup> CD3ε<sup>biot</sup> Av<sup>SPRD</sup>

| Anticuerpo               | Casa comercial            | Dilución |
|--------------------------|---------------------------|----------|
| Avidina <sup>FITC</sup>  | Beckman Coulter           | 1/100    |
| Avidina <sup>PE</sup>    | Beckman Coulter           | 1/100    |
| Avidina <sup>SPRD</sup>  | Beckman Coulter           | 1/100    |
| B220 <sup>APC</sup>      | Beckman Coulter           | 1/50     |
| CD11b <sup>PE</sup>      | Beckman Coulter           | 1/200    |
| CD25 <sup>FITC</sup>     | BD Biosciences Pharmingen | 1/100    |
| CD3 <sup>APC</sup>       | eBioscience               | 1/200    |
| CD3 <sup>biotina</sup>   | eBioscience               | 1/100    |
| CD3 <sup>FITC</sup>      | Beckman Coulter           | 1/100    |
| CD4 <sup>APC-EF780</sup> | eBioscience               | 1/100    |
| CD4 <sup>PECy7</sup>     | BioLegend                 | 1/100    |
| CD44 <sup>APC</sup>      | Beckman Coulter           | 1/50     |
| CD44 <sup>FITC</sup>     | Beckman Coulter           | 1/200    |
| CD45.1 <sup>PE</sup>     | BD Biosciences Pharmingen | 1/100    |
| CD45.2 <sup>FITC</sup>   | BD Biosciences Pharmingen | 1/50     |
| CD62L <sup>APC</sup>     | eBioscience               | 1/100    |
| CD69 <sup>biotina</sup>  | BD Biosciences Pharmingen | 1/100    |
| CD8 <sup>EF450</sup>     | eBioscience               | 1/100    |
| CD8 <sup>PE</sup>        | Beckman Coulter           | 1/50     |
| F4/80 <sup>FITC</sup>    | eBioscience               | 1/100    |
| Gr1 <sup>PECy7</sup>     | eBioscience               | 1/200    |
| T3.70 <sup>FITC</sup>    | eBioscience               | 1/100    |
| TCRβ <sup>biotina</sup>  | Beckman Coulter           | 1/100    |
| Vβ3 <sup>FITC</sup>      | BD Biosciences Pharmingen | 1/50     |
| Vβ5 <sup>PE</sup>        | BD Biosciences Pharmingen | 1/100    |
| Vβ8 <sup>biotina</sup>   | BD Biosciences Pharmingen | 1/50     |
| Vβ11 <sup>biotina</sup>  | BD Biosciences Pharmingen | 1/100    |

**Tabla 8: Anticuerpos utilizados en citometría en el estudio del desarrollo de los timocitos**

## Infiltrados inflamatorios del colon

A una población homogénea de ratones control y ratones transgénicos se les suministra DSS durante 6 días. Al día elegido para el estudio de la composición de los infiltrados inflamatorios se les sacrifica en cámara de CO<sub>2</sub> junto con ratones control y transgénicos sin inflamar. Se les extrae el colon que se abre y se limpia en HBSS libre de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> (**tabla 4**). El colon se corta en trozos de 4-5 mm y se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente en un balancín en tampón HBSS libre de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 0,5mM DTT. Se guarda el sobrenadante y se repite este último paso.

**Linfocitos intraepiteliales:** se juntan ambos sobrenadantes y se centrifugan a 4°C a 200 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se vuelve a centrifugar a 4°C a 1200 rpm durante 5 minutos. El pellet que se obtiene corresponde con los linfocitos intraepiteliales.

**Linfocitos de la lámina propia:** se añade PBS a los trozos de colon y se vortexean durante 20 segundos. Se desecha el sobrenadante y se repite el proceso una vez más. A continuación se lavan los trozos de colon con PBS en un colador de células de 40 µm (BD Falcon). Los trozos de colon se incuban en DMEM suplementado con 5% FBS; 0,5 mg/mL colagenasa tipo VIII (Sigma Aldrich) y 5U/mL DNAasa I (Sigma Aldrich) durante 90 minutos a 37°C en agitación (200 rpm). Se vortexean durante 20 segundos y al sobrenadante se le añade 4 mL de Percoll (GE Healthcare) 100% mezclando bien. Se añaden 2,5 mL de Percoll 70% en el fondo del tubo, con cuidado de que no se mezclen las fases. Se centrifuga, sin freno, a 4°C durante 30 minutos a 1200 rpm. Las células se recogen de la interfase resultante a la que se añade PBS y se centrifuga a 4°C durante 5 minutos a 1200 rpm. El pellet que se obtiene corresponde con los linfocitos de la lámina propia.

Los linfocitos purificados, tanto los intraepiteliales como los de la lamina propia, se pasan por un filtro de 30mm (Filcons 130-33S) y las células se tiñen con la combinación de anticuerpos adecuada (**tabla 9**). Se añade el mismo volumen de *Flow-Count Fluorospheres* (Beckman Coulter) que de células para determinar la concentración absoluta de células. Se utiliza un citómetro *Cytomics FC500* (Beckman Coulter) para realizar las mediciones.

**Combinaciones de anticuerpos:**

CD3<sup>FITC</sup> CD8<sup>PE</sup> CD4<sup>PECy7</sup> CD45<sup>APC</sup>  
 CD3<sup>FITC</sup> B220<sup>PE</sup> CD45<sup>APC</sup>  
 F4/80<sup>FITC</sup> CD11b<sup>PE</sup> Gr1<sup>PECy7</sup> CD45<sup>APC</sup>

| Anticuerpo            | Casa comercial  | Dilución |
|-----------------------|-----------------|----------|
| B220 <sup>PE</sup>    | Beckman Coulter | 1/100    |
| CD11b <sup>PE</sup>   | Beckman Coulter | 1/200    |
| CD3 <sup>FITC</sup>   | Beckman Coulter | 1/100    |
| CD4 <sup>PECy7</sup>  | BioLegend       | 1/100    |
| CD45 <sup>APC</sup>   | eBioscience     | 1/200    |
| CD8 <sup>PE</sup>     | Beckman Coulter | 1/50     |
| F4/80 <sup>FITC</sup> | eBioscience     | 1/100    |
| Gr1 <sup>PECy7</sup>  | eBioscience     | 1/200    |

**Tabla 9: Anticuerpos utilizados para determinar los infiltrados inflamatorios en el colon por citometría de flujo**

**Histología**

Los colones recogidos y enrollados se dejan en formalina durante 48 horas. A continuación se procede a su deshidratación utilizando una procesadora de tejidos Leica TP1020. Se utiliza un programa en el que el tejido está 2 horas en cada una de las siguientes cubetas: etanol 70%, etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, etanol 100%, etanol 100%, etanol 100%, xilol, xilol y parafina. Se montan los bloques de parafina y se cortan a 3µm con ayuda de un microtomo motorizado Leica RM2155.

Para desparafinar los cortes de colon se realizan dos lavados de 7 minutos en xilol, dos lavados de 5 minutos en etanol 100%, dos lavados de 5 minutos en etanol 70% y un último lavado de 5 minutos en agua destilada.

**Tinción hematoxilina y eosina:** los cortes de colon, una vez desparafinados, se incuban con hematoxilina (Sigma Aldrich) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavan durante 5 minutos con agua

destilada y se vuelven a incubar con eosina (Sigma Aldrich) durante 2 minutos. Se lavan dos veces con agua destilada durante 5 minutos cada lavado. Para deshidratar los cortes se van haciendo lavados de 5 minutos en etanol 70% y etanol 100%, dos lavados por disolvente, y un último lavado de 7 minutos en xilol. Se procede al montaje de los cortes con *VectaMount* (Vector Laboratories).

**Inmunofluorescencia:** los cortes de colon, una vez desparafinados, se incuban en Tris-EDTA (**tabla 4**) a 96°C durante 20 minutos para desenmascarar el antígeno. Se dejan otros 20 minutos a temperatura ambiente para que se enfríen. Se lavan dos veces durante 2 minutos con PBS-0,05% Tween 20 y se hace un pretratamiento de 15 minutos a temperatura ambiente con un anticuerpo anti-IgG de ratón para evitar interacciones inespecíficas del anticuerpo secundario. Se vuelve a lavar 2 veces durante 2 minutos con PBS-0,05% Tween 20 y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente con tampón de bloqueo (**tabla 4**). Se procede a bloquear la avidina y la biotina con el kit *DakoCytomation Biotin Blocking System* (Dako). Tras dos lavados de 2 minutos con PBS-0,05% Tween 20 se incuba el anticuerpo de interés durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, los cortes se lavan tres veces durante 2 minutos con PBS-0,05% Tween 20 para proceder a la incubación de los anticuerpos secundarios acoplados a distintos fluoróforos durante 1 hora a temperatura ambiente. Se vuelve a lavar tres veces con PBS-0,05% Tween 20. Los núcleos se tiñen durante 10 minutos a temperatura ambiente. Por último se procede al montaje de las muestras con PBS/glicerol en proporción 1:1. En la **tabla 10** se muestran los anticuerpos utilizados en este apartado.

| Anticuerpo                     | Casa comercial               | Dilución | Marcaje de                |
|--------------------------------|------------------------------|----------|---------------------------|
| Mac3 (M3/84)                   | Santa Cruz Biotechnology     | 1/50     | Macrófagos                |
| Mouse anti rat IgG Biotina     | Jackson ImmunoResearch       | 1/500    |                           |
| Estreptavidina Cy5             | Jackson ImmunoResearch       | 1/1250   |                           |
| iNOS (ABN26)                   | Millipore                    | 1/50     | Macrófagos de fenotipo M1 |
| Goat anti rabbit IgG Alexa 488 | Molecular Probes             | 1/400    |                           |
| Arginasa I                     | BD Transduction Laboratories | 1/50     | Macrófagos de fenotipo M2 |
| Goat anti Mouse IgG Alexa 546  | Life Technologies            | 1/500    |                           |
| Hoechst                        | Nalgene                      | 1/1000   | Núcleos                   |

**Tabla 10: Anticuerpos utilizados en las tinciones de inmunofluorescencia en las muestras de colon**

## Extracción de RNA de macrófagos derivados de médula ósea

Se utilizan 3 ratones *RalGDS<sup>ff</sup>/LysM-Cre* y 3 ratones *RalGDS<sup>ff</sup>/LysM-Cre<sup>+</sup>* de 2 meses de edad para la extracción de médula ósea. Para ello se sacrifican a los animales en cámara de CO<sub>2</sub> y se sacan y se limpian los fémures. Con agujas de 21G (BD Microlance) se extrae en esterilidad la médula de la luz de los huesos con DMEM suplementado con 10% FBS, 1% L-glutamina, 1% penicilina/estreptomycin. Las células recogidas se centrifugan a 1000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se lavan 3 veces con PBS estéril. Las células obtenidas se siembran en placas p100 sin tratar en 8 mL de DMEM suplementado con 20% FBS, 1% L-glutamina, 1% penicilina/estreptomycin y 30% de medio condicionado L929. Al tercer día se les renueva el medio y al séptimo se levantan las células obtenidas y se chequea por citometría de flujo la eficiencia de diferenciación hacia macrófagos. Los macrófagos obtenidos de cada ratón se plaquean en tres placas p100. Una de ellas se polariza hacia el fenotipo M1 con LPS 0111:B4 (Sigma Aldrich) 100 ng/mL durante 6 horas; otra se polariza hacia el fenotipo M2 con IL4 (RD Systems) 10 ng/mL durante 24 horas; a la otra placa no se le añade nada y sirve como control interno. Se procede a la extracción de RNA con *Tri-Reagent* (Sigma Aldrich). Cada placa se lisa con 1 mL de *Tri-Reagent* durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se añaden 200 µL de cloroformo y se agita

durante 15 segundos. Se deja reposar 15 minutos a temperatura ambiente y a continuación se centrifuga a 13000 rpm otros 15 minutos a temperatura ambiente. Se recoge la fase acuosa, que queda por encima de la interfase, a la que se le añaden 500 µL de isopropanol. Se mezcla y se deja reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga a 13000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente, se retira el sobrenadante y el pellet se lava con etanol al 75% en agua libre de RNAsas. Se vuelve a centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. El pellet que se obtiene se deja secar al aire y se resuspende en 30-50 µL agua miliQ estéril y el RNA se cuantifica en un NanoDrop *ND-1000 Spectrophotometer* (Termo Scientific).

### Medio condicionado L929

Las células L929 secretan M-CSF, una citoquina que diferencia las células de la médula ósea hacia macrófagos. Las células L929 se crecen en flash T-175 con 30 mL de DMEM suplementado con 10% FCS; 1% L-glutamina, 1% penicilina/estreptomicina. Cuando llegan a confluencia se añaden 70 mL de este mismo medio y se dejan crecer 72 horas más. Se recoge el sobrenadante que, tras ser filtrado, se alícuota y se conserva a -20°C.

### PCR cuantitativa (qRT-PCR)

La PCR cuantitativa ha sido realizada por el servicio de genómica del Departamento de Inmunología y Oncología del Centro Nacional de Biotecnología.

El RNA extraído de los macrófagos derivados de médula ósea se transcribe a cDNA mediante el kit *High Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems). La RT-PCR se realiza con los oligonucleótidos mostrados en la **tabla 11** y el kit *Fluocycle SYBR® Green mix for Real-Time PCR* (EuroClone-Genycell) en una máquina ABI PRISM 7900HT en placa de 384 pocillos y volumen final de PCR de 8 µL siguiendo las condiciones del fabricante.

La expresión relativa de cada muestra se calcula con el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak *et al.*, 2001). Para realizar la cuantificación relativa se normaliza frente a  $\beta$ -actina y como control interno se utiliza la expresión de las células sin estimular.

| Gen        |         | Secuencia                    |
|------------|---------|------------------------------|
| iNOS       | Forward | 5'-GCTGTGCTCCATAGTTTCCAG-3'  |
|            | Reverse | 5'-GGACCAGCCAAATCCAGTC-3'    |
| IL12(p40)  | Forward | 5'-TGGTTTGCCATCGTTTTGCTG-3'  |
|            | Reverse | 5'-ACAGGTGAGGTTCACTGTTTCT-3' |
| Arginasa I | Forward | 5'-TCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG-3'  |
|            | Reverse | 5'-AGGAGCTGTCATTAGGGACATC-3' |
| YM1/2      | Forward | 5'-ACTTTGATGGCCTCAACCTG-3'   |
|            | Reverse | 5'-AATGATTCCTGCTCCTGTGG-3'   |
| IL-10      | Forward | 5'-AGGCGCTGTCATCGATTTCTC-3'  |
|            | Reverse | 5'-TGGCCTGTAGACACCTTGGTC-3'  |

**Tabla 11: Secuencias de los oligonucleótidos usados en la qRT-PCR**

## **Análisis de los datos**

El análisis de los datos procedentes de los experimentos de citometría de flujo se realizó con los softwares *RXP*, *Kaluza* y *FlowJo*. La estadística de los datos se realizó con el software *GraphPad Prism*.



# RESULTADOS





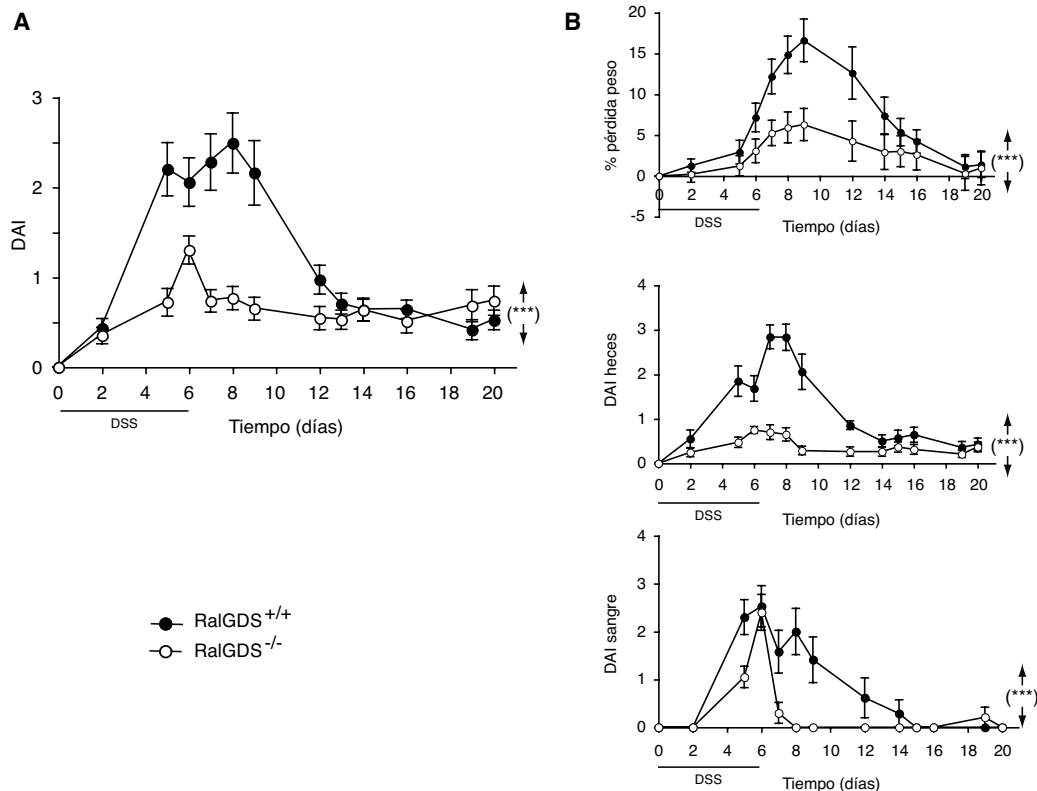
# **RalGDS en el desarrollo de tumores de colon asociados a inflamación**



Para valorar la función global de RalGDS en el transcurso del cáncer de colon asociado a inflamación utilizamos los ratones deficientes de esta proteína, RalGDS<sup>-/-</sup>, y los ratones control RalGDS<sup>+/+</sup>. Los ratones RalGDS<sup>-/-</sup> son viables y no presentan defectos graves en ninguno de los órganos analizados. El dominio catalítico de la proteína RalGDS y los residuos involucrados en la unión a Ras han sido eliminados en este modelo, por lo que estos ratones no pueden activar a las GTPasas Ral a través de RalGDS y no responden a aquellas señales procedentes de Ras que se transmiten por RalGDS (González-García A. *et al.* 2005).

En primer lugar, valoramos la implicación de RalGDS en la respuesta inflamatoria aguda en el colon. Para originar la inflamación añadimos dextran sulfato de sodio (DSS) en el agua de bebida que damos a los ratones. El DSS rompe la barrera epitelial del intestino permitiendo que la flora microbiana la atraviese desencadenando una respuesta inflamatoria. Este modelo experimental se asemeja al proceso de colitis ulcerosa en humanos ya que muestra muchos de los síntomas de la colitis como diarrea, sangre en heces, pérdida de peso y acortamiento del intestino grueso. Además, otra de sus ventajas es que es posible inducir fases agudas y crónicas de la enfermedad según el número de ciclos de DSS que se utilicen (Okayasu *et al.*, 1990). Un único ciclo de DSS es suficiente para producir colitis aguda. Tras 6 días de tratamiento con DSS, éste se retira del agua de bebida para observar la recuperación hasta día 20, cuando los animales son sacrificados. Diariamente se recogen datos sobre la pérdida de peso, la consistencia de las heces y la aparición de sangre en las heces para calcular el índice de actividad de la enfermedad (DAI) (Cooper *et al.* 1993). Cada factor se evalúa según una puntuación cuyos parámetros se definen a continuación. En la pérdida de peso se calcula el porcentaje del peso de los ratones con respecto a día 0. De esta manera, si tienen más del 99% del peso inicial su puntuación es 0; si tienen más del 95%, su puntuación es 1; si tienen más del 90%, su puntuación es 2; si tienen más del 85%, su puntuación es 3; y si tienen menos del 85% del peso inicial su puntuación es 4. En la consistencia de las heces, la puntuación es 0 si es normal; 2 si es blanda; y 4 si tienen diarrea. Para valorar la sangre oculta en heces es necesario utilizar el test hemoFEC (Roche). Si el test da negativo la puntuación que se da es 0; si es positivo pero el ojo humano no ha podido detectarlo, la puntuación es 2; y si la sangre se detecta a simple vista, la puntuación es 4. El DAI se calcula como la media de los tres factores de cada día analizado, obteniendo una curva que representa el transcurso de la enfermedad. De esta forma se puede evaluar la actividad de la enfermedad tanto de manera global como individualmente a través de la contribución de cada factor. Cuanto mayor es el DAI, mayor es la gravedad del proceso inflamatorio. Como se observa en la **figura 9A**, los ratones RalGDS<sup>-/-</sup> apenas muestran síntomas de enfermar durante el período de observación comparados con los ratones control. Esto nos indica que RalGDS es necesario para la respuesta inflamatoria, su ausencia protege del desarrollo de la inflamación en el colon. Si separamos la contribución individual de cada uno de los factores (pérdida de peso, consistencia de las heces y existencia de sangre en heces) al DAI total (**figura 9B**) comprobamos que los tres factores influyen de manera significativa en la actividad de la enfermedad.

Una vez determinado que RalGDS interviene en la respuesta inflamatoria que se origina en el colon, nuestro interés se basa en estudiar cómo regula el cáncer de colon asociado a inflamación tanto de manera intrínseca como de manera extrínseca. En esta patología, las células epiteliales del colon son las que se transforman para originar el tumor. Utilizando un modelo en el que podamos eliminar específicamente la expresión de RalGDS en este tipo celular podemos analizar la regulación que ejerce sobre la formación de tumores de forma intrínseca. Por otro lado, la inflamación crónica en el colon conlleva al desarrollo de tumores, por lo que utilizando un modelo en el que podamos estudiar el



**Figura 9: Los ratones deficientes en RalGDS presentan una menor inflamación en el colon con respecto a los ratones control.** A una población de ratones control (RalGDS<sup>+/+</sup>) (n=20) y ratones deficientes en RalGDS (RalGDS<sup>-/-</sup>) (n=20) se les suministra DSS al 3,5% en el agua de bebida durante 6 días y se van tomando datos sobre el peso, la consistencia de las heces y la sangre en heces para calcular el índice de actividad de la enfermedad (DAI). En el panel (A) se muestra el DAI medio de los tres factores con respecto al tiempo. En el panel (B) se muestran las contribuciones individuales de cada factor al DAI total. Los valores se representan como media  $\pm$  SEM. Análisis estadístico ANOVA de dos factores, (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

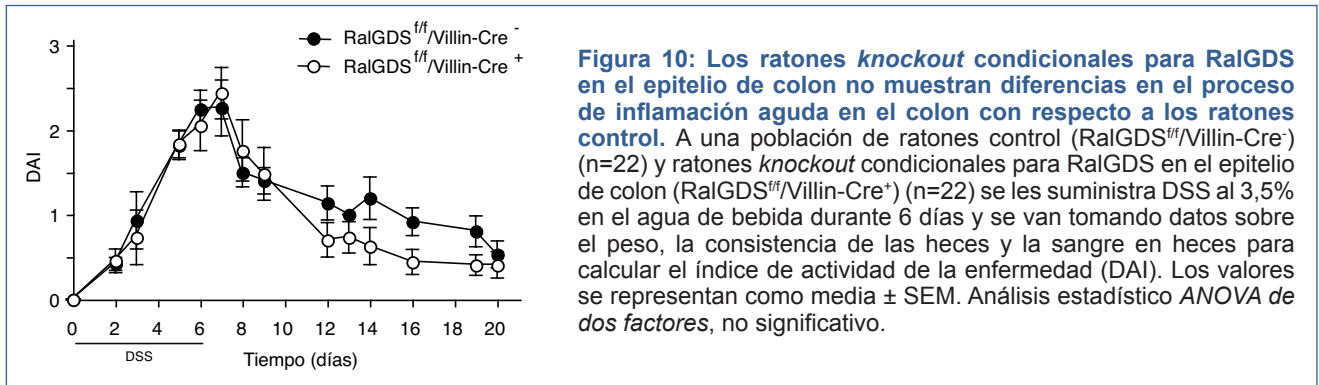
papel de RalGDS en el proceso inflamatorio podemos averiguar cómo regula esta patología de manera extrínseca. Para analizar estos dos factores utilizamos dos tipos de ratones *knockout* condicionales, los RalGDS<sup>f/f</sup>/Villin-Cre<sup>+</sup>, deficientes en RalGDS en las células epiteliales del colon, y los RalGDS<sup>f/f</sup>/LysM-Cre<sup>+</sup>, deficientes en RalGDS en las células mieloides.

### ◆ Efecto de la deficiencia de RalGDS en el epitelio de colon

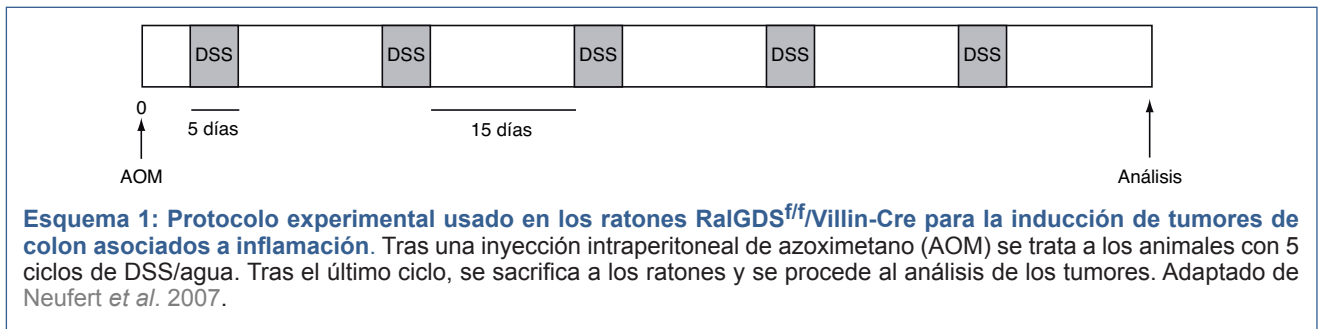
El epitelio del tracto intestinal es una de las barreras de defensa en los procesos inflamatorios que se producen en esta parte del organismo. En las enfermedades inflamatorias intestinales es común tener un epitelio dañado, de forma que la flora microbiana atraviesa este epitelio generando la respuesta inflamatoria (McGuckin *et al.* 2009). Además, las células del epitelio de colon son aquellas que se transforman en el cáncer de colon. Los ratones *knockout* condicionales RalGDS<sup>f/f</sup>/Villin-Cre<sup>+</sup> expresan la recombinasa Cre bajo el control del promotor de villina de forma que son deficientes en RalGDS en las vellosidades intestinales del intestino delgado y en las criptas del intestino grueso (Madison *et al.*, 2002). Como ratones control utilizamos ratones RalGDS<sup>f/f</sup>/Villin-Cre<sup>-</sup>. Con este modelo de ratón podemos estudiar tanto la función de RalGDS del epitelio en la inflamación del colon como su implicación en el desarrollo de tumores colorrectales asociados a inflamación.

Realizamos el experimento de inflamación aguda con DSS en el agua de bebida en estos ratones. Los ratones RalGDS<sup>f/f</sup>/Villin-Cre<sup>+</sup> no muestran diferencias con respecto a los ratones control en el progreso

de la enfermedad (**figura 10**). Enferman de la misma manera que los ratones control y se recuperan de la inflamación también de la misma forma. Por lo tanto, RalGDS no participa a través de las células epiteliales colónicas en la inflamación aguda del colon.

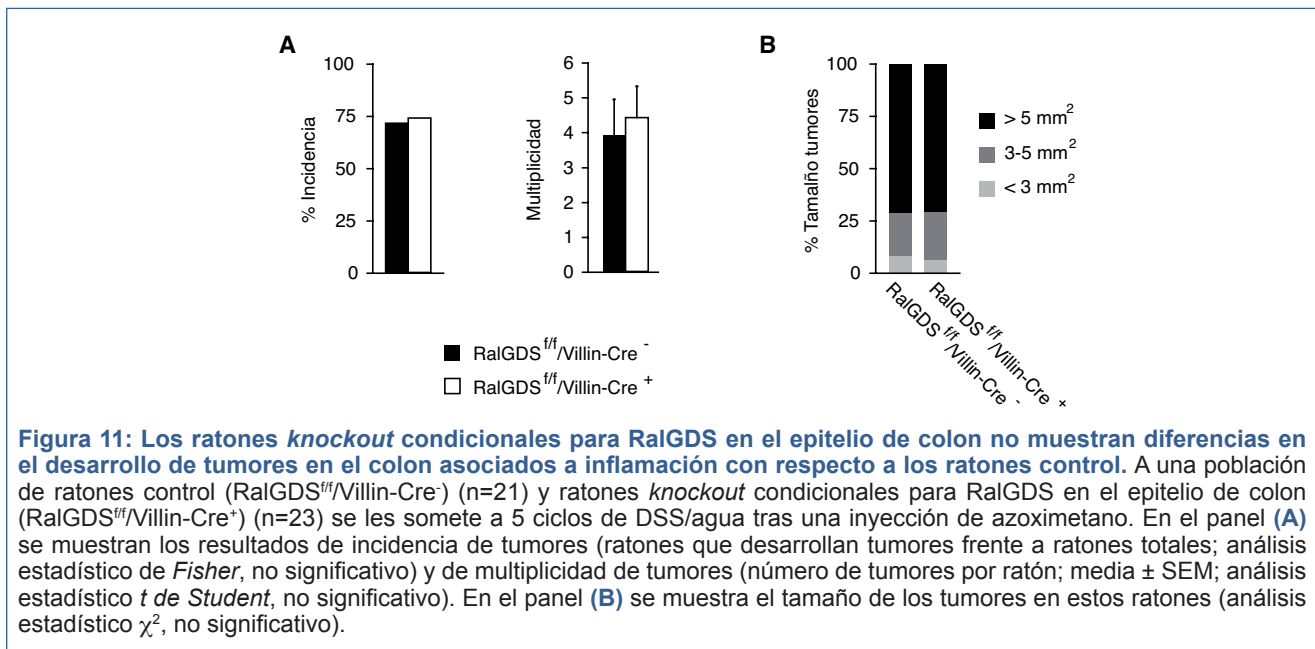


Para determinar si la expresión de RalGDS en el epitelio de colon es necesaria para la formación de tumores asociados a inflamación inducimos la producción de tumores con azoximetano (AOM). El AOM es un agente químico con capacidad de alquilar el DNA. Tras ser inyectado de forma intraperitoneal en el ratón, viaja al hígado donde es activado por el citocromo P450 con una hidroxilación que genera el metabolito intermedio metilazoximetanol. Éste sale del hígado, vía bilis, hacia el intestino donde la flora microbiana lo transforma en el metabolito activo diazometano con características de agente iniciador de tumores (Neufert *et al.*, 2007). Para reproducir los ciclos de inflamación/remisión que se producen en el cáncer de colon asociado a inflamación sometemos a los ratones a 5 ciclos de DSS/agua tras una única inyección de AOM. La exposición a varios ciclos de DSS/agua provoca úlceras en la mucosa del colon estableciéndose colitis crónica (Clapper *et al.*, 2007). En el **esquema 1** se representa el protocolo experimental utilizado en este ensayo.



El análisis de la incidencia y la multiplicidad de los tumores (**figura 11A**) demuestra que la aparición de tumores es la misma en los ratones RalGDS<sup>fl/fl</sup>/Villin-Cre<sup>+</sup> que en los control (incidencia) y, además, desarrollan el mismo número de tumores por ratón (multiplicidad). El estudio del tamaño de los tumores se realiza en base a tres rangos: tumores de menos de 3 mm<sup>2</sup>, tumores de entre 3 y 5 mm<sup>2</sup> y tumores de más de 5 mm<sup>2</sup>. Como se observa en la **figura 11B**, no existen diferencias en el tamaño de los tumores que desarrollan los ratones RalGDS<sup>fl/fl</sup>/Villin-Cre<sup>+</sup> frente a los que desarrollan los ratones control.

Este resultado nos sorprendió debido a que existen evidencias de que RalGDS sí participa en procesos cancerígenos (González-García *et al.*, 2005) y, además, la activación de Ral es importante en la tumorigénesis de colon (Martin *et al.*, 2011). Como esperamos que los efectos en la carcinogénesis se produzcan a través de la activación de la GTPasa Ral, nos preguntamos si, en el colon, puede haber otras GEFs que compensen la ausencia de RalGDS en la activación de Ral. El portal BioGPS (*Gene Portal System*) reúne varias bases de datos con información acerca de la expresión de genes en diversos tejidos.

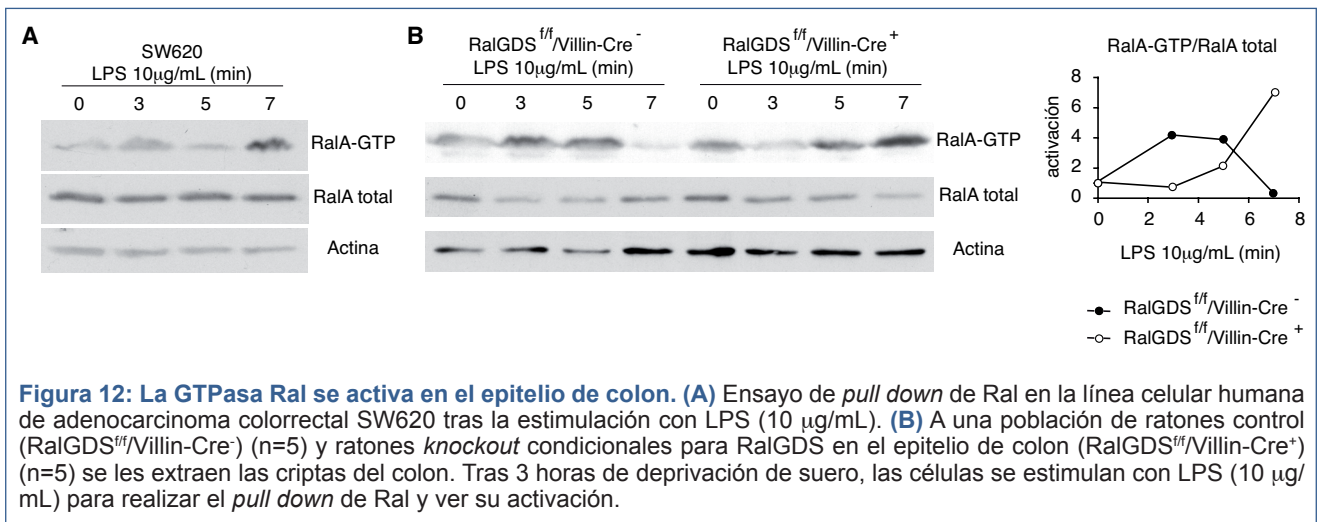


La base de datos *GeneAtlas MOE430*, actualizada en 2012, contiene el análisis de la expresión génica de diversos arrays de tejidos, órganos y líneas celulares en ratón, entre los que se encuentran las RalGEFs RalGDS, Rgl, Rlf, RalGPS1 y RalGPS2. Las tres primeras, RalGDS, Rgl y Rlf, son GEFs dependientes de la activación de Ras, mientras que la activación de RalGPS1 y RalGPS2 es independiente de Ras ya que no tienen RBD. Como se observa en la **tabla 12**, el nivel de expresión de Rlf también es alto en el colon de ratón, por lo que esta GEF podría estar activando a Ral.

| RalGEF            | Expresión en colon de ratón (unidades arbitrarias) |
|-------------------|--|
| RalGDS (ID5900)   | 339,81   |
| Rgl (ID44115)     | 7,53   |
| Rlf (ID19732)     | 337,82   |
| RalGPS1 (ID9649)  | 21,40  |
| RalGPS2 (ID55103) | 49,07  |

Tabla 12: Expresión de las distintas RalGEFs en el epitelio de colon de ratón. Fuente *GeneAtlas MOE430* (BioGPS).

Para comprobar si Ral está siendo activado, decidimos analizar su activación *in vitro* en células aisladas del colon de estos ratones estimulando con lipopolisacárido (LPS). Usamos LPS para mimetizar *in vitro* lo que está ocurriendo *in vivo*. La inflamación que se produce en la colitis ulcerosa se debe a que la flora microbiana, compuesta por centenares de bacterias, cruza la barrera intestinal provocando el proceso inflamatorio. El LPS, uno de los componentes de la pared de las bacterias Gram negativas, es uno de los compuestos con mayor actividad proinflamatoria. En la **figura 12A** comprobamos que el LPS induce la activación de Ral en la línea celular de colon SW620. A continuación, realizamos el mismo experimento en células epiteliales colónicas aisladas de los ratones RalGDS<sup>fl/fl</sup>/Villin-Cre<sup>+</sup> y los ratones control (**figura 12B**). Tras la estimulación con LPS observamos cómo el Ral procedente de las criptas de los ratones RalGDS<sup>fl/fl</sup>/Villin-Cre<sup>+</sup> se activa, aunque a tiempos más tardíos que el Ral procedente de las criptas de los ratones control. Esta activación de Ral podría ser suficiente para generar tumores en los ratones RalGDS<sup>fl/fl</sup>/Villin-Cre<sup>+</sup>, explicando los resultados mostrados en la figura 11.



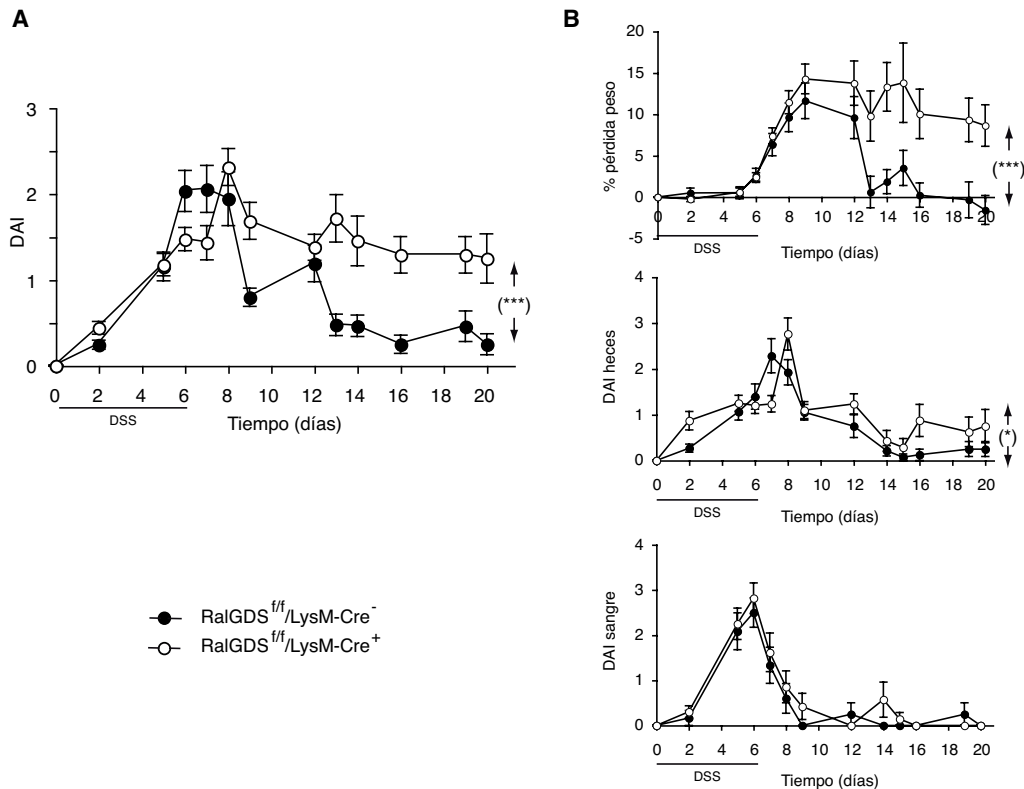
Con todos estos datos podemos concluir que RalGDS no es necesario para el desarrollo de tumores de colon asociados a inflamación a través del epitelio del colon en el modelo experimental utilizado.

### ◆ Efecto de la deficiencia de RalGDS en la inmunidad innata

Las células mieloides, que incluyen a los granulocitos y a los macrófagos, forman parte de la inmunidad innata. En el intestino, la inmunidad innata tiene un papel principal ya que debe responder de forma rápida y efectiva ante los patógenos invasores sin causar un daño excesivo a la flora bacteriana o al huésped. Para estudiar cómo RalGDS regula la formación de tumores en esta patología a través de los efectos producidos en la inflamación utilizamos los ratones *knockout* condicionales RalGDS<sup>f/f</sup>/LysM-Cre<sup>+</sup>, que expresan la recombinasa Cre bajo el promotor de lisozima, de forma que son deficientes en RalGDS sólo en la línea mielóide (Clausen *et al.*, 1999), y los ratones control RalGDS<sup>f/f</sup>/LysM-Cre<sup>-</sup>.

Para estudiar la función de RalGDS en las células mieloides en procesos de inflamación aguda, realizamos el mismo experimento que el realizado anteriormente en ratones RalGDS<sup>-/-</sup> y RalGDS<sup>f/f</sup>/Villin-Cre<sup>+</sup>, con DSS en el agua de bebida. Como se observa en la **figura 13A**, los ratones RalGDS<sup>f/f</sup>/LysM-Cre<sup>+</sup> enferman de la misma manera que los control. Una vez eliminado el DSS, los ratones control van recuperándose de la enfermedad mientras que en los RalGDS<sup>f/f</sup>/LysM-Cre<sup>+</sup> la inflamación persiste. Esto nos indica que el RalGDS de las células mieloides es necesario para la resolución de la inflamación del colon. Si separamos la contribución individual de cada uno de los factores (pérdida de peso, consistencia de las heces y existencia de sangre en heces) al DAI total (**figura 13B**) comprobamos que es la pérdida de peso la que más influye sobre la diferencia en la actividad de la enfermedad, los ratones RalGDS<sup>f/f</sup>/LysM-Cre<sup>+</sup> no recuperan el peso perdido durante el proceso inflamatorio. Al comparar los resultados obtenidos en inflamación aguda en los ratones RalGDS<sup>-/-</sup> (figura 9) con los obtenidos en los ratones RalGDS<sup>f/f</sup>/LysM-Cre<sup>+</sup> (figura 13) se observa que la proteína RalGDS tiene efectos distintos en diferentes etapas de la enfermedad, sugiriendo que esos efectos los controla a través de tipos celulares distintos. RalGDS regula la inflamación a través de un tipo celular desconocido por el momento e interviene en la resolución de la inflamación a través de las células mieloides.

Para estudiar la severidad de la inflamación en estos ratones, teñimos con hematoxilina y eosina (H&E) secciones histológicas de los colones de ratones control y ratones RalGDS<sup>f/f</sup>/LysM-Cre<sup>+</sup> sometidos al tratamiento con DSS. El análisis de la inflamación tisular ha sido realizado por la patóloga Juana

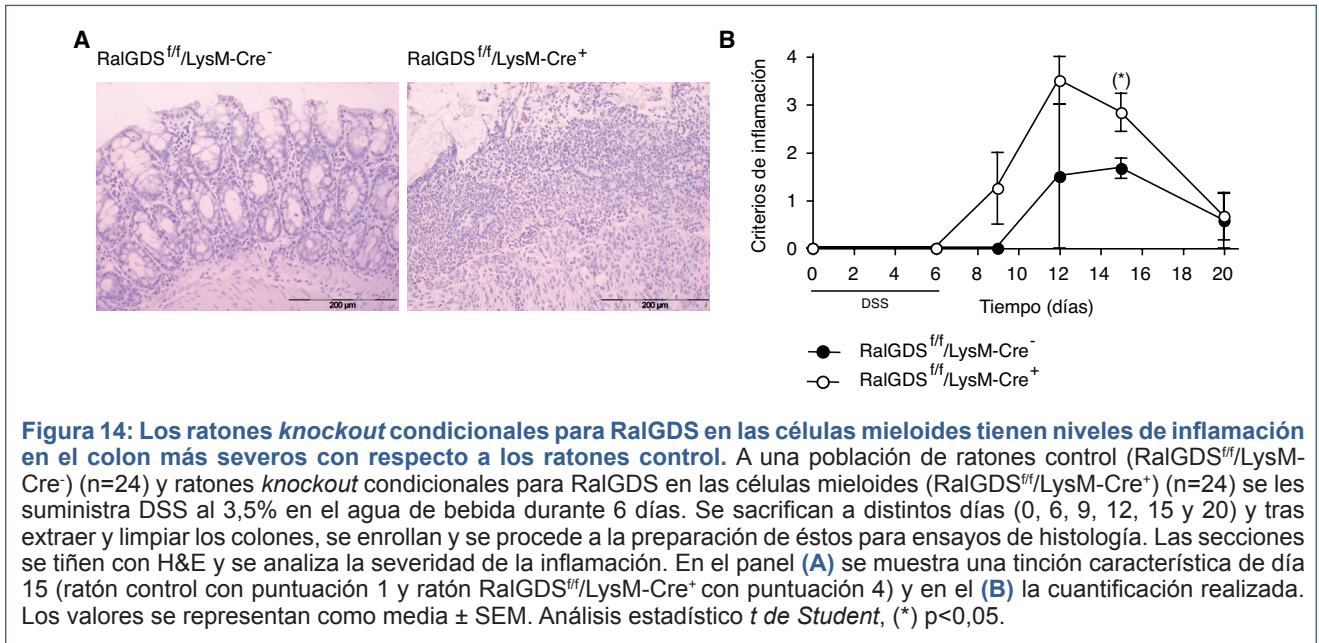


**Figura 13: Los ratones *knockout* condicionales para RalGDS en las células mieloides no se recuperan del proceso de inflamación aguda en el colon con respecto a los ratones control.** A una población de ratones control (RalGDS<sup>fl/fl</sup>/LysM-Cre<sup>-</sup>) (n=24) y ratones *knockout* condicionales para RalGDS en las células mieloides (RalGDS<sup>fl/fl</sup>/LysM-Cre<sup>+</sup>) (n=24) se les suministra DSS al 3,5% en el agua de bebida durante 6 días y se van tomando datos sobre el peso, la consistencia de las heces y la sangre en heces para calcular el índice de actividad de la enfermedad (DAI). En el panel (A) se muestra el DAI medio de los tres factores con respecto al tiempo. En el panel (B) se muestran las contribuciones individuales de cada factor al DAI total. Los valores se representan como media ± SEM. Análisis estadístico ANOVA de dos factores, (\*) p<0,05; (\*\*\*) p<0,001.

María Flores de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid. A cada colon se le atribuye un valor numérico utilizando los siguientes criterios: 0 para tejido sano; 1 para tejidos con inflamación moderada sin úlceras; 2 para tejidos con inflamación severa y úlceras de menos de 1 mm; 3 para tejidos con inflamación severa y úlceras de 1-3 mm; 4 para tejidos con inflamación severa y úlceras de más de 3 mm. Como se observa en la **figura 14**, la inflamación en los ratones RalGDS<sup>fl/fl</sup>/LysM-Cre<sup>+</sup> comienza antes y es más severa que en los ratones control. A día 20 observamos cómo los ratones RalGDS<sup>fl/fl</sup>/LysM-Cre<sup>+</sup> ya se han recuperado de la inflamación y tienen los mismos niveles que los ratones control a pesar de que su DAI sigue siendo mayor (figura 13). Esto último puede deberse a que no les ha dado tiempo a recuperarse tras la pérdida de peso que han tenido durante el tratamiento con DSS.

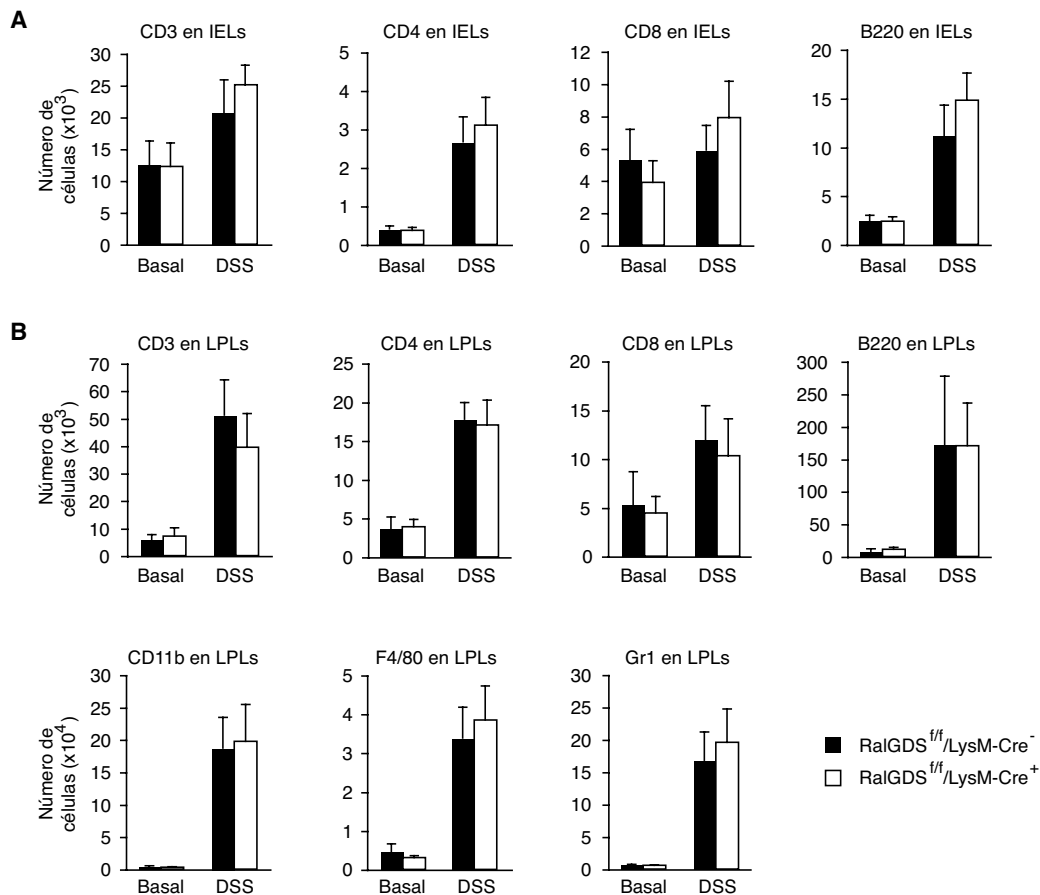
Para ver si esta diferencia en la resolución de la inflamación en el colon se debe a una diferente composición de los infiltrados inflamatorios, estudiamos los linfocitos intraepiteliales (IELs) y los de la lámina propia (LPLs). Los IELs residen en los espacios intraepiteliales del intestino, bajo las uniones estrechas y por encima de la membrana basal. La mayor parte presenta un fenotipo supresor o citotóxico activado con capacidad inmunorreguladora y proporcionan una respuesta inmediata y muy efectiva sobre células epiteliales dañadas. Su función principal es la tolerancia oral. La lámina propia, comprendida entre el epitelio y la *muscularis mucosa*, contiene células plasmáticas maduras productoras de IgA, linfocitos T (principalmente Th) y otros tipos celulares como macrófagos, células dendríticas y mastocitos. Estas poblaciones se encuentran en un estado continuo de migración, diferenciación y renovación (Ramiro-Puig *et al.*, 2008). Analizamos los linfocitos T, T cooperadores, T citotóxicos y





los linfocitos B (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y B220<sup>+</sup> respectivamente) en las poblaciones de los linfocitos intraepiteliales y en los procedentes de la lámina propia del colon y en estos últimos además estudiamos las células mieloides, los macrófagos y los granulocitos (CD11b<sup>+</sup>, F4/80<sup>+</sup> y Gr1<sup>+</sup> respectivamente) a día 10 del transcurso de la enfermedad, donde ya observamos diferencias en el DAI. Como se muestra en la **figura 15**, no encontramos diferencias en la composición de estos infiltrados, por lo que nos preguntamos si existen diferencias en la funcionalidad de estas células.

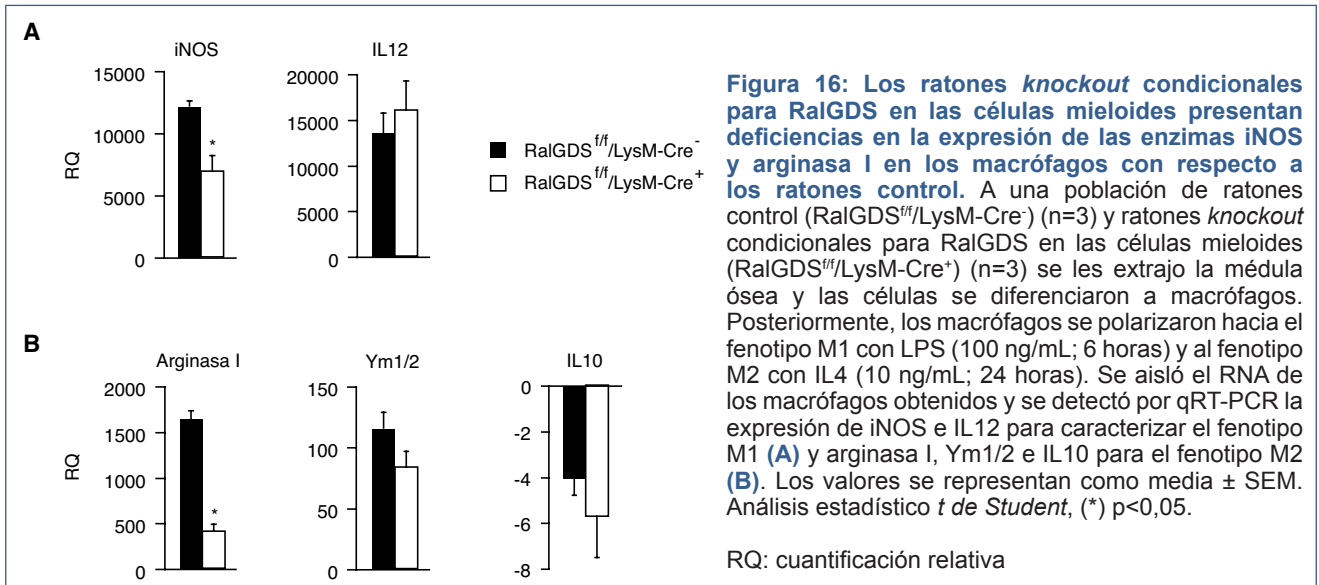
Debido a que estamos trabajando con un ratón deficiente en RalGDS en las células mieloides y que los macrófagos son células del sistema inmune que intervienen en procesos inflamatorios como los que se producen en la colitis ulcerosa, pensamos que pueden ser los responsables de los efectos descubiertos en el transcurso de la enfermedad. Los macrófagos se caracterizan por su plasticidad y pueden tener un fenotipo M1 o M2. Los macrófagos M1 son proinflamatorios y tienen una alta capacidad microbicida. Los macrófagos M2 tienen como característica general un papel opuesto a los M1, es decir, son antiinflamatorios (Mantovani *et al.*, 2007), aunque hay varios tipos dependiendo de qué moléculas expresen. El fenotipo M1 es típico de IBD (Zhang *et al.*, 2008) por lo que pensamos que una diferente polarización de los macrófagos en los ratones RalGDS<sup>ff</sup>/LysM-Cre<sup>+</sup> puede explicar su estado de inflamación en la etapa de recuperación. Para analizar esta hipótesis, analizamos la polarización de los macrófagos de los ratones RalGDS<sup>ff</sup>/LysM-Cre<sup>+</sup> *in vitro*. Para ello, aislamos células procedentes de la médula ósea, las diferenciamos a macrófagos y las polarizamos hacia los fenotipos opuestos M1, proinflamatorios, y M2, antiinflamatorios. Estos fenotipos se caracterizan por la diferente expresión de citoquinas, enzimas y moléculas por lo que analizamos su expresión por PCR cuantitativa. El perfil M1 se identifica por una expresión elevada de iNOS e IL12 y el M2 por una expresión elevada de arginasa I, Ym1/2 e IL10, que son los marcadores que se muestran en la **figura 16**. La sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS) es una enzima típica de poblaciones de macrófagos M1 ya que se encarga de la producción de óxido nítrico, una especie reactiva de nitrógeno cuyo papel en los procesos inflamatorios se centra en la destrucción de agentes nocivos. La IL12 es una citoquina que participa en infecciones microbiales. La unión a su receptor estimula el crecimiento, diferenciación y supervivencia de las células T citotóxicas (CD8<sup>+</sup>) participando también en la destrucción de agentes nocivos. Por otro lado, la enzima arginasa I es una enzima que convierte arginina en ornitina, un precursor de poliaminas y colágeno. Ym1/2 es una molécula tipo chitinasa con capacidad de unión a matriz. Ambas se clasifican como marcadores de macrófagos M2 con capacidad de regeneración de tejidos. La IL10 es una citoquina antiinflamatoria que inhibe tanto la presentación de antígeno como la consecuente liberación de citoquinas proinflamatorias



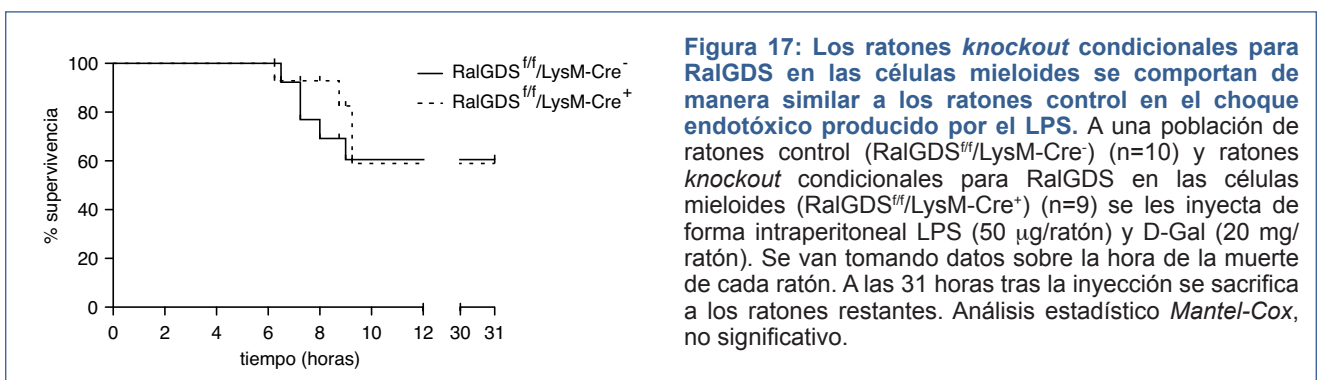
**Figura 15: Los ratones *knockout* condicionales para RaIGDS en las células mieloides no presentan diferencias en la composición de los infiltrados inflamatorios en el colon con respecto a los ratones control.** A una población de ratones control (RaIGDS<sup>f/f</sup>/LysM-Cre<sup>-</sup>) (n=8) y ratones *knockout* condicionales para RaIGDS en las células mieloides (RaIGDS<sup>f/f</sup>/LysM-Cre<sup>+</sup>) (n=8) se les suministra DSS al 3,5% en el agua de bebida durante 6 días. A día 10 se sacrifica a los ratones y se les extrae los linfocitos intraepiteliales (IELs) (A) y los de la lamina propia (LPLs) (B) del colon y se analizan por citometría de flujo las poblaciones linfoides y las mieloides. Esas poblaciones se comparan con las correspondientes a un grupo de ratones no tratados control (RaIGDS<sup>f/f</sup>/LysM-Cre<sup>-</sup>) (n=8) y ratones *knockout* condicionales para RaIGDS en las células mieloides (RaIGDS<sup>f/f</sup>/LysM-Cre<sup>+</sup>) (n=8). Los valores se representan como media ± SEM. Análisis estadístico *t* de Student, no significativo.

atenuando los procesos inflamatorios. Es típica de los macrófagos reguladores pertenecientes al fenotipo M2 (Mosser *et al.*, 2008; Sánchez-Muñoz *et al.*, 2008). La polarización *in vitro* de los macrófagos en los ratones RaIGDS<sup>f/f</sup>/LysM-Cre<sup>+</sup> revelan que tanto iNOS, marcador de macrófagos M1, como arginasa I, marcador de macrófagos M2, se expresan unas 5000 y 1000 veces menos en los ratones RaIGDS<sup>f/f</sup>/LysM-Cre<sup>+</sup> que en los control, respectivamente, pero los otros marcadores tanto de M1, IL12, como de M2, Ym1/2 e IL10, no varían su expresión. Esto nos sugiere que la polarización de los macrófagos en los ratones RaIGDS<sup>f/f</sup>/LysM-Cre<sup>+</sup> está parcialmente afectada.

La deficiente expresión de arginasa I puede estar involucrada en el continuo estado inflamado de los ratones RaIGDS<sup>f/f</sup>/LysM-Cre<sup>+</sup> debido a los efectos de esta enzima en la regeneración de tejidos. La deficiente expresión de iNOS debería influir en la inflamación en estadios tempranos de la enfermedad en los ratones RaIGDS<sup>f/f</sup>/LysM-Cre<sup>+</sup> ya que el papel de esta enzima se centra en los efectos inflamatorios del óxido nítrico y, como observamos en la figura 13, eso no es lo que sucede. Para comprobar qué ocurre con los macrófagos M1 en los ratones RaIGDS<sup>f/f</sup>/LysM-Cre<sup>+</sup>, estudiamos la reacción que se produce como consecuencia de una inyección intraperitoneal de LPS que provoca una sobreproducción letal de TNF $\alpha$ . El modelo de choque séptico inducido por LPS es un modelo establecido para la inflamación sistémica en donde los macrófagos son la fuente principal de citoquinas proinflamatorias responsables

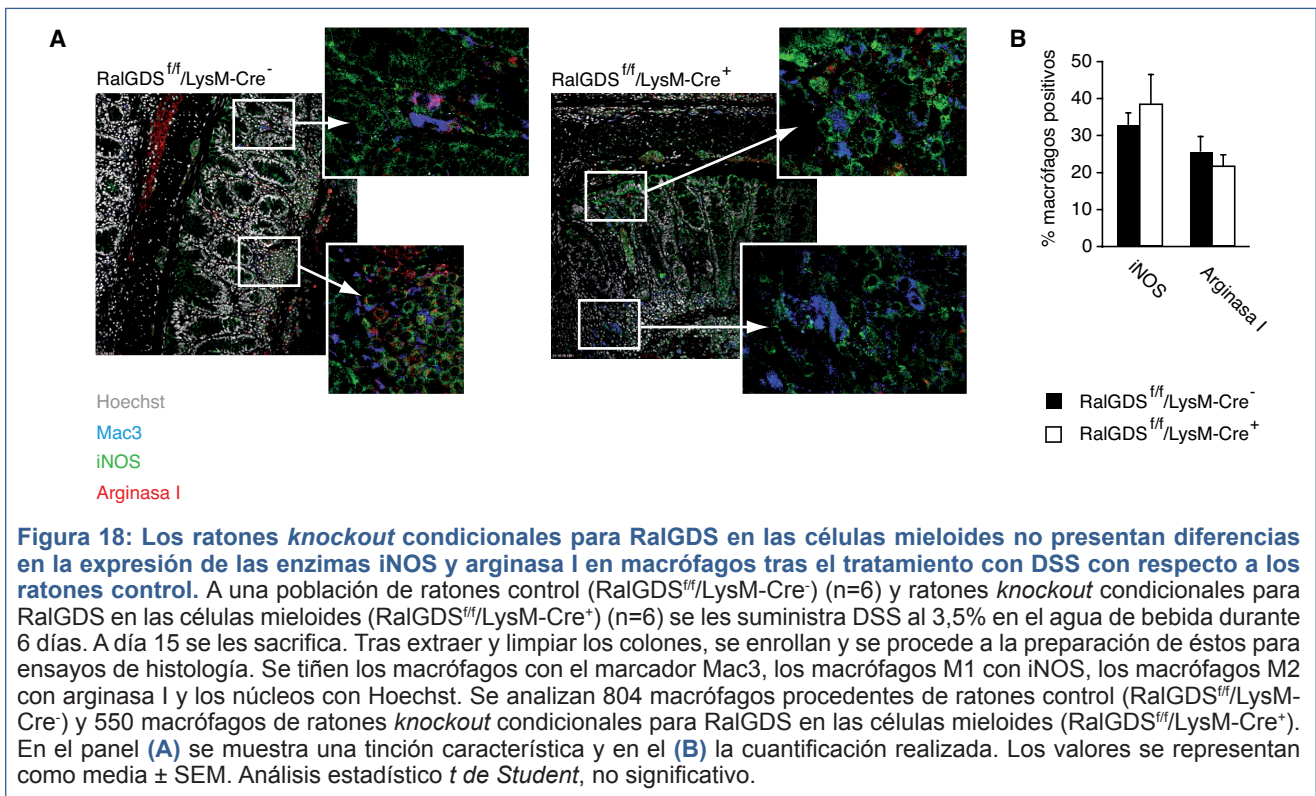


del efecto letal (Agelaki *et al.*, 2002). TNF $\alpha$  es una citoquina proinflamatoria considerada como la mayor mediadora de la inflamación en el intestino (Roberts-Thomson *et al.*, 2011). Se encarga del reclutamiento de leucocitos, del aumento de la permeabilidad vascular, del aumento de la permeabilidad intestinal y de la activación de células inmunes y promoción de citoquinas proinflamatorias (Bradley, 2008). Con el ensayo de choque séptico podemos comprobar la funcionalidad de los macrófagos de fenotipo M1. Como se observa en la **figura 17**, los ratones RalGDS<sup>fl/fl</sup>/LysM-Cre<sup>+</sup> se comportan de la misma forma que los ratones control al choque endotóxico producido por LPS, sugiriendo que RalGDS no interfiere en la funcionalidad de macrófagos con características proinflamatorias. Este hecho coincide con los efectos vistos en la inflamación aguda (figura 13), en estadios tempranos no hay diferencias en inflamación entre los ratones RalGDS<sup>fl/fl</sup>/LysM-Cre<sup>+</sup> y los ratones control.

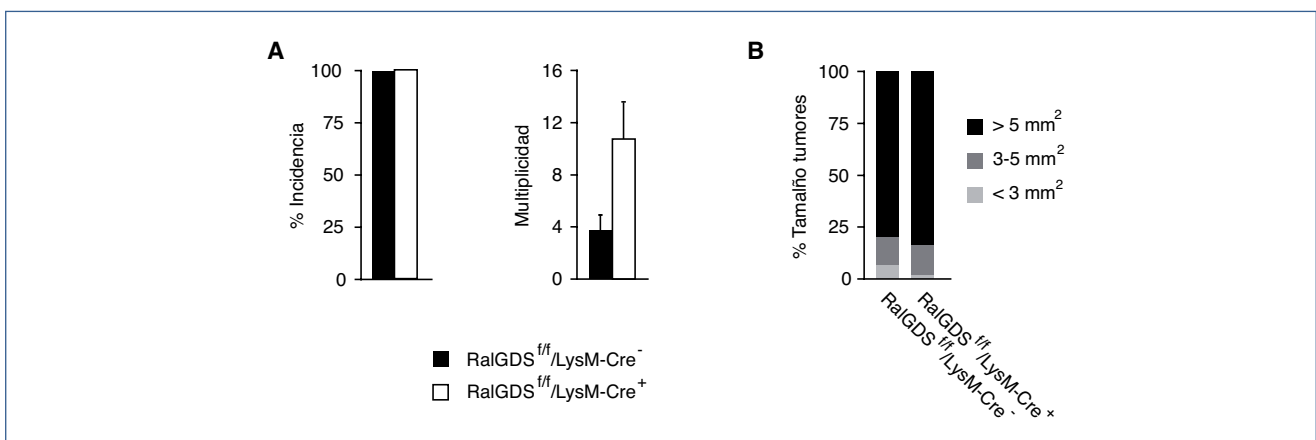


Para determinar si estos defectos en la expresión de iNOS y arginasa I de los macrófagos ocurren también *in situ* y explican el estado de inflamación en los ratones RalGDS<sup>fl/fl</sup>/LysM-Cre<sup>+</sup>, realizamos un estudio histológico en el colon de los ratones sometidos al tratamiento con DSS. La **figura 18** muestra los resultados de estas tinciones. Como se puede apreciar, no hay diferencias en la expresión de estas enzimas a día 15, donde la diferencia en la inflamación es evidente (figura 13). Esto puede deberse a la dificultad de encontrar el momento en el que la expresión de estas enzimas sea esencial en el apropiado funcionamiento del colon.

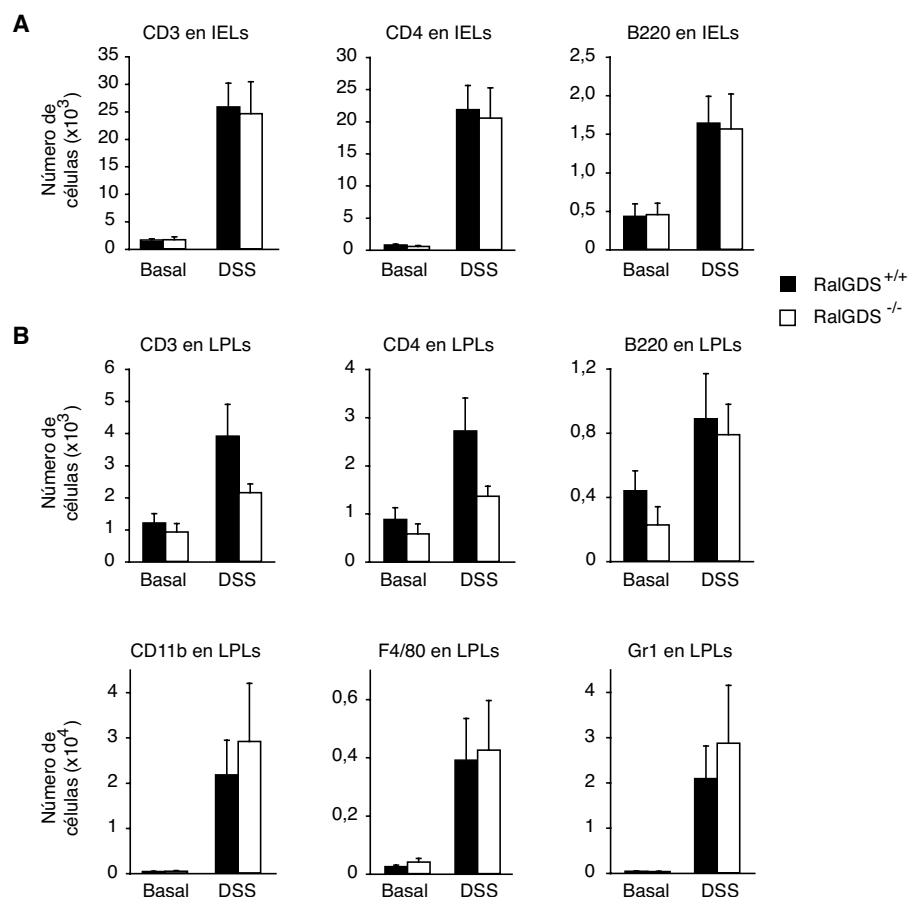
Por último, hemos estudiado si el incremento en la inflamación observada en los ratones RalGDS<sup>fl/fl</sup>/LysM-Cre<sup>+</sup> conduce a un aumento en el desarrollo de tumores ya que, como se ha comentado en la



introducción, enfermedades inflamatorias crónicas en el colon se correlacionan con la aparición de tumores. En la **figura 19** se muestran los resultados de un primer ensayo tras la inyección de azoximetano y 4 ciclos de DSS/agua. Como se observa, la incidencia, la multiplicidad y el tamaño de los tumores en los rangos estudiados son iguales en ambos ratones. Examinando más detalladamente los datos de multiplicidad, observamos que, a pesar de no haber diferencias (los datos se encuentran en el límite de la significancia debido, probablemente, al escaso número de ratones que se pudieron analizar a término del experimento) los ratones RalGDS<sup>fl/fl</sup>/LysM-Cre<sup>+</sup> desarrollan más tumores, sugiriendo que existe una tendencia a que la mayor inflamación en el colon de los ratones RalGDS<sup>fl/fl</sup>/LysM-Cre<sup>+</sup> provoque un mayor desarrollo en el número de tumores. Para corroborar este resultado, estamos a la espera de otro experimento que nos ayude a clarificar el efecto.



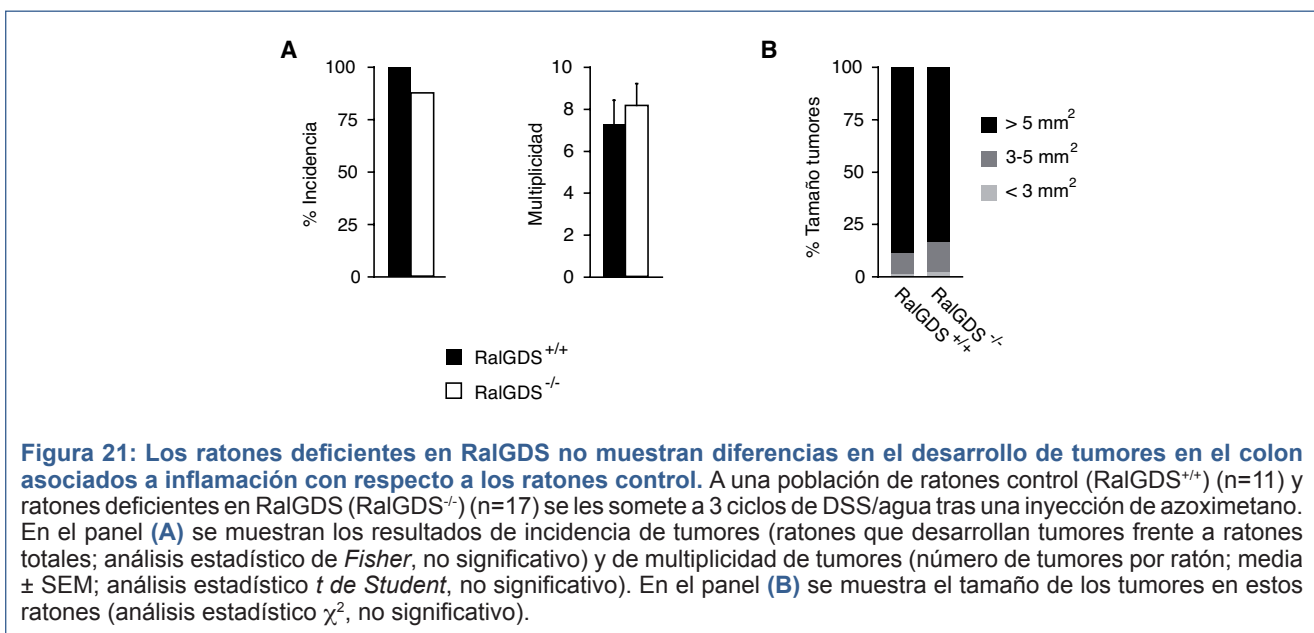
Los datos obtenidos hasta el momento nos indican que RalGDS no regula la inflamación aguda ni la formación de tumores de colon asociados a inflamación a través del epitelio. Su papel en las células mieloides se encuentra en la resolución de la inflamación del colon y este aumento en la inflamación parece que conduce a un aumento en el desarrollo de tumores de colon asociados a inflamación. A pesar de estos datos, todavía no sabemos por qué el ratón deficiente en RalGDS apenas enferma en la inflamación aguda más allá del hecho de que las células mieloides no son las responsables. Por tanto, para averiguar a qué se debe el efecto de RalGDS en la inflamación del colon estudiamos la composición de los infiltrados inflamatorios en el colon en los ratones RalGDS<sup>-/-</sup> y los ratones control RalGDS<sup>+/+</sup> a día 8, donde ya existen diferencias en el DAI. Analizamos tanto los linfocitos intraepiteliales (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y B220<sup>+</sup>) como los linfocitos de la lámina propia del colon (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, F4/80<sup>+</sup> y Gr1<sup>+</sup>). Como se muestra en la **figura 20**, los linfocitos intraepiteliales no presentan diferencias en composición. En cambio, los linfocitos CD3<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> procedentes de la lámina propia del colon se encuentran en menor cuantía en los ratones RalGDS<sup>-/-</sup>. A pesar de que la disminución no es significativa, este resultado podría explicar la diferencia en inflamación de la figura 9. Los linfocitos CD4 son las células reguladoras más importantes en los procesos inmunes. En IBD, tienen un papel principal en el mantenimiento de la inflamación crónica (Podolsky, 2002). En la colitis ulcerosa se ha observado que la respuesta adaptativa característica es la Th2 que genera TGFβ e IL5 produciendo una inflamación difusa y úlceras superficiales (Waldner *et al.*, 2009). Una menor cantidad de células CD4<sup>+</sup> podría explicar la ausencia de inflamación en los ratones RalGDS<sup>-/-</sup>.



**Figura 20: Los ratones deficientes en RalGDS muestran una disminución en la composición de linfocitos CD3 y CD4 en la lámina propia del colon con respecto a los ratones control.** A una población de ratones control (RalGDS<sup>+/+</sup>) (n=8) y ratones deficientes en RalGDS (RalGDS<sup>-/-</sup>) (n=8) se les suministra DSS al 3,5% en el agua de bebida durante 6 días. A día 8 se sacrifica a los ratones y se les extrae los linfocitos intraepiteliales (IELs) (**A**) y los de la lámina propia (LPLs) (**B**) del colon y se analizan por citometría de flujo las poblaciones linfocíticas y las mieloides. Esas poblaciones se comparan con las correspondientes a un grupo de ratones no tratados control (RalGDS<sup>+/+</sup>) (n=8) y ratones deficientes en RalGDS (RalGDS<sup>-/-</sup>) (n=8). Los valores se representan como media ± SEM. Análisis estadístico *t de Student*, no significativo (p=0,1328 en CD3 DSS de LPLs; p=0,0982 en CD4 DSS de LPLs).

Para ayudarnos a averiguar el efecto que tiene RalGDS en los linfocitos CD4 en la inflamación aguda del colon debemos utilizar otro tipo de ratones *knockout* condicionales, los RalGDS<sup>fl/fl</sup>/hCD2-iCre<sup>+</sup>. Estos ratones expresan la recombinasa Cre bajo el promotor de CD2, de forma que la deficiencia de RalGDS se encuentra en los linfocitos T y B (de Boer *et al.*, 2003). Estos experimentos están a la espera de ser realizados.

Por último, hemos querido comprobar si las menores condiciones inflamatorias observadas en los ratones RalGDS<sup>-/-</sup> conducen a un menor desarrollo de tumores de colon asociados a inflamación. En la **figura 21** se muestran los resultados de estos experimentos. Tras una inyección de azoximetano y 3 ciclos de DSS/agua no encontramos diferencias ni en incidencia, ni en multiplicidad, ni en tamaño de tumores entre los ratones RalGDS<sup>-/-</sup> y los ratones control. Por lo tanto, la menor inflamación producida en ratones deficientes de RalGDS no produce un menor desarrollo de tumores de colon.



# **RalGDS en el desarrollo de la célula T en el timo**

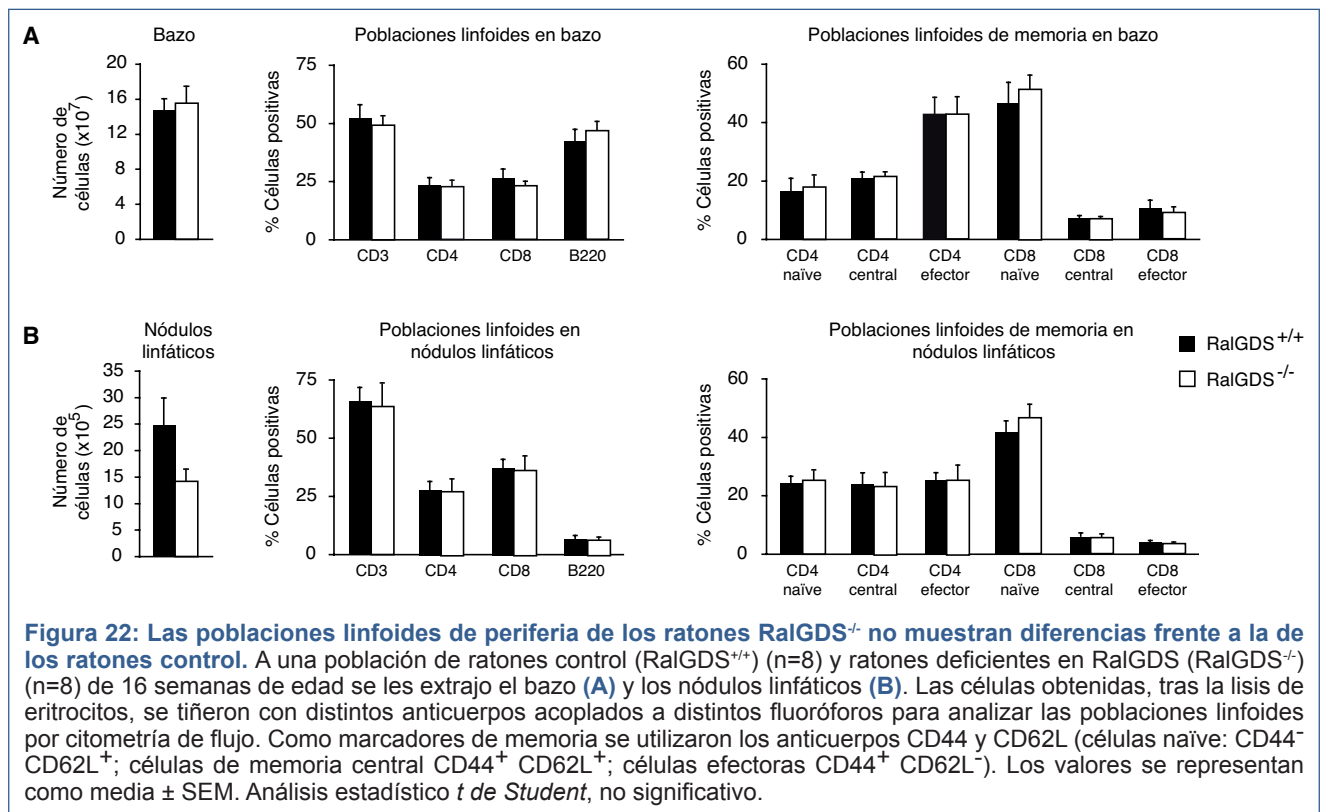




◆ El sistema inmune en ratones RalGDS<sup>-/-</sup>

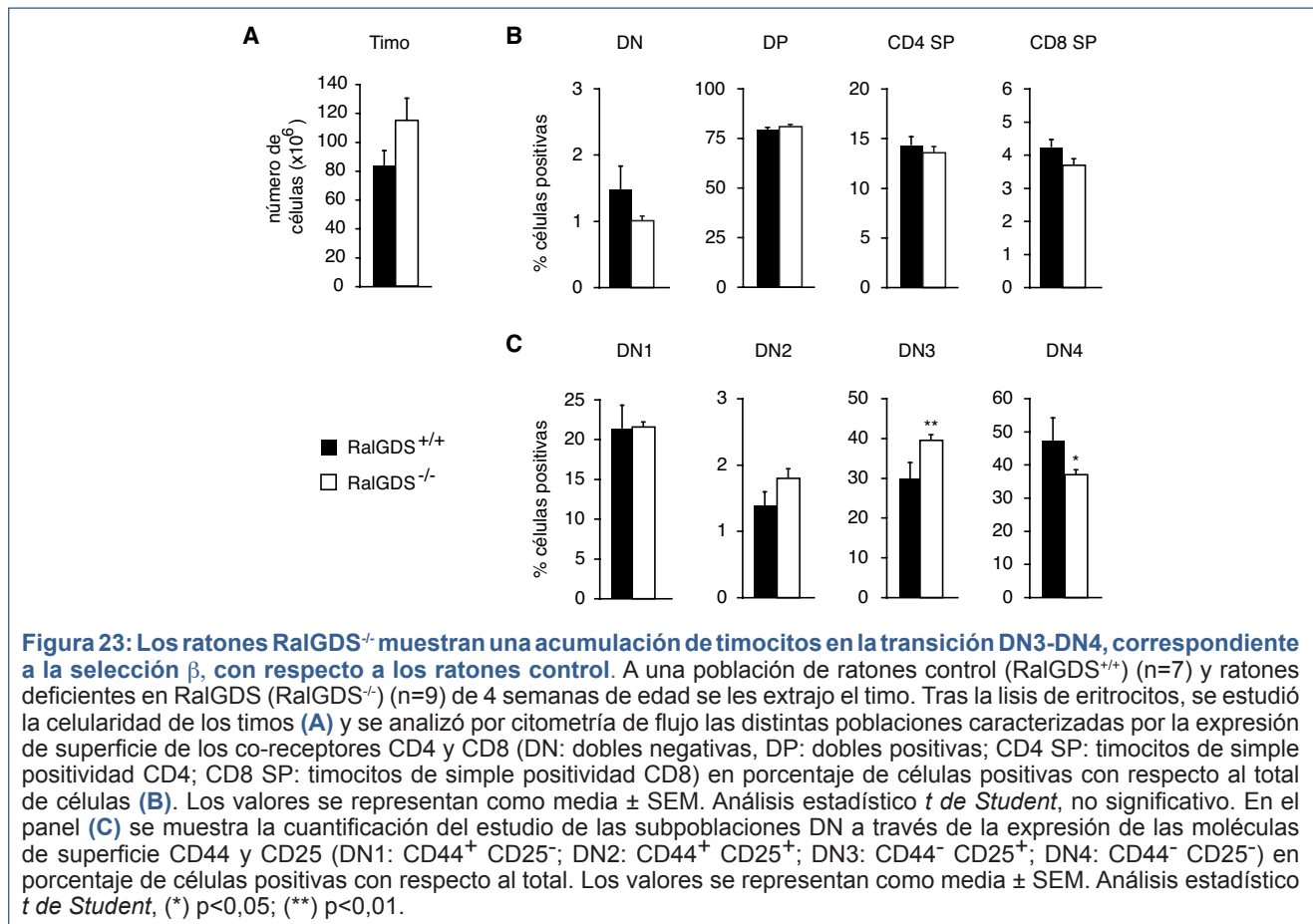
En el apartado anterior hemos observado que RalGDS es necesario en la respuesta inflamatoria que se produce en el colon tras la inducción de inflamación aguda por DSS (figura 9). La composición de los infiltrados inflamatorios del colon (figura 19) sugiere que se debe a una función, todavía por esclarecer, de RalGDS en los linfocitos CD4<sup>+</sup> de la lámina propia. Además, estudios previos de nuestro grupo han demostrado que las GTPasas Ral se activan tras la estimulación del TCR y modulan la citotoxicidad en las células CD8<sup>+</sup> y NKs regulando el ensamblaje del exocisto necesario para la degranulación (Sánchez-Ruiz *et al.*, 2011; Sánchez-Ruiz, 2011). Por estos motivos pensamos que la ruta RalGDS/Ral ejerce un papel en el sistema inmune.

Como primera aproximación, hemos realizado un estudio de las poblaciones hematopoyéticas tanto en la periferia como en el timo de ratones RalGDS<sup>-/-</sup>. Hemos analizado los linfocitos T (CD3<sup>+</sup>), las células T cooperadoras (CD4<sup>+</sup>), las citotóxicas (CD8<sup>+</sup>), los linfocitos B (B220<sup>+</sup>) y las células T de memoria en bazo y nódulos linfáticos. Los marcadores de superficie CD44 y CD62L definen las poblaciones de memoria en las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de la siguiente manera: las células naïve son células CD44<sup>-</sup> y CD62L<sup>+</sup>; las células de memoria central son CD44<sup>+</sup> y CD62L<sup>+</sup>; y las células efectoras son CD44<sup>+</sup> y CD62L<sup>-</sup>. Los linfocitos naïve son aquellos que aún no han encontrado al antígeno. Una vez activados, proliferan y generan una población de células efectoras que migran hacia los tejidos inflamados y ejercen su acción. Una fracción de estas células permanece como células de memoria circulantes y confieren protección. Tras un segundo encuentro con el antígeno dan una respuesta rápida y efectiva (Sallusto *et al.*, 1999). Como se aprecia en la **figura 22** no existen diferencias en ninguna de las poblaciones mencionadas entre los ratones RalGDS<sup>-/-</sup> y los ratones control RalGDS<sup>+/+</sup>.



El estudio del timo indica que los ratones RalGDS<sup>-/-</sup> tienen el mismo número de células que los ratones control (**figura 23A**). En el análisis del desarrollo de los timocitos a través de la expresión de superficie de los co-receptores CD4 y CD8 (**figura 23B**) se observa que no hay diferencias en las proporciones de las poblaciones dobles negativas (DN), dobles positivas (DP) y de una sola positividad (CD4 SP y CD8 SP). Si examinamos más detalladamente el desarrollo de los timocitos en las células DN a través de la expresión de superficie de las moléculas CD44 y CD25 (**figura 23C**) observamos que las células de ambos ratones migran de la misma manera al timo (DN1) pero hay una mayor proporción

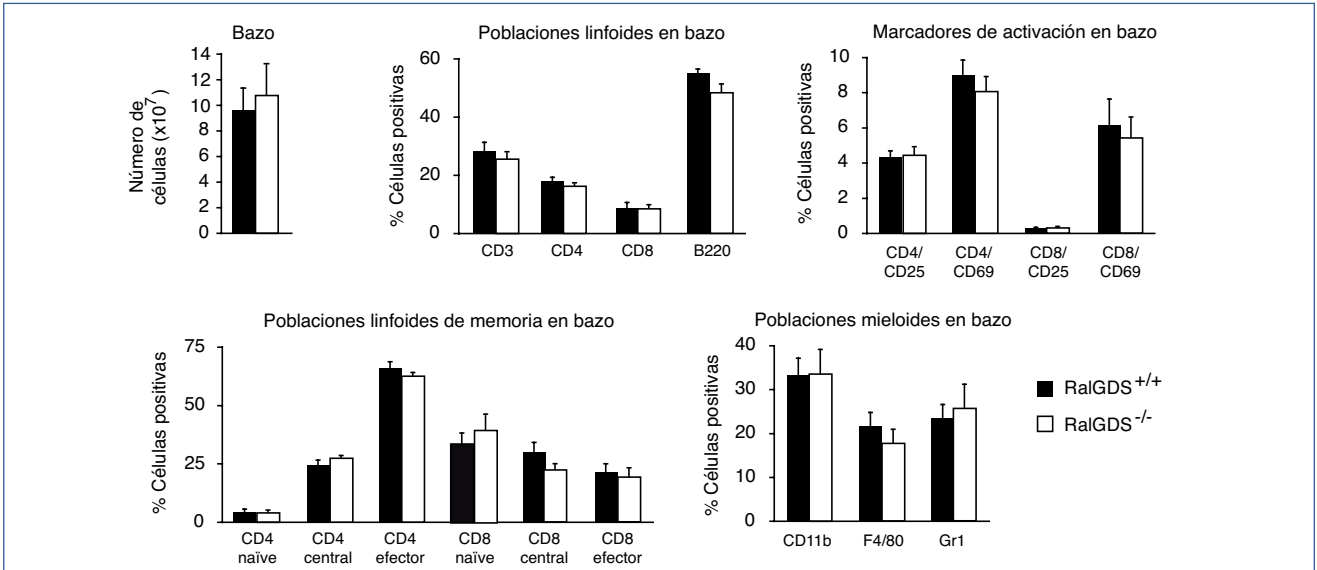
de células en la subpoblación DN3 en los ratones *RalGDS*<sup>-/-</sup>, con una consiguiente disminución en la proporción de células en la subpoblación DN4, lo que implicaría que se está produciendo un bloqueo en el desarrollo, en concreto en la selección  $\beta$ . A pesar de ello, este bloqueo no conlleva a una desregulación en la proporción de células maduras DP y SP.



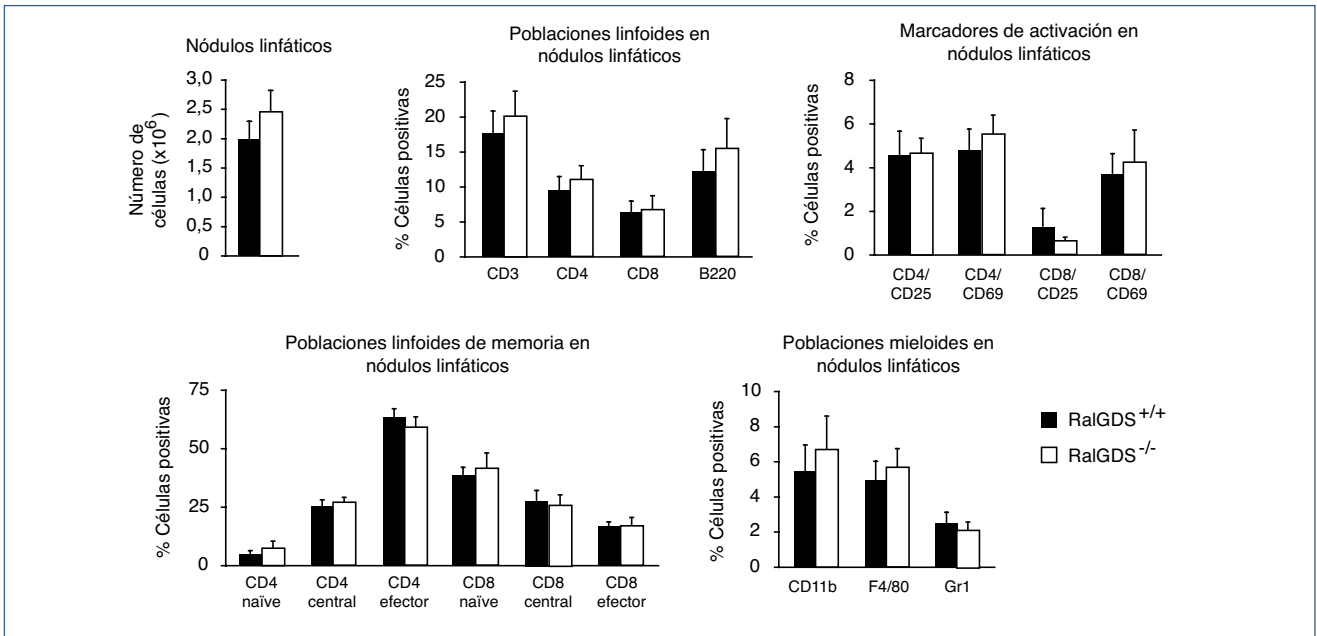
Analizamos las poblaciones hematopoyéticas en ratones *RalGDS*<sup>-/-</sup> de dos años de edad. En estos ratones envejecidos, el análisis de linfocitos T (CD3<sup>+</sup>), células T cooperadoras (CD4<sup>+</sup>), citotóxicas (CD8<sup>+</sup>), linfocitos B (B220<sup>+</sup>), células T de memoria (naïve, central y efectoras en las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>), células mieloides (CD11b<sup>+</sup>), macrófagos (F4/80<sup>+</sup>) y granulocitos (Gr1<sup>+</sup>) y el análisis de la activación de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> a través de los marcadores CD25 y CD69 muestran que los ratones *RalGDS*<sup>-/-</sup> no tienen deficiencias ni en bazo (**figura 24**) ni en nódulos linfáticos (**figura 25**) con respecto a los ratones control.

### ◆ Desarrollo de la célula T en el timo de ratones *RalGDS*<sup>-/-</sup>xOT-I

A pesar de no encontrar diferencias en ratones envejecidos, la acumulación de células en la subpoblación DN3 indica que hay un problema en el desarrollo de las células T en el timo. Es difícil evaluar los procesos de selección tímica en ratones que expresan TCRs policlonales, por tanto cruzamos nuestros ratones *RalGDS*<sup>-/-</sup> con ratones OT-I. Estos ratones tienen un TCR transgénico que reconoce un péptido de ovoalbúmina en el contexto de MHC de clase I que dirige hacia el linaje CD8. En este modelo de ratón el repertorio de TCRs está limitado por lo que su uso es útil en este tipo de estudios. En la **figura 26A** se muestra la celularidad de los timos de los ratones *RalGDS*<sup>-/-</sup>xOT-I con respecto a los control, no habiendo diferencias. El análisis de las poblaciones DN, DP y SP nos muestra una acumulación de células DP con el consiguiente descenso de las CD4 SP y CD8 SP (**figura 26B y 26C**). Este descenso es más acusado en el caso de los timocitos CD8 SP debido a que tienen un TCR restringido a MHC de clase I. Los resultados implican que hay un bloqueo en el desarrollo de los timocitos en el estadio DP.

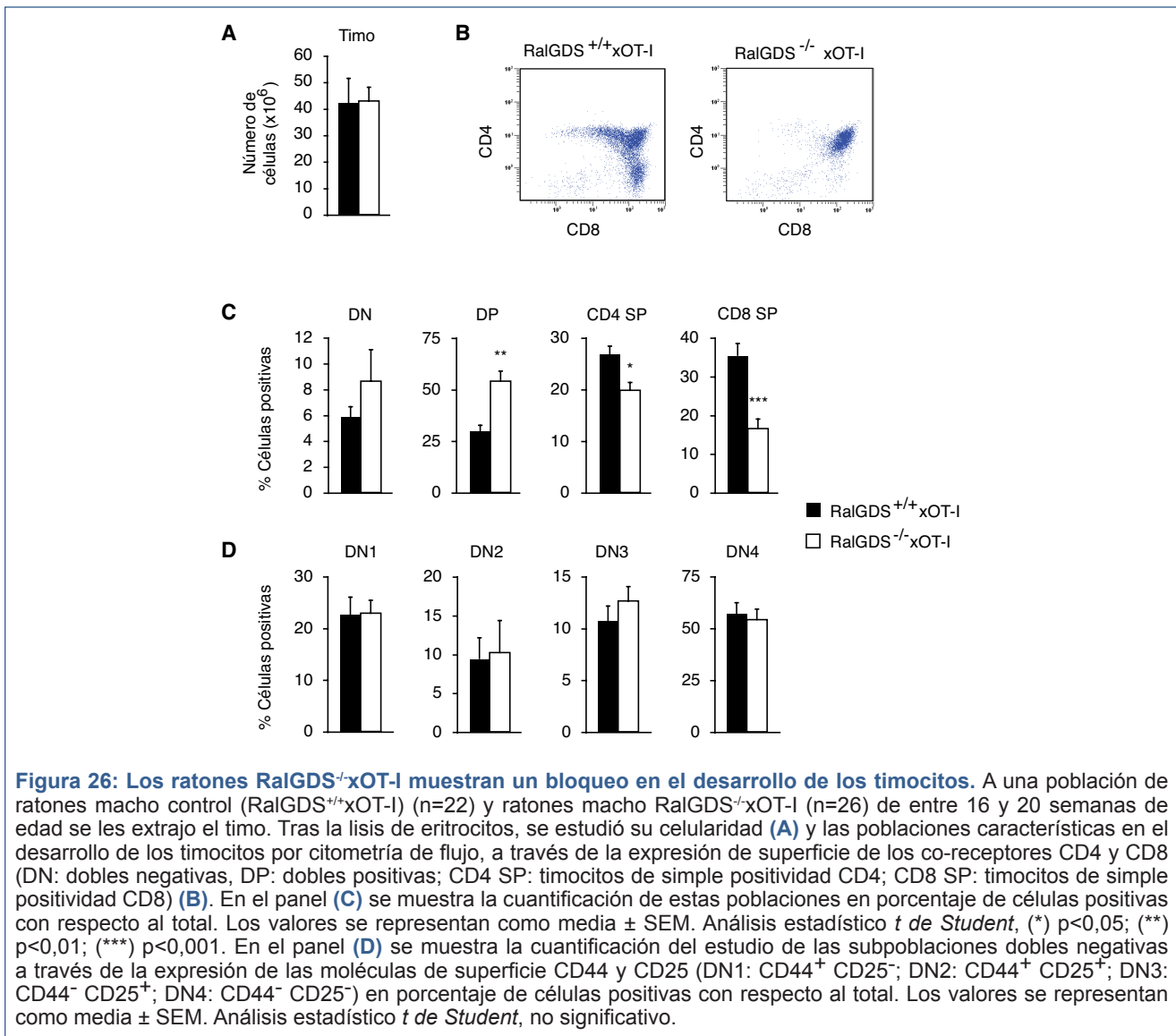


**Figura 24: Las poblaciones hematopoyéticas en bazo de ratones *RalGDS*<sup>-/-</sup> envejecidos no presentan diferencias frente a la de los ratones control.** A una población de ratones control (*RalGDS*<sup>+/+</sup>) (n=10) y ratones deficientes en *RalGDS* (*RalGDS*<sup>-/-</sup>) (n=10) de 24 meses de edad se les extrajo el bazo. Las células obtenidas, tras la lisis de eritrocitos, se tiñeron con distintas combinaciones de anticuerpos acoplados a distintos fluoróforos para analizar las poblaciones hematopoyéticas por citometría de flujo. Como marcadores de memoria se utilizaron los anticuerpos CD44 y CD62L (células naïve: CD44<sup>-</sup> CD62L<sup>+</sup>; células de memoria central CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>; células efectoras CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup>) y como marcadores de activación, CD25 y CD69. Los valores se representan como media ± SEM. Análisis estadístico *t* de Student, no significativo.



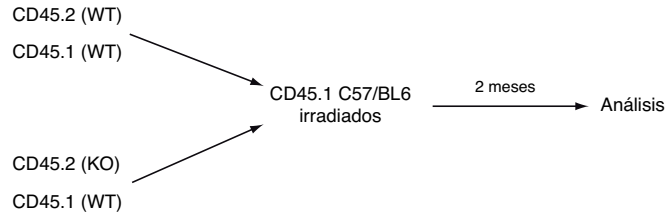
**Figura 25: Las poblaciones hematopoyéticas en nódulos linfáticos de ratones *RalGDS*<sup>-/-</sup> envejecidos no presentan diferencias frente a la de los ratones control.** A una población de ratones control (*RalGDS*<sup>+/+</sup>) (n=10) y ratones deficientes en *RalGDS* (*RalGDS*<sup>-/-</sup>) (n=10) de 24 meses de edad se les extrajeron los nódulos linfáticos. Las células obtenidas se tiñeron con distintas combinaciones de anticuerpos acoplados a distintos fluoróforos para analizar las poblaciones hematopoyéticas por citometría de flujo. Como marcadores de memoria se utilizaron los anticuerpos CD44 y CD62L (células naïve: CD44<sup>-</sup> CD62L<sup>+</sup>; células de memoria central CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>; células efectoras CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup>) y como marcadores de activación, CD25 y CD69. Los valores se representan como media ± SEM. Análisis estadístico *t* de Student, no significativo.

Si analizamos las subpoblaciones DN (**figura 26D**), vemos que, al igual que en el ratón  $RalGDS^{-/-}$ , la migración de las células al timo es normal (DN1), pero en este caso no observamos una acumulación de células en la subpoblación DN3.



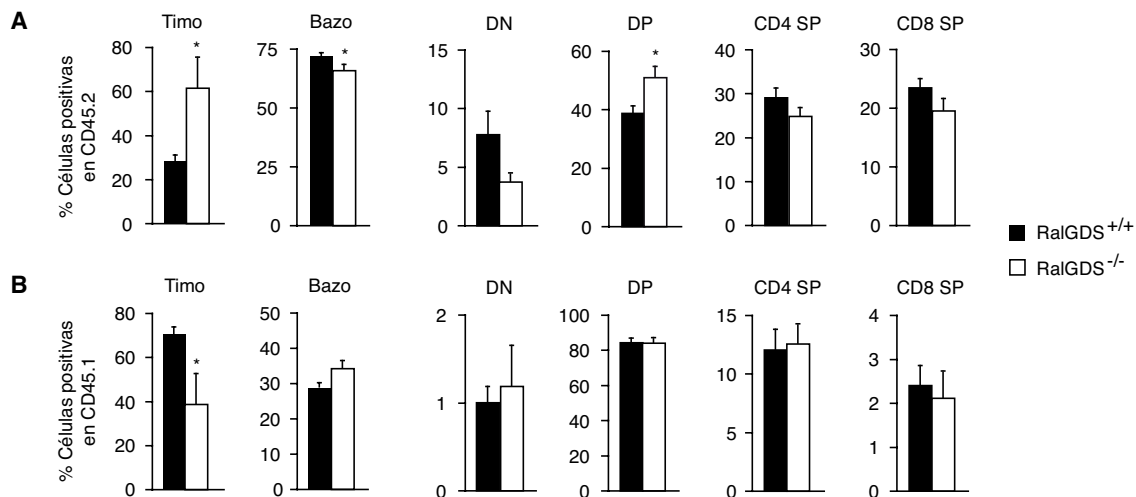
¿El bloqueo observado en la población DP se debe a un efecto intrínseco de la célula T o a un efecto del epitelio tímico que no proporciona las señales necesarias para estimular la diferenciación de la célula T? Para responder a esta pregunta debemos realizar un ensayo de reconstitución de médula ósea de forma que podamos discriminar quién es el responsable de esta deficiente maduración de la célula T, si la propia célula T o el epitelio tímico. Para ello utilizamos ratones cuyas células T sean distintas a la de los ratones OT-I. Nuestros ratones OT-I son C57BL/6x129 y tienen el alelo CD45.2 (Ly5.2) por lo que utilizamos ratones con alelos CD45.1 (Ly5.1) como ratones recipientes a los que les vamos a transferir la médula de los CD45.2 una vez hayan sido irradiados. El epitelio tímico de los ratones recipientes CD45.1 es *wild type* por lo que se elimina la contribución del epitelio tímico de los ratones OT-I a la diferenciación de los timocitos, pudiéndose esclarecer dónde se encuentra la causa del déficit. En el **esquema 2** se muestra el protocolo utilizado en este experimento.

Las células a transferir procedentes de ratones CD45.2 (de ratones  $RalGDS^{+/+}xOT-I$  o  $RalGDS^{-/-}xOT-I$ ) se mezclan con células de ratones CD45.1 para realizar un control interno de la reconstitución (Lesourne *et al.*, 2009; Clements *et al.*, 2006). En la **figura 27** se encuentran las poblaciones principales del timo de los ratones utilizados en el ensayo tras dos meses de reconstitución. En el panel (**A**) se



**Esquema 2: Protocolo experimental utilizado para el ensayo de reconstitución de médula ósea.** A los ratones recipientes CD45.1, tras ser irradiados a 10Gy, se les transfiere médula ósea extraída de los ratones donadores CD45.2 RalGDS<sup>+/+</sup>xOT-I (WT) y RalGDS<sup>-/-</sup>xOT-I (KO). Las células procedentes de ratones WT o KO se mezclan, en proporción 1:1, con células de la médula ósea de un ratón CD45.1, de forma que se inyectan por vía intravenosa 2x10<sup>6</sup> células en los ratones recipientes. Tras dos meses de reconstitución se sacrifica a los ratones y se analizan las poblaciones del timo. Como control de que la irradiación es efectiva, a uno de los animales irradiados no se le inocula células de médula ósea. Este ratón muere a los 10 días aproximadamente.

muestran las células CD45.2, que proceden de los ratones RalGDS<sup>+/+</sup>xOT-I y RalGDS<sup>-/-</sup>xOT-I. En este caso observamos que en las células RalGDS<sup>-/-</sup>xOT-I se reproducen los efectos vistos en la figura 26, hay una acumulación de células DP con una consiguiente disminución de células SP (aunque esta disminución no es significativa debido, probablemente, al número de ratones examinados) indicando que el epitelio tímico no es el responsable de esta deficiente maduración de la célula T y confirmando que el bloqueo se debe a un defecto de la célula T. Como control de la reconstitución analizamos las células CD45.1 (**figura 27B**) y observamos que los timocitos se desarrollan de la misma manera en ratones reconstituidos con médula procedente de ratones control que aquellos con médula de ratones RalGDS<sup>-/-</sup>xOT-I. Como curiosidad observamos que las células CD45.2 se acumulan en el timo y, por consiguiente, hay una menor proporción en la periferia. Esto puede deberse a que, al no terminar correctamente el proceso de diferenciación en el timo, estas células no están preparadas para salir de él y, por tanto, se quedan recluidas en este órgano.



**Figura 27: El bloqueo en el desarrollo de los timocitos en los ratones RalGDS<sup>-/-</sup>xOT-I se debe a un defecto intrínseco de la célula T y no a una deficiente estimulación por parte del epitelio tímico.** A una población de ratones CD45.1, tras irradiarlos, se les transfirió médula ósea de ratones control RalGDS<sup>+/+</sup>xOT-I (n=5) y RalGDS<sup>-/-</sup>xOT-I (n=4), ambos CD45.2, junto con médula ósea de otro ratón CD45.1, en proporción 1:1. Tras dos meses de reconstitución se les extrajo el timo. Tras la lisis de eritrocitos, se estudió por citometría de flujo las poblaciones características en el desarrollo de los timocitos (DN, DP, CD4 SP y CD8 SP), tanto en las células CD45.2 (**A**) como en las CD45.1 (**B**). Los valores se representan como media ± SEM. Análisis estadístico *t* de Student, (\*) p<0,05.

### ◆ Estudio de la selección positiva en ratones $RalGDS^{-/xOT-I}$

El incremento de células DP y disminución de CD8 SP observados en la figura 26 nos sugieren que hay un problema en la transición DP-SP de los timocitos de los ratones  $RalGDS^{-/xOT-I}$  que corresponde con la selección positiva. La selección positiva se da en timocitos DP que ya tienen correctamente reorganizadas y ensambladas las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR. Este TCR va a reconocer péptidos presentados por MHCs propios de forma que los timocitos que sobrevivan a este punto de control van a continuar la diferenciación hacia estados SP. Durante este proceso de selección positiva los niveles de expresión de CD5, CD69 y TCR $\beta$  se regulan de forma muy estricta (von Boehmer *et al.*, 1994; Hare *et al.*, 1998; Vanhecke *et al.*, 1997). CD5 es un marcador de células T y B maduras. En timocitos DN o inmaduros su expresión es baja, mientras que aumenta en las poblaciones maduras DP y SP gracias a la señalización del TCR originada por ligandos de selección positiva o negativa (Azzam *et al.*, 1998). Al analizar las poblaciones involucradas en la transición DP-SP, es decir, en los timocitos DP, CD4 SP, CD8 SP y la población de transición CD4CD8<sup>int</sup> que se origina antes de la elección del linaje CD4 o CD8 (Brugnera *et al.*, 2000; Lucas *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1995), observamos cómo los ratones  $RalGDS^{-/xOT-I}$  expresan menos CD5 de superficie en la población CD8 SP (**figura 28A**). CD69 se utiliza como marcador de selección positiva ya que aumenta su expresión de superficie en los timocitos que están siendo seleccionados positivamente o que han sido seleccionados recientemente (Yamashita *et al.*, 1993). Como muestra la **figura 28B**, las poblaciones DP, CD4CD8<sup>int</sup>, CD4 SP y CD8 SP tienen niveles de superficie significativamente menores de CD69. Ambos resultados indican que hay un defecto en selección positiva.

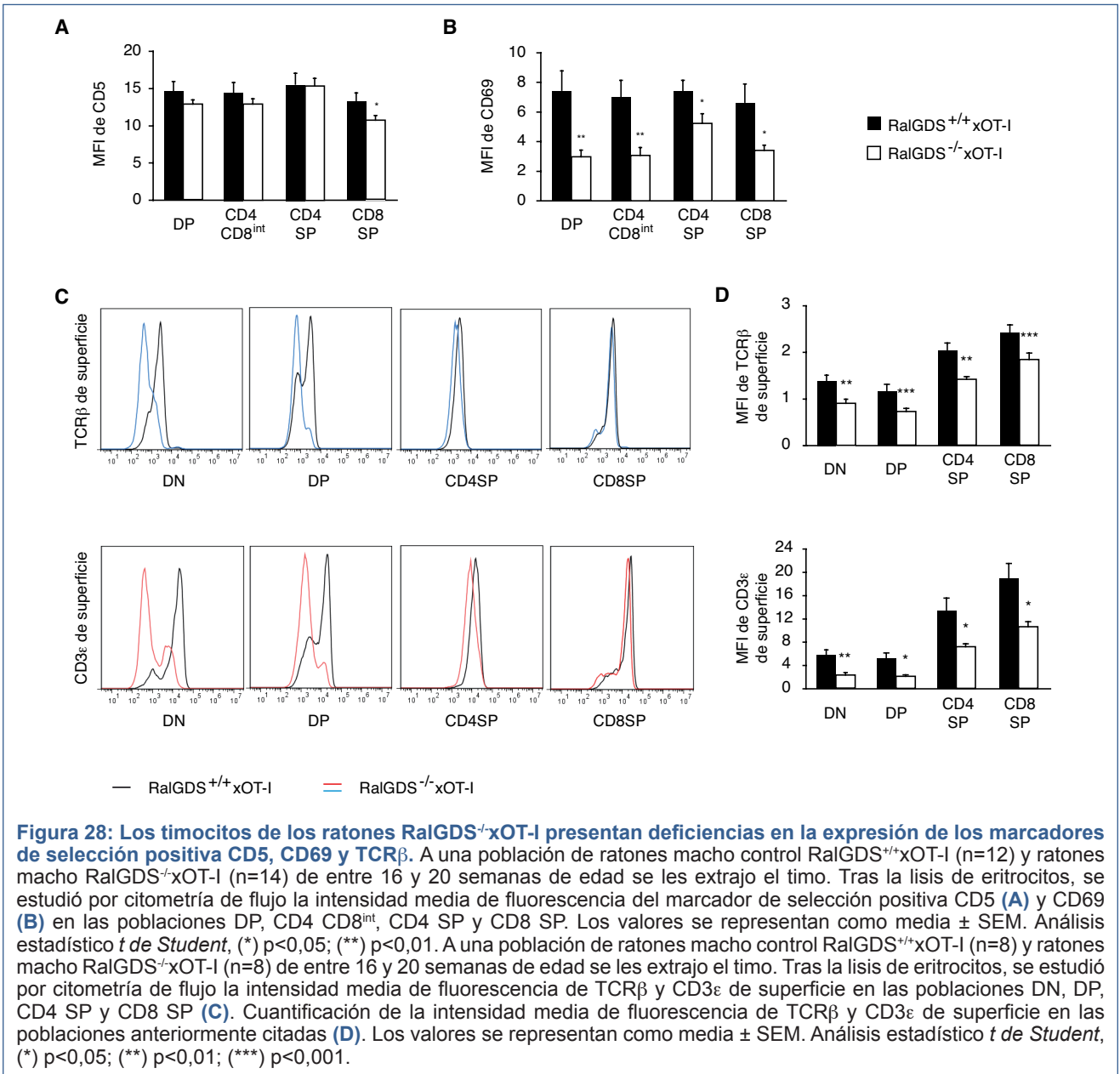
Los timocitos que se han seleccionado positivamente disminuyen la expresión de uno de los dos correceptores a la vez que aumentan la expresión de TCR (Bluestone *et al.*, 1987) y de CD3 por lo que la expresión del receptor TCR-CD3 es otro marcador de selección positiva. Analizamos la expresión de este receptor a través de las cadenas  $\epsilon$  de CD3 y  $\beta$  de TCR en la superficie de los timocitos procedentes de ratones  $RalGDS^{-/xOT-I}$  y ratones control en las poblaciones DN, DP, CD4 SP y CD8 SP (**figura 28C** y **28D**). Como se puede observar, los niveles de estas cadenas son significativamente menores en todas las poblaciones de los ratones  $RalGDS^{-/xOT-I}$  que de los control indicando, de nuevo, que los ratones  $RalGDS^{-/xOT-I}$  presentan defectos en la selección positiva.

### ◆ Análisis del papel de Ral en la expresión de membrana del receptor TCR-CD3

El análisis de la expresión de superficie de CD5, de CD69 y del receptor TCR-CD3 indica que existen problemas en la selección positiva de los timocitos de los ratones  $RalGDS^{-/xOT-I}$ . Sin embargo, nuestro modelo animal carece de la proteína RalGDS encargada de la activación de la GTPasa Ral. Esta GTPasa está involucrada en procesos de exocitosis, lo que nos lleva a pensar que puede ser la causa de la disminución de superficie del receptor y, por tanto, de los defectos observados en selección positiva.

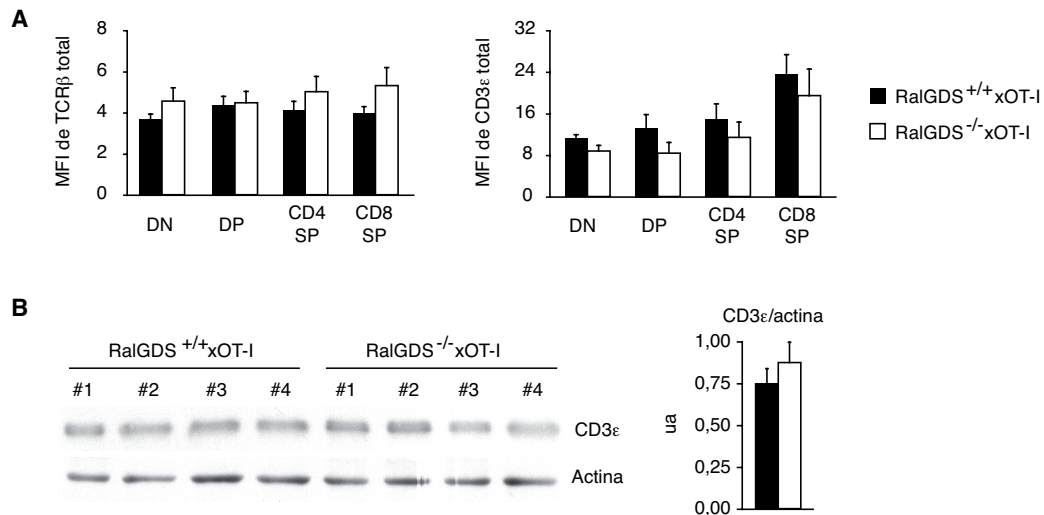
Para comprobar que los ratones  $RalGDS^{-/xOT-I}$  tienen una menor expresión del receptor TCR-CD3 en membrana y no una menor expresión total, realizamos un estudio de la cantidad total de las cadenas  $\epsilon$  de CD3 y  $\beta$  de TCR por citometría de flujo, tras permeabilizar las células, (**figura 29A**) y observamos que los niveles se igualan a los de los control. A pesar de ello la expresión de CD3 $\epsilon$  en los ratones  $RalGDS^{-/xOT-I}$  siempre está por debajo de la de los control en todas las poblaciones analizadas. Para confirmar este resultado, realizamos un *Western blot* de los niveles totales de CD3 $\epsilon$  de los lisados proteicos de los mismos ratones utilizados en citometría y demostramos que los ratones  $RalGDS^{-/xOT-I}$  expresan los mismos niveles de CD3 $\epsilon$  que los ratones control (**figura 29B**).

Una vez determinado que el problema se encuentra en la expresión en membrana del receptor, pasamos a examinar el papel de Ral en la salida a membrana del receptor. Para ello utilizamos la línea de células T Jurkat a la que disminuimos los niveles de expresión de Ral a través del uso de shRNAs y comprobamos los niveles de expresión de superficie de CD3 $\epsilon$ . Como se observa en la **figura 30**, los clones con niveles disminuidos de RalA o RalB expresan una cantidad similar de CD3 $\epsilon$  de membrana

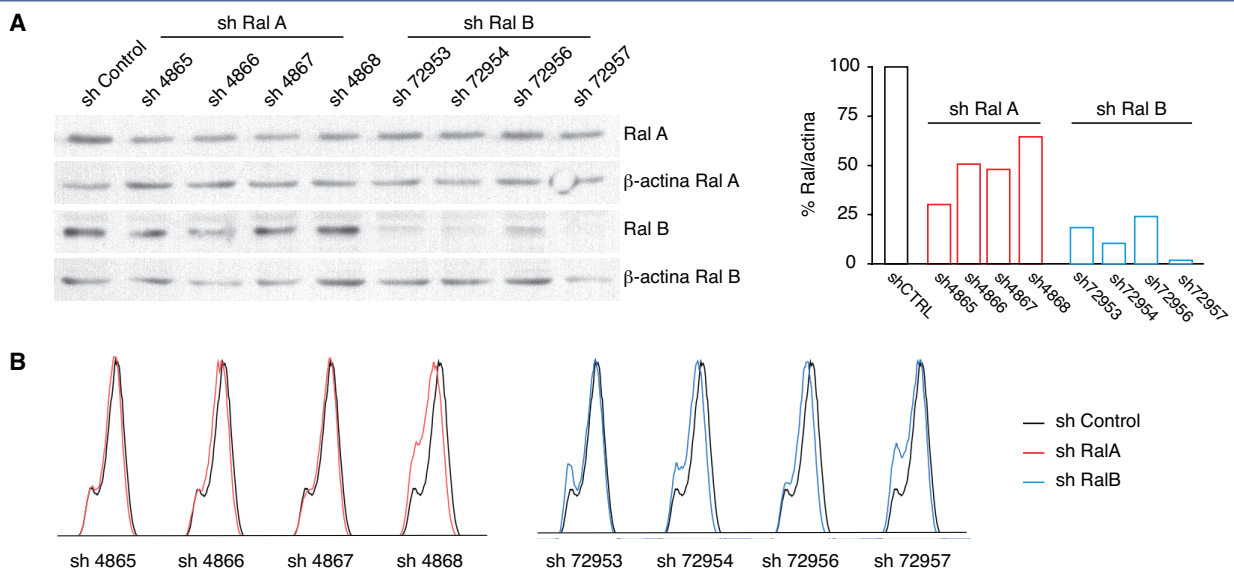


que el clon control.

Además, analizamos los niveles de expresión de membrana de CD3ε en los timocitos de ratones RalGDS<sup>-/-</sup> (figura 31). Como demuestra este estudio, los ratones RalGDS<sup>-/-</sup> tienen los mismos niveles de receptor en membrana que los ratones control y como hemos mostrado en la figura 23 no presentan deficiencias en la selección positiva. Los datos analizados en las figuras 22, 24 y 25 indican que no hay variaciones de la cantidad de CD3 en la superficie de las células de periferia de ratones RalGDS<sup>-/-</sup>, lo que es coherente con estos resultados. Todos estos datos sugieren que la disminución del complejo TCR-CD3 de membrana en los ratones RalGDS<sup>-/-</sup>xOT-I no se debe a una exocitosis defectuosa sino que es consecuencia de defectos en la selección positiva.

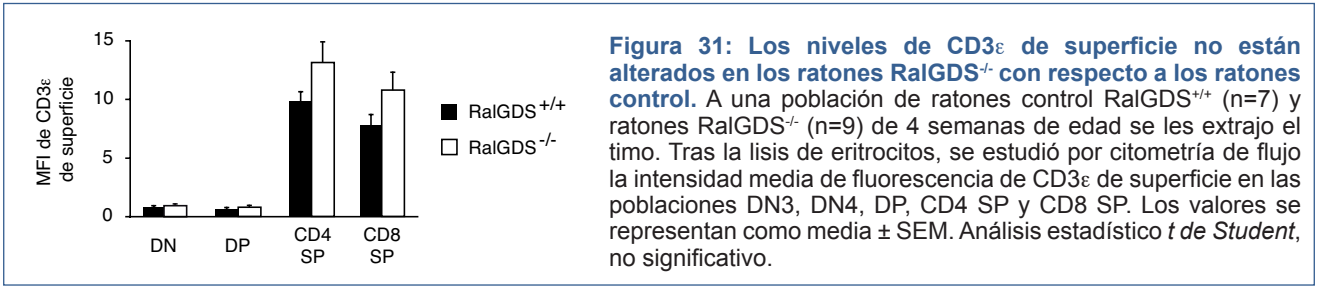


**Figura 29: Los ratones RalGDS<sup>-/-</sup>xOT-I expresan la misma cantidad total de TCRβ y CD3ε.** A una población de ratones macho control RalGDS<sup>+/+</sup>xOT-I (n=8) y ratones macho RalGDS<sup>-/-</sup>xOT-I (n=8) de entre 16 y 20 semanas de edad se les extrajo el timo. Tras la lisis de eritrocitos, se permeabilizaron los timocitos para estudiar la expresión total por citometría de flujo de TCRβ y CD3ε en las poblaciones DN, DP, CD4 SP y CD8 SP (A). Los valores se representan como media ± SEM. Análisis estadístico *t de Student*, no significativo. En el panel (B) se muestra el *Western blot* de la cantidad total de CD3ε en el lisado proteico de los timocitos procedentes de los ratones control RalGDS<sup>+/+</sup>xOT-I (n=4) y los ratones RalGDS<sup>-/-</sup>xOT-I (n=4), corroborando los datos del panel (A). Los valores se representan como media ± SEM. Análisis estadístico *t de Student*, no significativo.



**Figura 30: La disminución de Ral en células Jurkat no disminuye la expresión de superficie de CD3ε.** La línea de células T Jurkat se infectó de forma lentiviral con shRNAs de RalA (sh4865, sh4866, sh4867 y sh4868) y de RalB (sh72953, sh72954, sh72956 y sh72957). Tras comprobar su bajada de expresión por *Western blot* en las células Jurkat (A) se procedió a analizar por citometría de flujo la expresión de superficie de CD3ε (B).



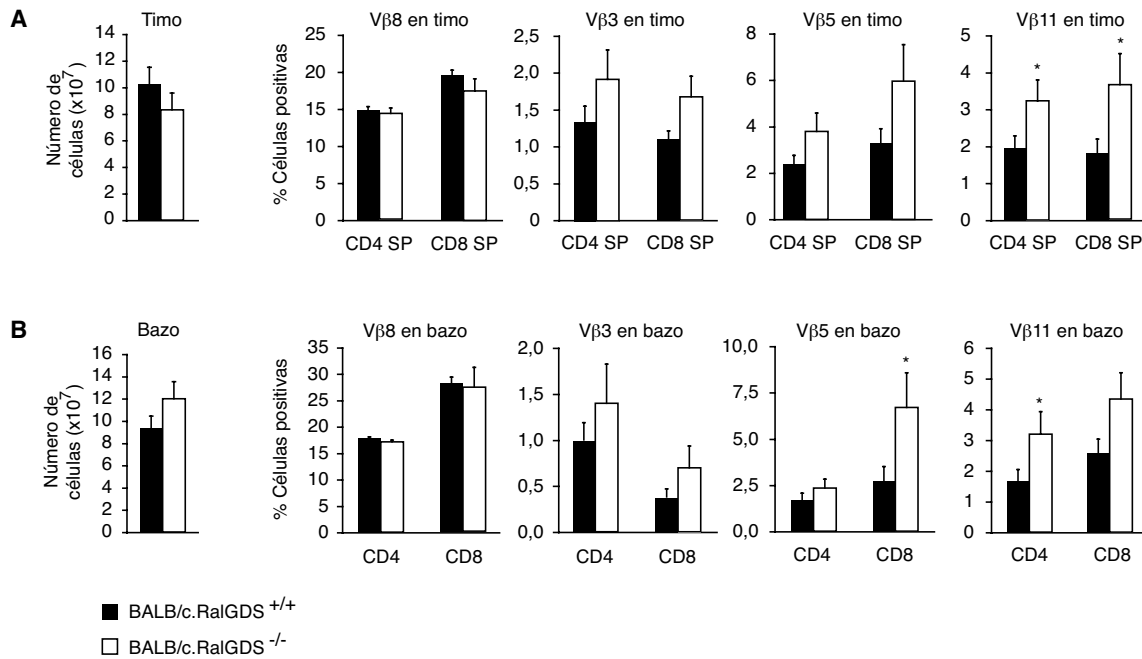


### ◆ Estudio de la selección negativa

Las células T maduras no responden a moléculas de MHC que presentan antígenos propios. Esto se debe a los procesos de selección positiva (sólo sobreviven aquellas células que reconocen MHCs propios) y de selección negativa (se eliminan las células con gran afinidad por antígenos propios) que se dan en la maduración de la célula T en el timo. Existen modelos animales que se utilizan para el estudio de la selección positiva y negativa. Estos modelos se centran básicamente en la expresión de ciertos antígenos de forma que se puede producir reconocimiento por parte del TCR y provocar selección positiva o negativa.

Para el estudio de la selección negativa hemos utilizado un modelo basado en la existencia de superantígenos endógenos. Los superantígenos endógenos estimulan células que contienen una región V $\beta$  específica en el TCR produciendo selección negativa. Las células que se eliminan son un alto porcentaje del total debido a que la única condición en el reconocimiento es la existencia de esa región (Blackman *et al.*, 1990). Los ratones con fondo BALB/c expresan la molécula MHC-II I-E, necesaria para que se dé el reconocimiento del superantígeno (Kappler *et al.*, 1987). En estos ratones el superantígeno endógeno es reconocido por las regiones V $\beta$ 3, V $\beta$ 5, V $\beta$ 11 y V $\beta$ 12 del TCR, de forma que los timocitos que contengan estas regiones serán eliminados. Las regiones V $\beta$ 6 y V $\beta$ 8 no son estimuladas por este superantígeno, por lo que los timocitos que las contengan sobrevivirán. En la **figura 32** se muestran los resultados obtenidos en el análisis de estas regiones en timo y bazo de ratones BALB/c.RalGDS<sup>-/-</sup> y BALB/c.RalGDS<sup>+/+</sup> (control) tras cuatro generaciones. Para minimizar posibles diferencias debidas al fondo genético, hemos utilizado ratones hermanos de camada, comúnmente conocidos como *littermates*. Se observa que la región V $\beta$ 8, que se mantiene en la selección negativa, tiene los mismos niveles en los ratones BALB/c.RalGDS<sup>-/-</sup> que en los control tanto en el timo como en el bazo. Las regiones V $\beta$ 3, V $\beta$ 5 y V $\beta$ 11 de los ratones BALB/c.RalGDS<sup>-/-</sup>, que provocan la delección de las células que los contienen, mantienen unos niveles por encima del valor de los ratones control en timo y bazo, siendo en algunos casos significativamente mayores, lo que implica que estos timocitos no están siendo eliminados.

Los datos analizados en este apartado indican que también se producen defectos en la selección negativa en ratones deficientes en la proteína RalGDS.



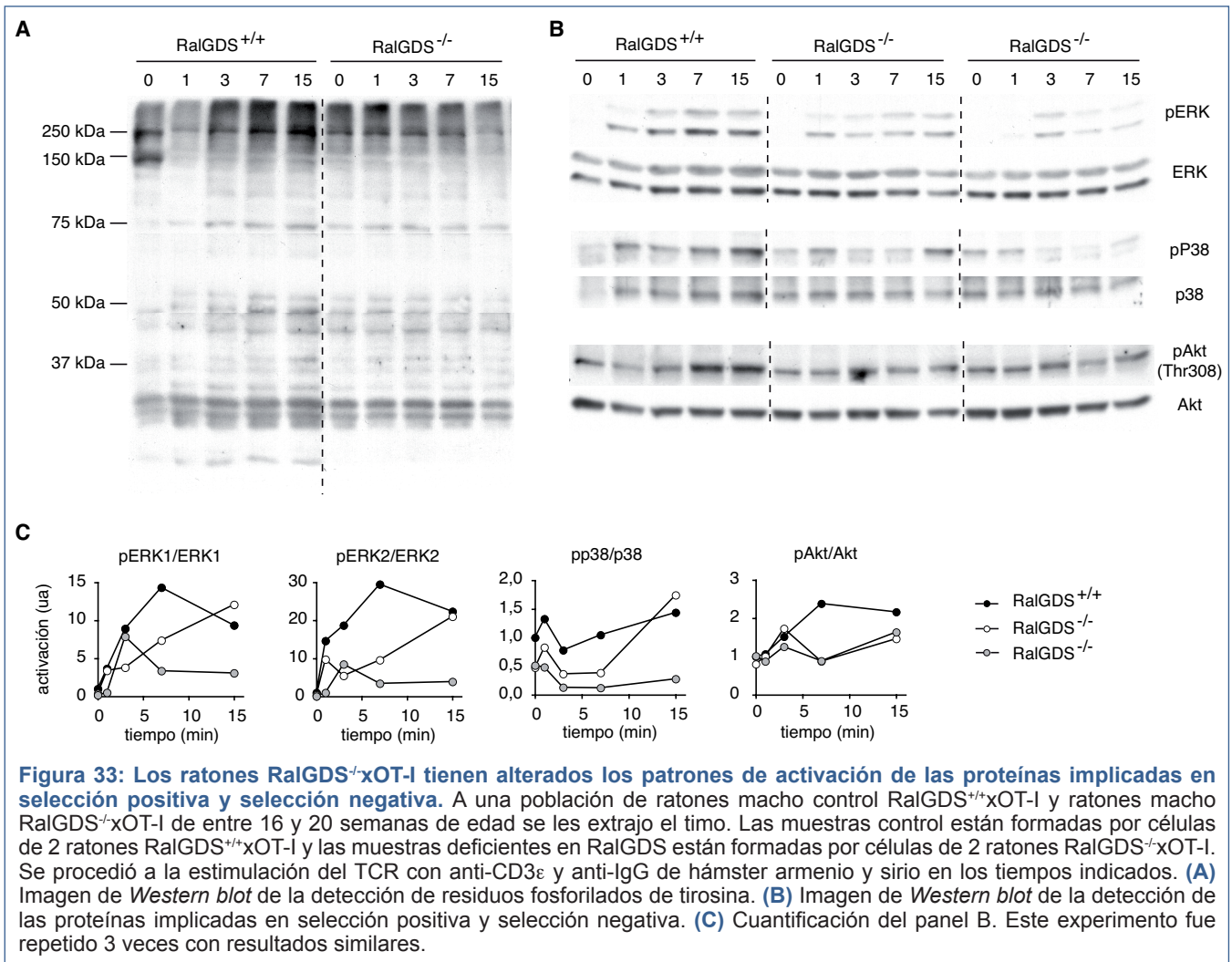
**Figura 32: Los timocitos de los ratones BALB/c.RalGDS<sup>-/-</sup> presentan un déficit en la selección negativa.** A una población de ratones macho control BALB/c.RalGDS<sup>+/+</sup> (n=16) y ratones macho BALB/c.RalGDS<sup>-/-</sup> (n=8) de entre 5 y 6 semanas de edad se les extrajo el timo (A) y el bazo (B). Tras la lisis de eritrocitos, se estudió por citometría de flujo las regiones Vβ8, Vβ3, Vβ5 y Vβ11 en las poblaciones CD4 SP y CD8 SP en timo y CD4 y CD8 en bazo. Los valores se representan como media ± SEM. Análisis estadístico t de Student, (\*) p<0,05.

### ◆ Análisis de la ruta de señalización del TCR

Los defectos en selección positiva y negativa observados hasta el momento podrían ser consecuencia de una señalización deficiente del TCR en ausencia de RalGDS. Para examinar esta opción, estimulamos *in vitro* timocitos extraídos de ratones control y ratones RalGDS<sup>-/-</sup>xOT-I con anti-CD3ε entrecruzado con anti-IgG de hámster armenio y sirio para producir la activación del TCR y, a continuación, realizamos un *Western blot*.

El primer evento de señalización tras la estimulación del TCR es la activación de Lck (Straus *et al.*, 1992). Esta tirosina quinasa no receptora fosforila los ITAMs de los dominios citoplasmáticos de las cadenas δ, ε y ζ del TCR (Irving *et al.*, 1993). ZAP70, otra tirosina quinasa, es reclutada a la cadena ζ ya fosforilada y es fosforilada por Lck. La activación de ZAP70 provoca la fosforilación de numerosas moléculas de señalización intracelular (Kolanus *et al.*, 1993) que acaban induciendo diversos eventos celulares. Las proteínas adaptadoras LAT y SLP76 son dos de las moléculas activadas por ZAP70 que son esenciales en la señalización generada en el TCR (Lee *et al.*, 2004). Tras la estimulación del TCR, LAT es fosforilada rápidamente por ZAP70 en sus múltiples residuos de tirosina que sirven como puntos de unión de proteínas con dominios SH2 como PLCγ o Grb2 (Finco *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998). Por lo tanto, la fosforilación de residuos de tirosina tiene un papel esencial en la señalización temprana originada en el TCR. Para comprobar qué ocurre con esta parte de la cascada, analizamos la fosforilación de residuos de tirosina en las proteínas extraídas de las células de ratones control y ratones RalGDS<sup>-/-</sup>xOT-I tras la estimulación del TCR. Como se observa en la **figura 33A**, el patrón general de fosforilación de este aminoácido varía en ausencia de RalGDS. Si comparamos la cinética de fosforilación en determinadas bandas se observa que en las muestras deficientes en RalGDS no se produce activación tras la estimulación del TCR, lo que conllevaría a una alteración en la actividad de la cascada.

Para comprobar si esta deficiente activación repercute en las proteínas implicadas en selección positiva y negativa, analizamos su activación en estas mismas muestras. Residuos específicos fosforilados en LAT reclutan a PLC $\gamma$ 1. PLC $\gamma$ 1 activa a RasGRP1, una GEF de Ras involucrada en selección positiva (Dower *et al.*, 2000). La activación de Ras va a inducir la activación de ERK que juega un papel central en selección positiva (Alberola-Ila *et al.*, 1995; Swan *et al.*, 1995). Se ha observado que la inactivación de ERK resulta en defectos en selección positiva (Pagès *et al.*, 1999) y, además, se activa durante este proceso (Delgado *et al.*, 2000; Werlen *et al.*, 2000). Los ratones RalGDS<sup>-/-</sup>xOT-I muestran unos niveles basales de fosfo-ERK similares a los control pero, tras la estimulación del TCR, la fosforilación de



la quinasa ERK se ve afectada teniendo valores menores en ausencia de RalGDS (figura 33B). Esta deficiencia en la activación de ERK podría explicar los defectos observados en selección positiva en los ratones deficientes en RalGDS.

La fosforilación de LAT también recluta a Grb2, otra proteína adaptadora, y a SOS, otra GEF de Ras. Ambas modulan la activación de esta GTPasa en selección negativa (Gong *et al.*, 2001; Sommers *et al.*, 2004) a través de la quinasa p38. Esta quinasa es requerida en la apoptosis de los timocitos que se produce durante la selección negativa (Sugawara *et al.*, 1998; Sohn *et al.*, 2007). El análisis de esta quinasa muestra que la cinética de activación en los ratones RalGDS<sup>-/-</sup>xOT-I es similar a los ratones control pero tienen niveles basales menores, pudiendo explicar los defectos observados en selección negativa en los ratones BALB/c.RalGDS<sup>-/-</sup>.

Además de estos dos marcadores de selección positiva y negativa analizamos la activación de Akt, importante en la selección  $\beta$ . Akt se activa tras la activación de PI3K que necesita, junto con el TCR,

la participación de la molécula coestimuladora CD28. CD28 es fosforilada y activada por Lck (Raab *et al.*, 1995; van Oers, 1999). Como muestra la **figura 33B**, la activación de Akt también se encuentra disminuida por la deficiencia de RalGDS.

Estos resultados indican que la ausencia de RalGDS varía los niveles de activación de las proteínas implicadas en la ruta de señalización del TCR y todo parece sugerir que esta alteración es responsable de los defectos observados en selección positiva y selección negativa en los ratones RalGDS<sup>-/-</sup>xOT-I.

# DISCUSIÓN





## **RalGDS en el desarrollo de tumores de colon asociados a inflamación**





Nuestro principal objetivo en este apartado de la Tesis ha sido el estudio del papel de RalGDS en el desarrollo del cáncer de colon asociado a inflamación. El cáncer y la inflamación son dos procesos que están estrechamente relacionados (Mantovani *et al.*, 2008). El cáncer de colon asociado a inflamación es un ejemplo de esta relación en donde la inflamación crónica del colon predispone al desarrollo de tumores en este órgano (Coussens *et al.*, 2002). La vía RalGDS/Ral tiene funciones tanto en procesos tumorigénicos (Kashatus *et al.*, 2013) como en el sistema inmune (Johnson *et al.*, 2012) pudiendo por tanto regular esta enfermedad tanto de manera intrínseca como de manera extrínseca. Para estudiar el papel de RalGDS en esta enfermedad hemos utilizado distintos ratones transgénicos de forma que hemos diseccionado su función en algunos de los tipos celulares que intervienen en el cáncer de colon asociado a inflamación, el epitelio y las células mieloides.

### ◆ RalGDS en la inflamación del colon

RalGDS regula la inflamación del colon en distintas etapas a través de distintos tipos celulares. En la etapa de inflamación (durante la administración de DSS) la ausencia de RalGDS disminuye el número de células CD4<sup>+</sup> de la lámina propia del colon reduciendo los efectos en la inflamación. En cambio, en la etapa de recuperación (una vez se ha retirado el DSS) RalGDS es esencial en la resolución de la inflamación a través de las células mieloides.

La inflamación del colon originada por la administración de DSS en ratones RalGDS<sup>-/-</sup> (figura 9) indica que esta proteína es necesaria en el proceso inflamatorio. Los efectos de la ausencia de RalGDS se producen en la etapa de inflamación, entre los días 0 y 6 donde se da el tratamiento con DSS. En esta etapa se demuestra que la deficiencia de RalGDS previene de la colitis aguda. En la etapa de recuperación, de día 6 a 20 donde el DSS es retirado y se produce la resolución de la inflamación, no se observan diferencias debido a que en estos ratones no se produce apenas inflamación del colon.

El epitelio del tracto gastrointestinal actúa como una barrera física de protección en las enfermedades inflamatorias del intestino. Se ha observado que personas que padecen IBD tienen una barrera epitelial defectuosa (Soderholm *et al.*, 2002). Tanto RalA, como RalB, como el exocisto intervienen en la formación normal de uniones estrechas (Hazelett *et al.*, 2011) de forma que podrían regular la inflamación a través del mantenimiento del epitelio intestinal. Analizando el papel de RalGDS en el epitelio, demostramos que no interviene en el proceso inflamatorio que se da en la colitis aguda (figura 10) ni en la etapa de inflamación ni en la de recuperación. En la etapa de inflamación, el DSS provoca la ruptura de las uniones entre las células permitiendo a la flora bacteriana cruzar la barrera epitelial y desencadenar la respuesta inflamatoria. No observamos ningún efecto en esta etapa de la enfermedad debido a que la función de la vía RalGDS/Ral se encuentra en la formación de uniones estrechas y no en su destrucción. En la etapa de recuperación podríamos esperar que la vía RalGDS/Ral influyera en la formación de las uniones estrechas ya que el epitelio se está regenerando y se producen nuevas uniones entre las células, pero la ausencia de RalGDS en el epitelio ha demostrado que no influye en el progreso de la inflamación del colon. Este hecho nos hace pensar que la ausencia de RalGDS sobre la activación de Ral en el epitelio no influye en la formación de uniones estrechas en este modelo animal utilizado. Esto se podría explicar a través del análisis de la activación de Ral en las criptas colónicas deficientes en RalGDS (figura 12). Hemos demostrado que esta GTPasa se activa, aunque con una cinética diferente que en presencia de RalGDS.

Una vez determinado que RalGDS no interviene en la inflamación del colon a través del epitelio, hemos estudiado su función en las células mieloides. El sistema inmune innato, al que pertenece el linaje mieloides, tiene un papel esencial en el tracto gastrointestinal donde debe responder de forma rápida y efectiva a los patógenos invasores sin causar daño a la flora intestinal normal o al huésped (Roberts-Thompson *et al.*, 2011). Además, la respuesta innata es la responsable de la iniciación de la inflamación intestinal (Waldner *et al.*, 2009). La ausencia de RalGDS en las células mieloides (granulocitos y macrófagos), que se incluyen dentro del sistema inmune innato, no provoca diferencias en la etapa de inflamación del colon, durante la administración de DSS (figura 13). Además, los macrófagos deficientes en RalGDS demuestran tener un correcto comportamiento en ensayos de funcionalidad proinflamatoria (figura 17). Estos macrófagos proinflamatorios son los responsables de la iniciación de la inflamación debido a sus características microbicidas. Ambos datos apoyan la idea de que RalGDS no interfiere en el sistema inmune innato en la iniciación de la inflamación del colon y, por tanto, ni granulocitos ni macrófagos son responsables del efecto observado en la inflamación en ratones RalGDS<sup>-/-</sup>. En cambio, en las células mieloides RalGDS tiene un efecto protector de la inflamación en la etapa de recuperación (figura 13). La ausencia de RalGDS en las células mieloides provoca que los efectos de la inflamación se mantengan a lo largo del tiempo. La composición de los infiltrados inflamatorios del colon en esta etapa no está modificada por la ausencia de RalGDS (figura 15), por lo que sospechamos que su papel se encuentra en la funcionalidad de estas células mieloides. A través de los ensayos de polarización de macrófagos *in vitro* hemos demostrado que la deficiencia de RalGDS en los macrófagos provoca que éstos no secreten de forma adecuada las enzimas iNOS y arginasa I (figura 16). Durante la resolución de la inflamación, los macrófagos eliminan las células apoptóticas del medio lo que provoca que se originen eventos de señalización diferentes en los macrófagos, como el bloqueo de la liberación de mediadores proinflamatorios o la inhibición de la expresión de iNOS y estimulación de la expresión de arginasa I (Freire-De-Lima *et al.*, 2006). Además, los macrófagos apoyan y promueven la proliferación de progenitores epiteliales colónicos, por lo que tienen un papel en la respuesta regenerativa al daño intestinal (Pull *et al.*, 2005). Expresan las enzimas iNOS y arginasa I (Salimuddin *et al.*, 1999) que se encargan del metabolismo de la arginina. La arginina es un aminoácido importante en los procesos de cicatrización a través de los productos de su metabolismo. Es convertida a citrulina y NO por iNOS, y a ornitina y urea por arginasa I. La ornitina es un precursor de prolina y poliaminas involucradas en la formación de colágeno y en la proliferación celular (Sonoki *et al.*, 1997). La expresión de iNOS genera un ambiente citotóxico que es importante en las primeras fases de la cicatrización. Según la cicatrización avanza, el aumento de la actividad arginasa produce un ambiente favorable para la proliferación celular y producción de colágeno (Shearer *et al.*, 1997). Por lo tanto, ambas enzimas son importantes en la cicatrización. Además, la arginasa regula la síntesis de NO a través de la biodisponibilidad de arginina (Nathan, 1995). En heridas, se ha observado que la arginasa es la ruta predominante en el metabolismo de la arginina (Albina *et al.*, 1990) y su inhibición conlleva a una disminución en la síntesis de poliaminas lo que acarrea una parada en el ciclo celular impidiendo la proliferación (Buga *et al.*, 1998; Ignarro *et al.*, 2001; Morrison *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 2000; Takigawa *et al.*, 1990; Wei *et al.*, 2001). Estudios llevados a cabo en modelos murinos de colitis apoyan el papel protector de la arginasa a través de la formación de poliaminas e inhibición de NO (Gobert *et al.*, 2004). Por todos estos datos creemos que en nuestro modelo la responsable del estado de inflamación tras el tratamiento con DSS podría ser la deficiente expresión de iNOS y arginasa I que podría impedir la correcta regeneración del epitelio intestinal. A pesar de ello, estos efectos no han podido ser demostrados con tinciones histológicas específicas para estas enzimas en el colon de los ratones deficientes en RalGDS en las células mieloides sometidos al tratamiento con DSS (figura 18).

Hemos demostrado que la ausencia de RalGDS en todo el organismo previene de la colitis aguda en la fase inicial de la inflamación. Este efecto no se produce a través del epitelio intestinal ni a través de las células mieloides ya que no lo observamos ni en los ratones RalGDS<sup>fl/fl</sup>/Villin-Cre<sup>+</sup> ni en los ratones RalGDS<sup>fl/fl</sup>/LysM-Cre<sup>+</sup>. El estudio de la composición de los infiltrados inflamatorios del colon en esta

etapa (figura 20) indica que las células T CD4<sup>+</sup> de la lámina propia se encuentran en menor cuantía en el ratón deficiente en RalGDS. En IBD, estas células se encargan de la activación de macrófagos y del reclutamiento de otras células del SI provocando el mantenimiento de la inflamación (Podolsky, 2002). Su importancia en IBD se demuestra en experimentos en los que la inoculación de células CD4<sup>+</sup> en ratones inmunodeficientes *scid* provoca el desarrollo de la enfermedad (Morrissey *et al.*, 1993; Powrie *et al.*, 1993; Claesson *et al.*, 1996). Además, la inhibición de células T CD4<sup>+</sup> utilizando anticuerpos monoclonales previene el desarrollo de la colitis (Shintani *et al.*, 1998, Simpson *et al.*, 1995). Estos datos apoyan los efectos vistos en los ratones deficientes en RalGDS, un menor número de células T CD4<sup>+</sup> se correlaciona con una menor inflamación del colon. Estudios sobre la activación dependiente de Ras en células T CD4<sup>+</sup> efectoras ponen de manifiesto que se puede producir por una vía distinta a la de las MAPK (Czyzyk *et al.*, 2003). En este trabajo, las células T CD4<sup>+</sup> con el mutante Ras<sup>V12G37</sup>, que une RalGEFs pero no Raf quinasas, proliferan más que aquellas con otras variantes que no unen RalGEFs pero sí Raf quinasas o PI3K, sugiriendo que RalGDS es necesario para la proliferación de estas células. RalGDS puede mediar la proliferación de las células T CD4<sup>+</sup> de forma dependiente de la activación de Ral o de forma independiente de la actividad de esta GTPasa. A pesar de no haber estudiado la activación de Ral en las células CD4<sup>+</sup> de la lámina propia del colon debido a la complejidad de la extracción de estas células, resultados previos del laboratorio muestran que tras la estimulación con anticuerpos anti CD3 $\epsilon$ , Ral se activa en los esplenocitos de ratones RalGDS<sup>-/-</sup> aunque en menor medida que en los ratones control (Sánchez-Ruíz, 2011). Esta activación residual puede ser debida a otra proteína de la familia RalGEF, Rlf, que se expresa en las células CD4<sup>+</sup> de ratón (*GeneAtlas MOE430*). Por lo tanto los efectos observados en el número de células presentes en la lámina propia del colon podrían no deberse a la falta de activación de Ral. Se ha observado que las RalGEFs tienen funciones adicionales a la activación de las GTPasas Ral (Lim *et al.*, 2005; Wolthuis *et al.*, 1997). En concreto, RalGDS contribuye a la activación de Akt por dos vías distintas, actúa como proteína andamio entre Akt y PDK1 (que fosforila a Akt en la treonina 308) y participa en la completa activación de Akt a través de la fosforilación adicional de la serina 473 (Hao *et al.*, 2008). Por tanto, el déficit observado podría deberse tanto a defectos en la activación de Ral como a funciones de RalGDS independientes de su capacidad de activar a Ral.

Los datos obtenidos hasta el momento recogidos de los experimentos realizados en ratones RalGDS<sup>-/-</sup>, RalGDS<sup>fl/fl</sup>/Villin-Cre<sup>+</sup> y RalGDS<sup>fl/fl</sup>/LysM-Cre<sup>+</sup> sugieren que el déficit observado en ratones RalGDS<sup>-/-</sup> es intrínseco a la célula T CD4<sup>+</sup>. Ni el epitelio ni las células mieloides son responsables del efecto observado. En concreto, los macrófagos han demostrado tener el mismo comportamiento durante la administración de DSS expresen o no la proteína RalGDS (figura 13). Tienen los mismos efectos proinflamatorios y de reclutamiento de linfocitos en esta etapa de la inflamación del colon. Para comprobar esta hipótesis, estamos realizando experimentos similares en ratones RalGDS<sup>fl/fl</sup>/hCD2-iCre<sup>+</sup>, deficientes en RalGDS en las células T y B. A través de estos ratones averiguaremos el papel específico de RalGDS en las células T que sospechamos que, tal como hemos observado en los experimentos realizados en ratones RalGDS<sup>-/-</sup>, podrían ser las responsables de los efectos en la inflamación del colon en la colitis aguda.

Con estos últimos experimentos tendremos un estudio completo del papel de RalGDS en los distintos tipos celulares que intervienen en la colitis: el epitelio, que protege actuando como una barrera física; el sistema inmune innato, que es responsable de la iniciación de la inflamación; y el sistema inmune adaptativo, que se encarga de mantener la inflamación crónica en las enfermedades inflamatorias intestinales.

### ◆ RalGDS en el desarrollo de tumores de colon asociados a inflamación

Las células epiteliales colónicas son aquellas que se transforman originando tumores en el colon (Markowitz *et al.*, 2009). La GTPasa Ral se encuentra hiperactivada en muestras humanas procedentes de CRC (Martin *et al.*, 2011) y su función oncogénica ha sido ampliamente demostrada (Kashatus *et al.*, 2013). Además, inflamaciones crónicas predisponen al desarrollo de diversos tipos de cáncer, entre los que se incluye el CRC (Coussens *et al.*, 2002). A través de los distintos tipos de ratones transgénicos ya utilizados en los experimentos de inflamación aguda, hemos estudiado el papel de RalGDS en el cáncer de colon asociado a inflamación distinguiendo si RalGDS regula el desarrollo de tumores de forma intrínseca con efectos directos sobre las células epiteliales colónicas o de forma extrínseca regulando los efectos en la inflamación. En este modelo experimental, el AOM induce las mutaciones en las células epiteliales colónicas y los diversos ciclos de DSS/agua provocan la inflamación crónica que define esta patología (Neufert *et al.*, 2007).

Nuestros estudios muestran que la ausencia de RalGDS en el epitelio del colon no produce diferencias en el desarrollo de tumores colorrectales con respecto a los ratones control (figura 11). El análisis de la activación *in vitro* de Ral tras la estimulación con LPS en las criptas colónicas deficientes en RalGDS demuestra que esta GTPasa se activa aunque con una cinética diferente que en presencia de RalGDS (figura 12). A través de la base de datos *GeneAtlas MOE430* sabemos que Rlf es otra RalGEF que tiene un nivel de expresión similar a RalGDS en el intestino grueso, pudiendo ser la responsable de la activación de Ral. Esta activación parece ser suficiente para provocar el desarrollo de tumores colorrectales. La aparición de tumores es la misma en ratones deficientes en RalGDS en las células epiteliales que en los ratones control, al igual que el número de tumores por ratón o su tamaño. Por lo tanto, en el modelo animal utilizado, la deficiencia de RalGDS no regula la formación de tumores colorrectales de forma intrínseca.

La ausencia de RalGDS en el sistema inmune innato promueve que los efectos en la inflamación se mantengan a lo largo del tiempo. Esta mayor inflamación puede acarrear un mayor desarrollo de tumores colorrectales, como ya se ha explicado anteriormente. En este caso, la deficiencia de RalGDS en las células mieloides no origina una mayor incidencia de tumores en estos ratones, pero sí que los ratones deficientes en RalGDS en las células mieloides desarrollen más tumores por ratón que los ratones control, con un tamaño similar (figura 19). Las diferencias que se producen en la multiplicidad de tumores no son significativas aunque están en el límite de la significancia debido, muy probablemente, al escaso número de ratones analizados a término del experimento. La tendencia indica que la mayor inflamación observada en los ratones cuyas células mieloides carecen de RalGDS genera un mayor desarrollo de tumores por ratón. Para verificar este resultado y, por tanto, confirmar que efectivamente la mayor inflamación en el colon debido a la ausencia de RalGDS en las células mieloides provoca un aumento en el número de tumores desarrollados por cada ratón, estamos realizando otro experimento.

Los ratones RalGDS<sup>-/-</sup> muestran los mismos resultados en el desarrollo de tumores colorrectales que ratones que expresan la proteína (figura 21). No se encuentran diferencias ni en incidencia, ni en multiplicidad ni en el tamaño de los tumores, a pesar de que la deficiencia de RalGDS implica niveles de inflamación en el colon menores. Pensamos que esta menor inflamación se debe a una deficiencia en células T CD4 de la lámina propia. Estas células, a través de una respuesta de tipo Th2, promueven el crecimiento tumoral en modelos murinos de cáncer asociado a colitis (Osawa *et al.*, 2006). Según este estudio, los ratones deficientes en RalGDS con un menor número de células CD4 deberían desarrollar menos tumores colorrectales, por lo que nuestro resultado no es el esperado. Los primeros estudios clínicos que se realizaron demuestran la correlación entre la respuesta de la célula CD4 y el riesgo de desarrollar CRC (Weedon *et al.*, 1973; Gyde *et al.*, 1980; Gillen *et al.*, 1994). La respuesta Th2, típica de UC, tiene un efecto promotor en el CAC, mientras que la respuesta Th1, más común en CD, tiene un efecto antitumoral. Esta diferencia en la respuesta Th podría explicar los resultados obtenidos en el

desarrollo de tumores colorrectales en ratones deficientes en RalGDS si la respuesta mayoritaria es la Th1. A pesar de ello, estudios recientes muestran que ambos tipos de IBD tienen la misma incidencia de CRC, por lo que existen otros factores que podrían estar alterando los efectos tumorigénicos en el ratón RalGDS<sup>-/-</sup>.

Para solventar este problema, al igual que en el estudio de la inflamación aguda del colon, vamos a realizar estos mismos experimentos en ratones deficientes en RalGDS en la célula T. De esta forma podremos verificar si la ausencia de RalGDS en la célula T provoca un menor desarrollo de tumores. Tras este estudio podremos determinar si el efecto observado en la carcinogénesis de colon en ratones RalGDS<sup>-/-</sup> se debe a una combinación de efectos debido a la ausencia de RalGDS en todos los tipos celulares.

El trabajo realizado en esta Tesis sobre la función de RalGDS en el cáncer asociado a colitis revela que la función más significativa de esta proteína se encuentra en el sistema inmune a través de su efecto en las células mieloides y, muy posiblemente, en las células T. Esto supone un avance importante en el estudio de esta ruta de señalización ya que, hasta el momento, el análisis de la vía de la GTPasa Ral se centraba en su función en las células tumorales.



# RalGDS en el desarrollo de la célula T en el timo





Nuestro principal objetivo en esta parte del trabajo ha sido el estudio del papel de RalGDS en el desarrollo y funcionalidad de la célula T. RalGDS transmite las señales procedentes de la GTPasa Ras junto con las MAPK y PI3K (Wolthuis *et al.*, 1999). Esta GTPasa interviene en una gran variedad de procesos biológicos, incluidos el desarrollo y la funcionalidad de la célula T y podría ejercer parte de estos efectos a través de la ruta RalGDS/Ral. Además existen evidencias tanto del papel de Ras como de la ruta RalGDS/Ral en el sistema inmune (Johnson *et al.*, 2012). Nuestro grupo ha establecido que Ral se activa tras la estimulación del TCR (Sánchez-Ruíz, 2011) y, además, las GTPasas Ral son necesarias para el ensamblaje del exocisto y para la secreción de gránulos líticos en la citotoxicidad mediada por las células NKs (Sánchez-Ruíz *et al.*, 2011), así como también en las células CD8<sup>+</sup> (Sánchez-Ruíz, 2011). Todo ello nos ha conducido a estudiar el papel de RalGDS en el sistema inmune utilizando ratones deficientes en esta proteína.

Nuestros resultados indican que la ausencia de RalGDS provoca defectos en selección positiva y en selección negativa durante el desarrollo de la célula T en el timo. Estos defectos parece que se deben a alteraciones en la activación de las proteínas implicadas en la señalización del TCR.

Los ratones RalGDS<sup>-/-</sup> muestran un bloqueo en la transición DN3-DN4, donde la selección  $\beta$  tiene lugar. A pesar de este bloqueo, la proporción de células maduras DP y SP es igual en ratones deficientes en esta proteína y en ratones control (figura 23). En periferia, la composición de células T es la misma en los ratones deficientes en RalGDS y los ratones control (figuras 22, 24 y 25). En algunas ocasiones la existencia de defectos en el desarrollo tímico se puede enmascarar en ratones con un repertorio completo de TCRs (Phee *et al.*, 2010). Es por ello que utilizamos ratones transgénicos OT-I, cuyo repertorio de TCRs está limitado, y analizamos el efecto de la ausencia de la proteína RalGDS en el desarrollo de la célula T en el timo. Con estos ratones RalGDS<sup>-/-</sup>xOT-I demostramos que existen problemas en el desarrollo de los timocitos asociados a la deficiencia de RalGDS al observar una acumulación de células DP y una disminución en las SP (figura 26). Estas deficiencias se deben al efecto de la ausencia de RalGDS sobre la célula T y no a un efecto de la ausencia de RalGDS sobre el epitelio tímico (figura 27). El estudio de los marcadores de selección positiva CD5, CD69 y TCR $\beta$  (figura 28) nos indica que la deficiencia de RalGDS afecta a la selección positiva, y el uso de modelos animales BALB/c para el estudio de la selección negativa (figura 32) también indica que este otro punto de control está afectado por la deficiencia de RalGDS.

Los defectos observados en selección positiva y selección negativa pueden ser debidos a una deficiente señalización del TCR. Para ello, en primer lugar, hemos examinado la fosforilación de residuos de tirosina en las células procedentes de ratones control y ratones RalGDS<sup>-/-</sup>xOT-I (figura 33A). La fosforilación de residuos de tirosina tiene un papel esencial en la señalización celular (Schlessinger, 2000). En las células procedentes de ratones RalGDS<sup>-/-</sup>xOT-I observamos una menor fosforilación de este aminoácido tras la estimulación del TCR indicando que la activación de la ruta del TCR está disminuida por la ausencia de RalGDS. Proteínas con residuos de tirosina susceptibles de ser fosforilados en esta cascada de señalización son Lck, Fyn, ZAP70, LAT y SLP76. Todas estas proteínas tienen un papel esencial en la transmisión de las señales procedentes del TCR tanto en la funcionalidad de la célula T como en su desarrollo (Straus *et al.*, 1992; Irving *et al.*, 1993; Kolanus *et al.*, 1993; Finco *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998). Los efectos observados en la activación de las tirosina quinasas por la deficiencia de RalGDS pueden ser debidos a defectos en la activación de Ral, ya que se ha observado que esta GTPasa interacciona con la tirosina quinasa Src. En concreto, Ral activa a c-Src tras la estimulación del receptor de EGF en fibroblastos y células epiteliales (Goi *et al.*, 2000) además de que la activación de PLD1

por v-Src es dependiente de RalA (Jiang *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1997). Lck y Fyn, dos de las tirosina quinasas implicadas en la señalización del TCR, pertenecen a la familia Src, por lo que la ausencia de RalGDS podría estar interfiriendo en la activación de estas quinasas a través de Ral.

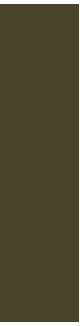
Además de estudiar la activación de la ruta a través de la fosforilación de residuos de tirosina también hemos analizado la activación de proteínas específicas involucradas en los eventos afectados por la ausencia de RalGDS, la selección positiva y la selección negativa. Al observar variaciones en la fosforilación de residuos de tirosina, creemos que es posible que las proteínas esenciales en estos puntos de control estén también afectadas y nos den una posible explicación de los defectos observados. ERK es una MAPK necesaria y suficiente para la selección positiva. Inhibidores específicos de MKK1, la quinasa encargada de activar a ERK, perjudican la selección positiva y, en timocitos inmaduros, la activación de ERK reemplaza a la señalización por el TCR e induce selección positiva (Sugawara *et al.*, 1998). Por lo tanto la deficiente activación de esta proteína que observamos en los ratones RalGDS<sup>-/-</sup>xOT-I (figura 33B) sería suficiente para explicar los defectos en selección positiva en estos animales.

p38 es otra MAPK involucrada en la señalización del TCR. Se la relaciona con selección negativa y de forma minoritaria con selección positiva (Hsu *et al.*, 2003). Además, la sobreexpresión de MKK6, la quinasa que activa a p38, en timocitos inmaduros es suficiente para inducir apoptosis en estas células reemplazando la señalización del TCR (Sugawara *et al.*, 1998). Distintos estudios han implicado a las proteínas RalGEFs en la activación de p38 (Ouwens *et al.*, 2002; Norman *et al.*, 2004). El análisis de los niveles de activación de p38 en los timocitos de ratones RalGDS<sup>-/-</sup>xOT-I muestra una menor activación de esta proteína comparado con los ratones control, si bien los defectos son más modestos que los observados para ERK (figura 33B). Esta menor activación podría explicar el déficit observado en selección negativa. Sin embargo otras rutas de señalización podrían también contribuir a este proceso y necesitan ser estudiadas en más detalle. En primer lugar las proteínas RalGEF no solo activan a p38 sino también a otra MAPK, JNK, que contribuye a la selección negativa (Rincón *et al.*, 1998; de Ruiter *et al.*, 2000). Ya hemos observado una activación deficiente de JNK en otros tipos celulares distintos de los timocitos en los ratones deficientes en RalGDS (González-García *et al.*, 2005). Además, aunque la selección negativa en respuesta a péptidos convencionales no está afectada en los ratones Fyn<sup>-/-</sup> (Mamchak *et al.*, 2010) si lo está en respuesta a superantígenos endógenos (Stein *et al.*, 1992) que es el modelo que hemos usado en este estudio. Si bien no hemos analizado los niveles de activación en Fyn tras la estimulación del TCR en los ratones RalGDS<sup>-/-</sup>xOT-I la disminución en los niveles de proteínas fosforiladas en tirosina (figura 33A) sugieren que esta proteína podría estar afectada.

Por último, también hemos querido analizar la activación de Akt. RalGDS contribuye a la fosforilación de la Thr308 de Akt actuando como proteína andamio entre ésta y PDK1 (Hao *et al.*, 2008), por lo que esperamos que su activación se encuentre disminuida en ratones RalGDS<sup>-/-</sup>xOT-I, que es lo que observamos tras la estimulación del TCR (figura 33B). Akt también participa en la señalización del TCR controlando el progreso de la selección  $\beta$  (Hinton *et al.*, 2004; Juntilla *et al.*, 2007), pero, a pesar de esta bajada en su activación, no observamos problemas asociados a la transición DN3-DN4, donde se produce la selección  $\beta$ , en los ratones RalGDS<sup>-/-</sup>xOT-I.

El trabajo realizado en esta Tesis sobre la función de RalGDS en el desarrollo de la célula T en el timo revela un papel novedoso para esta proteína involucrándola en el correcto funcionamiento de los procesos que se originan en el timo para dar lugar a células T maduras y funcionales.

# CONCLUSIONES





## RalGDS en el desarrollo de tumores de colon asociados a inflamación

1. En cáncer asociado a colitis, la función más importante de RalGDS se encuentra en el sistema inmune y no en las células epiteliales susceptibles de transformarse.
2. En la inflamación aguda del colon, RalGDS interviene en las etapas iniciales a través de una población celular aún no caracterizada pero que posiblemente corresponda a las células CD4<sup>+</sup> y a través de las células mieloides en la etapa de la resolución de la inflamación.
3. La expresión de las enzimas iNOS y arginasa I se encuentra disminuida en los macrófagos deficientes en RalGDS.
4. La deficiencia en RalGDS en las células mieloides favorece la formación de tumores de colon al exacerbar la respuesta inflamatoria.
5. En las células epiteliales de colon, RalGDS no influye ni en la inflamación ni en el desarrollo de tumores.

## RalGDS en el desarrollo de la célula T en el timo

1. Los ratones RalGDS<sup>-/-</sup> muestran una acumulación de células DN3 en el timo pero no se observan defectos ni en las poblaciones maduras del timo ni en las poblaciones de periferia.
2. Los ratones RalGDS<sup>-/-</sup>xOT-I muestran una acumulación de células DP y una disminución de células SP que implica que hay un bloqueo en el desarrollo de los timocitos.
3. El epitelio tímico no es responsable de los defectos en desarrollo observados en el timo de los ratones RalGDS<sup>-/-</sup>xOT-I.
4. El análisis de la expresión de superficie de los marcadores CD5, CD69, CD3 y TCR indican que existen deficiencias en la selección positiva de los timocitos de ratones RalGDS<sup>-/-</sup>xOT-I. El análisis de diversas regiones V $\beta$  en ratones BALB/c.RalGDS<sup>-/-</sup>, estimuladas por superantígenos endógenos, muestran que también existen deficiencias en la selección negativa debidas a la ausencia de RalGDS.
5. La deficiencia de RalGDS en los timocitos de ratones RalGDS<sup>-/-</sup>xOT-I implica variaciones en los niveles de activación de las proteínas involucradas en la cascada de señalización del TCR lo que podría conducir a los defectos observados en la selección positiva y negativa.



# BIBLIOGRAFÍA







- Agelaki, S., Tsatsanis, C., Gravanis, A., and Margioris, A. N. (2002). Corticotropin-releasing hormone augments proinflammatory cytokine production from macrophages in vitro and in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock in mice. *Infect Immun* 70, 6068-6074.
- Alberola-Ila, J., Forbush, K. A., Seger, R., Krebs, E. G., and Perlmutter, R. M. (1995). Selective requirement for MAP kinase activation in thymocyte differentiation. *Nature* 373, 620-623.
- Albina, J. E., Mills, C. D., Henry, W. L., Jr., and Caldwell, M. D. (1990). Temporal expression of different pathways of 1-arginine metabolism in healing wounds. *J Immunol* 144, 3877-3880.
- Azzam, H. S., Grinberg, A., Lui, K., Shen, H., Shores, E. W., and Love, P. E. (1998). CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. *J Exp Med* 188, 2301-2311.
- Baldari, C. T., Macchia, G., and Telford, J. L. (1992). Interleukin-2 promoter activation in T-cells expressing activated Ha-ras. *J Biol Chem* 267, 4289-4291.
- Balkwill, F., and Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357, 539-545.
- Baumgart, D. C. (2009). The diagnosis and treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dtsch Arztebl Int* 106, 123-133.
- Baumgart, D. C., and Carding, S. R. (2007). Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 369, 1627-1640.
- Berg, L. J., Pullen, A. M., Fazekas de St Groth, B., Mathis, D., Benoist, C., and Davis, M. M. (1989). Antigen/MHC-specific T cells are preferentially exported from the thymus in the presence of their MHC ligand. *Cell* 58, 1035-1046.
- Bhattacharya, M., Anborgh, P. H., Babwah, A. V., Dale, L. B., Dobransky, T., Benovic, J. L., Feldman, R. D., Verdi, J. M., Rylett, R. J., and Ferguson, S. S. (2002). Beta-arrestins regulate a Ral-GDS Ral effector pathway that mediates cytoskeletal reorganization. *Nat Cell Biol* 4, 547-555.
- Blackman, M., Kappler, J., and Marrack, P. (1990). The role of the T cell receptor in positive and negative selection of developing T cells. *Science* 248, 1335-1341.
- Bluestone, J. A., Pardoll, D., Sharrow, S. O., and Fowlkes, B. J. (1987). Characterization of murine thymocytes with CD3-associated T-cell receptor structures. *Nature* 326, 82-84.
- Bodemann, B. O., and White, M. A. (2008). Ral GTPases and cancer: linchpin support of the tumorigenic platform. *Nat Rev Cancer* 8, 133-140.
- Bos, J. L. (1998). All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral. *Embo J* 17, 6776-6782.
- Bradley, J. R. (2008). TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 214, 149-160.
- Brugnera, E., Bhandoola, A., Cibotti, R., Yu, Q., Ginter, T. I., Yamashita, Y., Sharrow, S. O., and Singer, A. (2000). Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells. *Immunity* 13, 59-71.
- Buga, G. M., Wei, L. H., Bauer, P. M., Fukuto, J. M., and Ignarro, L. J. (1998). NG-hydroxy-L-arginine and nitric oxide inhibit Caco-2 tumor cell proliferation by distinct mechanisms. *Am J Physiol* 275, R1256-1264.
- Buisine, M. P., Desreumaux, P., Leteurtre, E., Copin, M. C., Colombel, J. F., Porchet, N., and Aubert, J. P. (2001). Mucin gene expression in intestinal epithelial cells in Crohn's disease. *Gut* 49, 544-551.
- Carpenter, A. C., and Bosselut, R. (2010). Decision checkpoints in the thymus. *Nat Immunol* 11, 666-673.
- Ceredig, R., and Rolink, T. (2002). A positive look at double-negative thymocytes. *Nat Rev Immunol* 2, 888-897.
- Cherfils, J., and Chardin, P. (1999). GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 24, 306-311.

- Chien, Y., Kim, S., Bumeister, R., Loo, Y. M., Kwon, S. W., Johnson, C. L., Balakireva, M. G., Romeo, Y., Kopelovich, L., Gale, M., Jr., *et al.* (2006). RalB GTPase-mediated activation of the I $\kappa$ B family kinase TBK1 couples innate immune signaling to tumor cell survival. *Cell* 127, 157-170.
- Chien, Y., and White, M. A. (2003). RAL GTPases are linchpin modulators of human tumour-cell proliferation and survival. *EMBO Rep* 4, 800-806.
- Chorny, A., Puga, I., and Cerutti, A. (2010). Innate signaling networks in mucosal IgA class switching. *Adv Immunol* 107, 31-69.
- Clackson, M. H., Rudolph, A., Kofoed, S., Poulsen, S. S., and Reimann, J. (1996). CD4<sup>+</sup> T lymphocytes injected into severe combined immunodeficient (SCID) mice lead to an inflammatory and lethal bowel disease. *Clin Exp Immunol* 104, 491-500.
- Clapper, M. L., Cooper, H. S., and Chang, W. C. (2007). Dextran sulfate sodium-induced colitis-associated neoplasia: a promising model for the development of chemopreventive interventions. *Acta Pharmacol Sin* 28, 1450-1459.
- Clausen, B. E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R., and Forster, I. (1999). Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res* 8, 265-277.
- Clements, J. L., John, S. A., and Garrett-Sinha, L. A. (2006). Impaired generation of CD8<sup>+</sup> thymocytes in Ets-1-deficient mice. *J Immunol* 177, 905-912.
- Cooper, H. S., Murthy, S. N., Shah, R. S., and Sedergran, D. J. (1993). Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 69, 238-249.
- Corrotte, M., Nguyen, A. P., Harlay, M. L., Vitale, N., Bader, M. F., and Grant, N. J. (2010). Ral isoforms are implicated in Fc gamma R-mediated phagocytosis: activation of phospholipase D by RalA. *J Immunol* 185, 2942-2950.
- Coussens, L. M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860-867.
- Crespi, D., Massa, S., Basso, V., Colombetti, S., Mueller, D. L., and Mondino, A. (2002). Constitutive active p21ras enhances primary T cell responsiveness to Ca<sup>2+</sup> signals without interfering with the induction of clonal anergy. *Eur J Immunol* 32, 2500-2509.
- Czyzyk, J., Brogdon, J. L., Badou, A., Henegariu, O., Preston Hurlburt, P., Flavell, R., and Bottomly, K. (2003). Activation of CD4 T cells by Raf-independent effectors of Ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6003-6008.
- de Boer, J., Williams, A., Skavdis, G., Harker, N., Coles, M., Tolaini, M., Norton, T., Williams, K., Roderick, K., Potocnik, A. J., and Kioussis, D. (2003). Transgenic mice with hematopoietic and lymphoid specific expression of Cre. *Eur J Immunol* 33, 314-325.
- de Gorter, D. J., Vos, J. C., Pals, S. T., and Spaargaren, M. (2007). The B cell antigen receptor controls AP-1 and NFAT activity through Ras-mediated activation of Ral. *J Immunol* 178, 1405-1414.
- de Ruiter, N. D., Wolthuis, R. M., van Dam, H., Burgering, B. M., and Bos, J. L. (2000). Ras-dependent regulation of c-Jun phosphorylation is mediated by the Ral guanine nucleotide exchange factor-Ral pathway. *Mol Cell Biol* 20, 8480-8488.
- Delgado, P., Fernandez, E., Dave, V., Kappes, D., and Alarcon, B. (2000). CD3delta couples T-cell receptor signalling to ERK activation and thymocyte positive selection. *Nature* 406, 426-430.
- DiDonato, J. A., Mercurio, F., and Karin, M. (2012). NF- $\kappa$ B and the link between inflammation and cancer. *Immunol Rev* 246, 379-400.
- Donovan, S. L., Mamounas, L. A., Andrews, A. M., Blue, M. E., and McCasland, J. S. (2002). GAP-43 is critical for normal development of the serotonergic innervation in forebrain. *J Neurosci* 22, 3543-3552.
- Dower, N. A., Stang, S. L., Bottorff, D. A., Ebinu, J. O., Dickie, P., Ostergaard, H. L., and Stone, J. C. (2000). RasGRP is essential for mouse thymocyte differentiation and TCR signaling. *Nat Immunol* 1, 317-321.

- Downward, J., Graves, J. D., Warne, P. H., Rayter, S., and Cantrell, D. A. (1990). Stimulation of p21ras upon T-cell activation. *Nature* 346, 719-723.
- Eastaff-Leung, N., Mabarrack, N., Barbour, A., Cummins, A., and Barry, S. (2010). Foxp3+ regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease. *J Clin Immunol* 30, 80-89.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y., and Henson, P. M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 101, 890-898.
- Fearon, E. R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767.
- Feig, L. A. (2003). Ral-GTPases: approaching their 15 minutes of fame. *Trends Cell Biol* 13, 419-425.
- Ferro, E., and Trabalzini, L. (2010). RalGDS family members couple Ras to Ral signalling and that's not all. *Cell Signal* 22, 1804-1810.
- Fields, P. E., Gajewski, T. F., and Fitch, F. W. (1996). Blocked Ras activation in anergic CD4+ T cells. *Science* 271, 1276-1278.
- Finco, T. S., Kadlecsek, T., Zhang, W., Samelson, L. E., and Weiss, A. (1998). LAT is required for TCR-mediated activation of PLCgamma1 and the Ras pathway. *Immunity* 9, 617-626.
- Fitzgerald, K. A., McWhirter, S. M., Faia, K. L., Rowe, D. C., Latz, E., Golenbock, D. T., Coyle, A. J., Liao, S. M., and Maniatis, T. (2003). IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* 4, 491-496.
- Frankel, P., Aronheim, A., Kavanagh, E., Balda, M. S., Matter, K., Bunney, T. D., and Marshall, C. J. (2005). RalA interacts with ZONAB in a cell density-dependent manner and regulates its transcriptional activity. *Embo J* 24, 54-62.
- Freire-de-Lima, C. G., Xiao, Y. Q., Gardai, S. J., Bratton, D. L., Schiemann, W. P., and Henson, P. M. (2006). Apoptotic cells, through transforming growth factor-beta, coordinately induce anti-inflammatory and suppress pro-inflammatory eicosanoid and NO synthesis in murine macrophages. *J Biol Chem* 281, 38376-38384.
- Gallegos, A. M., and Bevan, M. J. (2004). Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J Exp Med* 200, 1039-1049.
- Germain, R. N. (2002). T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* 2, 309-322.
- Gibson, D. J., Ryan, E. J., and Doherty, G. A. (2013). Keeping the bowel regular: the emerging role of Treg as a therapeutic target in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 19, 2716-2724.
- Gillen, C. D., Walmsley, R. S., Prior, P., Andrews, H. A., and Allan, R. N. (1994). Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. *Gut* 35, 1590-1592.
- Gobert, A. P., Cheng, Y., Akhtar, M., Mersey, B. D., Blumberg, D. R., Cross, R. K., Chaturvedi, R., Drachenberg, C. B., Boucher, J. L., Hacker, A., *et al.* (2004). Protective role of arginase in a mouse model of colitis. *J Immunol* 173, 2109-2117.
- Goi, T., Shipitsin, M., Lu, Z., Foster, D. A., Klinz, S. G., and Feig, L. A. (2000). An EGF receptor/Ral-GTPase signaling cascade regulates c-Src activity and substrate specificity. *Embo J* 19, 623-630.
- Gong, Q., Cheng, A. M., Akk, A. M., Alberola-Ila, J., Gong, G., Pawson, T., and Chan, A. C. (2001). Disruption of T cell signaling networks and development by Grb2 haploid insufficiency. *Nat Immunol* 2, 29-36.
- Gonzalez-Garcia, A., Pritchard, C. A., Paterson, H. F., Mavria, G., Stamp, G., and Marshall, C. J. (2005). RalGDS is required for tumor formation in a model of skin carcinogenesis. *Cancer Cell* 7, 219-226.
- Greten, F. R., Eckmann, L., Greten, T. F., Park, J. M., Li, Z. W., Egan, L. J., Kagnoff, M. F., and Karin, M. (2004). IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 118, 285-296.

- Grivennikov, S., Karin, E., Terzic, J., Mucida, D., Yu, G. Y., Vallabhapurapu, S., Scheller, J., Rose-John, S., Cheroutre, H., Eckmann, L., and Karin, M. (2009). IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* *15*, 103-113.
- Gyde, S. N., Prior, P., Macartney, J. C., Thompson, H., Waterhouse, J. A., and Allan, R. N. (1980). Malignancy in Crohn's disease. *Gut* *21*, 1024-1029.
- Hamad, N. M., Elconin, J. H., Karnoub, A. E., Bai, W., Rich, J. N., Abraham, R. T., Der, C. J., and Counter, C. M. (2002). Distinct requirements for Ras oncogenesis in human versus mouse cells. *Genes Dev* *16*, 2045-2057.
- Hao, Y., Wong, R., and Feig, L. A. (2008). RalGDS couples growth factor signaling to Akt activation. *Mol Cell Biol* *28*, 2851-2859.
- Hare, K. J., Wilkinson, R. W., Jenkinson, E. J., and Anderson, G. (1998). Identification of a developmentally regulated phase of postselection expansion driven by thymic epithelium. *J Immunol* *160*, 3666-3672.
- Hazelett, C. C., Sheff, D., and Yeaman, C. (2011). RalA and RalB differentially regulate development of epithelial tight junctions. *Mol Biol Cell* *22*, 4787-4800.
- Heinzlmann, M., Lang, S. M., Neynaber, S., Reinshagen, M., Emmrich, J., Stratakis, D. F., Heldwein, W., Wiebecke, B., and Loeschke, K. (2002). Screening for p53 and K-ras mutations in whole-gut lavage in chronic inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* *14*, 1061-1066.
- Henry, D. O., Moskalenko, S. A., Kaur, K. J., Fu, M., Pestell, R. G., Camonis, J. H., and White, M. A. (2000). Ral GTPases contribute to regulation of cyclin D1 through activation of NF-kappaB. *Mol Cell Biol* *20*, 8084-8092.
- Hinton, H. J., Alessi, D. R., and Cantrell, D. A. (2004). The serine kinase phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) regulates T cell development. *Nat Immunol* *5*, 539-545.
- Hirano, T., Ishihara, K., and Hibi, M. (2000). Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* *19*, 2548-2556.
- Hsu, S. C., Wu, C. C., Han, J., and Lai, M. Z. (2003). Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in different stages of thymocyte development. *Blood* *101*, 970-976.
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wei, L. H., Bauer, P. M., Wu, G., and del Soldato, P. (2001). Role of the arginine-nitric oxide pathway in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 4202-4208.
- Irving, B. A., Chan, A. C., and Weiss, A. (1993). Functional characterization of a signal transducing motif present in the T cell antigen receptor zeta chain. *J Exp Med* *177*, 1093-1103.
- Irving, M. H., and Catchpole, B. (1992). ABC of colorectal diseases. Anatomy and physiology of the colon, rectum, and anus. *Bmj* *304*, 1106-1108.
- Ismail, A. S., Behrendt, C. L., and Hooper, L. V. (2009). Reciprocal interactions between commensal bacteria and gamma delta intraepithelial lymphocytes during mucosal injury. *J Immunol* *182*, 3047-3054.
- Jiang, H., Luo, J. Q., Urano, T., Frankel, P., Lu, Z., Foster, D. A., and Feig, L. A. (1995). Involvement of Ral GTPase in v-Src-induced phospholipase D activation. *Nature* *378*, 409-412.
- Johnson, D. S., and Chen, Y. H. (2012). Ras family of small GTPases in immunity and inflammation. *Curr Opin Pharmacol* *12*, 458-463.
- Juntilla, M. M., Wofford, J. A., Birnbaum, M. J., Rathmell, J. C., and Koretzky, G. A. (2007). Akt1 and Akt2 are required for alphabeta thymocyte survival and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 12105-12110.
- Kappler, J. W., Wade, T., White, J., Kushnir, E., Blackman, M., Bill, J., Roehm, N., and Marrack, P. (1987). A T cell receptor V beta segment that imparts reactivity to a class II major histocompatibility complex product. *Cell* *49*, 263-271.
- Kashatus, D. F. (2013). Ral GTPases in tumorigenesis: emerging from the shadows. *Exp Cell Res* *319*, 2337-2342.

- Kishida, S., Koyama, S., Matsubara, K., Kishida, M., Matsuura, Y., and Kikuchi, A. (1997). Colocalization of Ras and Ral on the membrane is required for Ras-dependent Ral activation through Ral GDP dissociation stimulator. *Oncogene* 15, 2899-2907.
- Kisielow, P., Teh, H. S., Bluthmann, H., and von Boehmer, H. (1988). Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature* 335, 730-733.
- Knutson, C. G., Mangerich, A., Zeng, Y., Raczynski, A. R., Liberman, R. G., Kang, P., Ye, W., Prestwich, E. G., Lu, K., Wishnok, J. S., *et al.* (2013). Chemical and cytokine features of innate immunity characterize serum and tissue profiles in inflammatory bowel disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E2332-2341.
- Koch, U., and Radtke, F. (2011). Mechanisms of T cell development and transformation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27, 539-562.
- Kolanus, W., Romeo, C., and Seed, B. (1993). T cell activation by clustered tyrosine kinases. *Cell* 74, 171-183.
- Komano, H., Fujiura, Y., Kawaguchi, M., Matsumoto, S., Hashimoto, Y., Obana, S., Mombaerts, P., Tonegawa, S., Yamamoto, H., Itoharu, S., and *et al.* (1995). Homeostatic regulation of intestinal epithelia by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6147-6151.
- Kortum, R. L., Rouquette-Jazdanian, A. K., and Samelson, L. E. (2013). Ras and extracellular signal-regulated kinase signaling in thymocytes and T cells. *Trends Immunol* 34, 259-268.
- Kraus, S., and Arber, N. (2009). Inflammation and colorectal cancer. *Curr Opin Pharmacol* 9, 405-410.
- Kunisawa, J., Takahashi, I., and Kiyono, H. (2007). Intraepithelial lymphocytes: their shared and divergent immunological behaviors in the small and large intestine. *Immunol Rev* 215, 136-153.
- Lee, S. H., Chung, Y. H., Cho, N. H., Gwack, Y., Feng, P., and Jung, J. U. (2004). Modulation of T-cell receptor signal transduction by herpesvirus signaling adaptor protein. *Mol Cell Biol* 24, 5369-5382.
- Lesourne, R., Uehara, S., Lee, J., Song, K. D., Li, L., Pinkhasov, J., Zhang, Y., Weng, N. P., Wildt, K. F., Wang, L., *et al.* (2009). Themis, a T cell-specific protein important for late thymocyte development. *Nat Immunol* 10, 840-847.
- Lim, K. H., Baines, A. T., Fiordalisi, J. J., Shipitsin, M., Feig, L. A., Cox, A. D., Der, C. J., and Counter, C. M. (2005). Activation of RalA is critical for Ras-induced tumorigenesis of human cells. *Cancer Cell* 7, 533-545.
- Lim, K. H., O'Hayer, K., Adam, S. J., Kendall, S. D., Campbell, P. M., Der, C. J., and Counter, C. M. (2006). Divergent roles for RalA and RalB in malignant growth of human pancreatic carcinoma cells. *Curr Biol* 16, 2385-2394.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Lucas, B., and Germain, R. N. (1996). Unexpectedly complex regulation of CD4/CD8 coreceptor expression supports a revised model for CD4+CD8+ thymocyte differentiation. *Immunity* 5, 461-477.
- Luo, J. Q., Liu, X., Hammond, S. M., Colley, W. C., Feig, L. A., Frohman, M. A., Morris, A. J., and Foster, D. A. (1997). RalA interacts directly with the Arf-responsive, PIP2-dependent phospholipase D1. *Biochem Biophys Res Commun* 235, 854-859.
- Lyda, M. H., Noffsinger, A., Belli, J., and Fenoglio-Preiser, C. M. (2000). Microsatellite instability and K-ras mutations in patients with ulcerative colitis. *Hum Pathol* 31, 665-671.
- Madison, B. B., Dunbar, L., Qiao, X. T., Braunstein, K., Braunstein, E., and Gumucio, D. L. (2002). Cis elements of the villin gene control expression in restricted domains of the vertical (crypt) and horizontal (duodenum, cecum) axes of the intestine. *J Biol Chem* 277, 33275-33283.
- Male, H., Patel, V., Jacob, M. A., Borrego-Diaz, E., Wang, K., Young, D. A., Wise, A. L., Huang, C., Van Veldhuizen, P., O'Brien-Ladner, A., *et al.* (2012). Inhibition of RalA signaling pathway in treatment of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 77, 252-259.

- Mamchak, A. A., Thien, C. B., Dagger, S. A., Lyandres, J., Jiang, S., Langdon, W. Y., and DeFranco, A. L. (2010). Unaltered negative selection and Treg development of self-reactive thymocytes in TCR transgenic Fyn-deficient mice. *Eur J Immunol* *40*, 539-547.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* *454*, 436-444.
- Mantovani, A., Sica, A., and Locati, M. (2007). New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur J Immunol* *37*, 14-16.
- Mariathasan, S., Zakarian, A., Bouchard, D., Michie, A. M., Zuniga-Pflucker, J. C., and Ohashi, P. S. (2001). Duration and strength of extracellular signal-regulated kinase signals are altered during positive versus negative thymocyte selection. *J Immunol* *167*, 4966-4973.
- Markowitz, S. D., and Bertagnolli, M. M. (2009). Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med* *361*, 2449-2460.
- Martin, T. D., Samuel, J. C., Routh, E. D., Der, C. J., and Yeh, J. J. (2011). Activation and involvement of Ral GTPases in colorectal cancer. *Cancer Res* *71*, 206-215.
- Martin-Fontecha, A., Thomsen, L. L., Brett, S., Gerard, C., Lipp, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2004). Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol* *5*, 1260-1265.
- Matsubara, K., Kishida, S., Matsuura, Y., Kitayama, H., Noda, M., and Kikuchi, A. (1999). Plasma membrane recruitment of RalGDS is critical for Ras-dependent Ral activation. *Oncogene* *18*, 1303-1312.
- McGuckin, M. A., Eri, R., Simms, L. A., Florin, T. H., and Radford-Smith, G. (2009). Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* *15*, 100-113.
- McWhirter, S. M., Fitzgerald, K. A., Rosains, J., Rowe, D. C., Golenbock, D. T., and Maniatis, T. (2004). IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 233-238.
- Molodecky, N. A., Soon, I. S., Rabi, D. M., Ghali, W. A., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E. I., Panaccione, R., Ghosh, S., Barkema, H. W., and Kaplan, G. G. (2012). Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* *142*, 46-54 e42; quiz e30.
- Morrison, R. F., and Seidel, E. R. (1995). Vascular endothelial cell proliferation: regulation of cellular polyamines. *Cardiovasc Res* *29*, 841-847.
- Morrissey, P. J., Charrier, K., Braddy, S., Liggitt, D., and Watson, J. D. (1993). CD4+ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4+ T cells. *J Exp Med* *178*, 237-244.
- Moskalenko, S., Henry, D. O., Rosse, C., Mirey, G., Camonis, J. H., and White, M. A. (2002). The exocyst is a Ral effector complex. *Nat Cell Biol* *4*, 66-72.
- Mosser, D. M., and Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* *8*, 958-969.
- Mott, H. R., and Owen, D. (2010). RLIP76 (RalBP1): The first piece of the structural puzzle. *Small GTPases* *1*, 157-160.
- Mowat, A. M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* *3*, 331-341.
- Muller, S., Lory, J., Corazza, N., Griffiths, G. M., Z'Graggen, K., Mazzucchelli, L., Kappeler, A., and Mueller, C. (1998). Activated CD4+ and CD8+ cytotoxic cells are present in increased numbers in the intestinal mucosa from patients with active inflammatory bowel disease. *Am J Pathol* *152*, 261-268.
- Nathan, C. (1995). Natural resistance and nitric oxide. *Cell* *82*, 873-876.
- Nathan, L., Cuevas, J., and Chaudhuri, G. (1995). The role of nitric oxide in the altered vascular reactivity of

pregnancy in the rat. *Br J Pharmacol* 114, 955-960.

Neel, N. F., Martin, T. D., Stratford, J. K., Zand, T. P., Reiner, D. J., and Der, C. J. (2011). The RalGEF-Ral Effector Signaling Network: The Road Less Traveled for Anti-Ras Drug Discovery. *Genes Cancer* 2, 275-287.

Neufert, C., Becker, C., and Neurath, M. F. (2007). An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nat Protoc* 2, 1998-2004.

Ng, S. C., Plamondon, S., Al-Hassi, H. O., English, N., Gellatly, N., Kamm, M. A., Knight, S. C., and Stagg, A. J. (2009). A novel population of human CD56<sup>+</sup> human leucocyte antigen D-related (HLA-DR<sup>+</sup>) colonic lamina propria cells is associated with inflammation in ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 158, 205-218.

Norman, K. L., Hirasawa, K., Yang, A. D., Shields, M. A., and Lee, P. W. (2004). Reovirus oncolysis: the Ras/RalGEF/p38 pathway dictates host cell permissiveness to reovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11099-11104.

Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., and Nakaya, R. (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98, 694-702.

Omidvar, N., Pearn, L., Burnett, A. K., and Darley, R. L. (2006). Ral is both necessary and sufficient for the inhibition of myeloid differentiation mediated by Ras. *Mol Cell Biol* 26, 3966-3975.

Osawa, E., Nakajima, A., Fujisawa, T., Kawamura, Y. I., Toyama-Sorimachi, N., Nakagama, H., and Dohi, T. (2006). Predominant T helper type 2-inflammatory responses promote murine colon cancers. *Int J Cancer* 118, 2232-2236.

Osei-Sarfo, K., Martello, L., Ibrahim, S., and Pellicer, A. (2011). The human Rgr oncogene is overexpressed in T-cell malignancies and induces transformation by acting as a GEF for Ras and Ral. *Oncogene* 30, 3661-3671.

Ouwens, D. M., de Ruiter, N. D., van der Zon, G. C., Carter, A. P., Schouten, J., van der Burgt, C., Kooistra, K., Bos, J. L., Maassen, J. A., and van Dam, H. (2002). Growth factors can activate ATF2 via a two-step mechanism: phosphorylation of Thr71 through the Ras-MEK-ERK pathway and of Thr69 through RalGDS-*Src*-p38. *Embo J* 21, 3782-3793.

Oxford, G., Owens, C. R., Titus, B. J., Foreman, T. L., Herlevsen, M. C., Smith, S. C., and Theodorescu, D. (2005). RalA and RalB: antagonistic relatives in cancer cell migration. *Cancer Res* 65, 7111-7120.

Oxford, G., and Theodorescu, D. (2003a). Ras superfamily monomeric G proteins in carcinoma cell motility. *Cancer Lett* 189, 117-128.

Oxford, G., and Theodorescu, D. (2003b). The role of Ras superfamily proteins in bladder cancer progression. *J Urol* 170, 1987-1993.

Pages, G., Guerin, S., Grall, D., Bonino, F., Smith, A., Anjuere, F., Auberger, P., and Pouyssegur, J. (1999). Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* 286, 1374-1377.

Pang, S. S., Berry, R., Chen, Z., Kjer-Nielsen, L., Perugini, M. A., King, G. F., Wang, C., Chew, S. H., La Gruta, N. L., Williams, N. K., *et al.* (2010). The structural basis for autonomous dimerization of the pre-T-cell antigen receptor. *Nature* 467, 844-848.

Peschard, P., McCarthy, A., Leblanc-Dominguez, V., Yeo, M., Guichard, S., Stamp, G., and Marshall, C. J. (2012). Genetic deletion of RALA and RALB small GTPases reveals redundant functions in development and tumorigenesis. *Curr Biol* 22, 2063-2068.

Phee, H., Dzhagalov, I., Mollenauer, M., Wang, Y., Irvine, D. J., Robey, E., and Weiss, A. (2010). Regulation of thymocyte positive selection and motility by GIT2. *Nat Immunol* 11, 503-511.

Podolsky, D. K. (2002). Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 347, 417-429.

Porta, C., Larghi, P., Rimoldi, M., Totaro, M. G., Allavena, P., Mantovani, A., and Sica, A. (2009). Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. *Immunobiology* 214, 761-777.

Powrie, F., Leach, M. W., Mauze, S., Caddle, L. B., and Coffman, R. L. (1993). Phenotypically distinct subsets

- of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int Immunol* 5, 1461-1471.
- Pull, S. L., Doherty, J. M., Mills, J. C., Gordon, J. I., and Stappenbeck, T. S. (2005). Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 99-104.
- Raab, M., Cai, Y. C., Bunnell, S. C., Heyeck, S. D., Berg, L. J., and Rudd, C. E. (1995). p56Lck and p59Fyn regulate CD28 binding to phosphatidylinositol 3-kinase, growth factor receptor-bound protein GRB-2, and T cell-specific protein-tyrosine kinase ITK: implications for T-cell costimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8891-8895.
- Ramiro-Puig, E., Perez-Cano, F. J., Castellote, C., Franch, A., and Castell, M. (2008). [The bowel: a key component of the immune system]. *Rev Esp Enferm Dig* 100, 29-34.
- Rayter, S. I., Woodrow, M., Lucas, S. C., Cantrell, D. A., and Downward, J. (1992). p21ras mediates control of IL-2 gene promoter function in T cell activation. *Embo J* 11, 4549-4556.
- Rescigno, M. (2013). Mucosal immunology and bacterial handling in the intestine. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 27, 17-24.
- Rincon, M., Whitmarsh, A., Yang, D. D., Weiss, L., Derijard, B., Jayaraj, P., Davis, R. J., and Flavell, R. A. (1998). The JNK pathway regulates the In vivo deletion of immature CD4(+)CD8(+) thymocytes. *J Exp Med* 188, 1817-1830.
- Roberts-Thomson, I. C., Fon, J., Uylaki, W., Cummins, A. G., and Barry, S. (2011). Cells, cytokines and inflammatory bowel disease: a clinical perspective. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 5, 703-716.
- Rogler, G. (2013). Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer. *Cancer Lett*.
- Rusanescu, G., Gotoh, T., Tian, X., and Feig, L. A. (2001). Regulation of Ras signaling specificity by protein kinase C. *Mol Cell Biol* 21, 2650-2658.
- Saito, R., Shirakawa, R., Nishiyama, H., Kobayashi, T., Kawato, M., Kanno, T., Nishizawa, K., Matsui, Y., Ohbayashi, T., Horiguchi, M., *et al.* (2013). Downregulation of Ral GTPase-activating protein promotes tumor invasion and metastasis of bladder cancer. *Oncogene* 32, 894-902.
- Salimuddin, Nagasaki, A., Gotoh, T., Isobe, H., and Mori, M. (1999). Regulation of the genes for arginase isoforms and related enzymes in mouse macrophages by lipopolysaccharide. *Am J Physiol* 277, E110-117.
- Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708-712.
- Sanchez-Munoz, F., Dominguez-Lopez, A., and Yamamoto-Furusho, J. K. (2008). Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 14, 4280-4288.
- Sanchez-Ruiz, J., Mejias, R., Garcia-Belando, M., Barber, D. F., and Gonzalez-Garcia, A. (2011). Ral GTPases regulate cell-mediated cytotoxicity in NK cells. *J Immunol* 187, 2433-2441.
- Sanchez-Ruiz, J. (2011). Papel de las GTPasas Ral en la función linfoide y la citotoxicidad celular. Tesis Doctoral.
- Sanos, S. L., and Diefenbach, A. (2010). Isolation of NK cells and NK-like cells from the intestinal lamina propria. *Methods Mol Biol* 612, 505-517.
- Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211-225.
- Sharma, S., tenOever, B. R., Grandvaux, N., Zhou, G. P., Lin, R., and Hiscott, J. (2003). Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* 300, 1148-1151.
- Shearer, J. D., Richards, J. R., Mills, C. D., and Caldwell, M. D. (1997). Differential regulation of macrophage arginine metabolism: a proposed role in wound healing. *Am J Physiol* 272, E181-190.



- Sheikh, S. Z., and Plevy, S. E. (2010). The role of the macrophage in sentinel responses in intestinal immunity. *Curr Opin Gastroenterol* 26, 578-582.
- Shimamoto, M., Ueno, Y., Tanaka, S., Onitake, T., Hanaoka, R., Yoshioka, K., Hatakeyama, T., and Chayama, K. (2007). Selective decrease in colonic CD56(+) T and CD161(+) T cells in the inflamed mucosa of patients with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 13, 5995-6002.
- Shintani, N., Nakajima, T., Okamoto, T., Kondo, T., Nakamura, N., and Mayumi, T. (1998). Involvement of CD4+ T cells in the development of dextran sulfate sodium-induced experimental colitis and suppressive effect of IgG on their action. *Gen Pharmacol* 31, 477-481.
- Sidhu, R. S., Clough, R. R., and Bhullar, R. P. (2005). Regulation of phospholipase C-delta1 through direct interactions with the small GTPase Ral and calmodulin. *J Biol Chem* 280, 21933-21941.
- Siegel, R., Naishadham, D., and Jemal, A. (2012). Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 62, 10-29.
- Simpson, S. J., Mizoguchi, E., Allen, D., Bhan, A. K., and Terhorst, C. (1995). Evidence that CD4+, but not CD8+ T cells are responsible for murine interleukin-2-deficient colitis. *Eur J Immunol* 25, 2618-2625.
- Singh, R., Pervin, S., Karimi, A., Cederbaum, S., and Chaudhuri, G. (2000). Arginase activity in human breast cancer cell lines: N(omega)-hydroxy-L-arginine selectively inhibits cell proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-468 cells. *Cancer Res* 60, 3305-3312.
- Smith, S. C., Oxford, G., Baras, A. S., Owens, C., Havaleshko, D., Brautigan, D. L., Safo, M. K., and Theodorescu, D. (2007). Expression of ral GTPases, their effectors, and activators in human bladder cancer. *Clin Cancer Res* 13, 3803-3813.
- Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A., and Jordan, M. S. (2009). T cell activation. *Annu Rev Immunol* 27, 591-619.
- Smithson, J. E., Campbell, A., Andrews, J. M., Milton, J. D., Pigott, R., and Jewell, D. P. (1997). Altered expression of mucins throughout the colon in ulcerative colitis. *Gut* 40, 234-240.
- Soderholm, J. D., Malm, C., Juliusson, G., and Sjodahl, R. (2002). Long-term endoscopic remission of crohn disease after autologous stem cell transplantation for acute myeloid leukaemia. *Scand J Gastroenterol* 37, 613-616.
- Sohn, S. J., Thompson, J., and Winoto, A. (2007). Apoptosis during negative selection of autoreactive thymocytes. *Curr Opin Immunol* 19, 510-515.
- Sommers, C. L., Samelson, L. E., and Love, P. E. (2004). LAT: a T lymphocyte adapter protein that couples the antigen receptor to downstream signaling pathways. *Bioessays* 26, 61-67.
- Sonoki, T., Nagasaki, A., Gotoh, T., Takiguchi, M., Takeya, M., Matsuzaki, H., and Mori, M. (1997). Coinduction of nitric-oxide synthase and arginase I in cultured rat peritoneal macrophages and rat tissues in vivo by lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 272, 3689-3693.
- Souza, H. S., Tortori, C. J., Castelo-Branco, M. T., Carvalho, A. T., Margallo, V. S., Delgado, C. F., Dines, I., and Elia, C. C. (2005). Apoptosis in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease: evidence of altered expression of FasL and perforin cytotoxic pathways. *Int J Colorectal Dis* 20, 277-286.
- Sowalsky, A. G., Alt-Holland, A., Shamis, Y., Garlick, J. A., and Feig, L. A. (2010). RalA suppresses early stages of Ras-induced squamous cell carcinoma progression. *Oncogene* 29, 45-55.
- Starr, T. K., Jameson, S. C., and Hogquist, K. A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 21, 139-176.
- Steel, A. W., Mela, C. M., Lindsay, J. O., Gazzard, B. G., and Goodier, M. R. (2011). Increased proportion of CD16(+) NK cells in the colonic lamina propria of inflammatory bowel disease patients, but not after azathioprine treatment. *Aliment Pharmacol Ther* 33, 115-126.
- Stein, P. L., Lee, H. M., Rich, S., and Soriano, P. (1992). pp59fyn mutant mice display differential signaling in thymocytes and peripheral T cells. *Cell* 70, 741-750.

- Straus, D. B., and Weiss, A. (1992). Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell* 70, 585-593.
- Sugawara, T., Moriguchi, T., Nishida, E., and Takahama, Y. (1998). Differential roles of ERK and p38 MAP kinase pathways in positive and negative selection of T lymphocytes. *Immunity* 9, 565-574.
- Suzuki, H., Punt, J. A., Granger, L. G., and Singer, A. (1995). Asymmetric signaling requirements for thymocyte commitment to the CD4+ versus CD8+ T cell lineages: a new perspective on thymic commitment and selection. *Immunity* 2, 413-425.
- Swan, K. A., Alberola-Ila, J., Gross, J. A., Appleby, M. W., Forbush, K. A., Thomas, J. F., and Perlmutter, R. M. (1995). Involvement of p21ras distinguishes positive and negative selection in thymocytes. *Embo J* 14, 276-285.
- Swat, W., Shinkai, Y., Cheng, H. L., Davidson, L., and Alt, F. W. (1996). Activated Ras signals differentiation and expansion of CD4+8+ thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4683-4687.
- Takigawa, M., Enomoto, M., Nishida, Y., Pan, H. O., Kinoshita, A., and Suzuki, F. (1990). Tumor angiogenesis and polyamines: alpha-difluoromethylornithine, an irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase, inhibits B16 melanoma-induced angiogenesis in ovo and the proliferation of vascular endothelial cells in vitro. *Cancer Res* 50, 4131-4138.
- Tian, X., Rusanescu, G., Hou, W., Schaffhausen, B., and Feig, L. A. (2002). PDK1 mediates growth factor-induced Ral-GEF activation by a kinase-independent mechanism. *Embo J* 21, 1327-1338.
- van Dam, E. M., and Robinson, P. J. (2006). Ral: mediator of membrane trafficking. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 1841-1847.
- van Oers, N. S. (1999). T cell receptor-mediated signs and signals governing T cell development. *Semin Immunol* 11, 227-237.
- Vanhecke, D., Verhasselt, B., De Smedt, M., Leclercq, G., Plum, J., and Vandekerckhove, B. (1997). Human thymocytes become lineage committed at an early postselection CD69+ stage, before the onset of functional maturation. *J Immunol* 159, 5973-5983.
- Vigil, D., Martin, T. D., Williams, F., Yeh, J. J., Campbell, S. L., and Der, C. J. (2010). Aberrant overexpression of the Rgl2 Ral small GTPase-specific guanine nucleotide exchange factor promotes pancreatic cancer growth through Ral-dependent and Ral-independent mechanisms. *J Biol Chem* 285, 34729-34740.
- von Boehmer, H. (1994). Positive selection of lymphocytes. *Cell* 76, 219-228.
- Waldner, M. J., and Neurath, M. F. (2009). Colitis-associated cancer: the role of T cells in tumor development. *Semin Immunopathol* 31, 249-256.
- Wang, H., Owens, C., Chandra, N., Conaway, M. R., Brautigan, D. L., and Theodorescu, D. (2010). Phosphorylation of RalB is important for bladder cancer cell growth and metastasis. *Cancer Res* 70, 8760-8769.
- Wange, R. L. (2000). LAT, the linker for activation of T cells: a bridge between T cell-specific and general signaling pathways. *Sci STKE* 2000, re1.
- Weedon, D. D., Shorter, R. G., Ilstrup, D. M., Huizenga, K. A., and Taylor, W. F. (1973). Crohn's disease and cancer. *N Engl J Med* 289, 1099-1103.
- Wei, L. H., Wu, G., Morris, S. M., Jr., and Ignarro, L. J. (2001). Elevated arginase I expression in rat aortic smooth muscle cells increases cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9260-9264.
- Wennerberg, K., Rossman, K. L., and Der, C. J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 118, 843-846.
- Werlen, G., Hausmann, B., and Palmer, E. (2000). A motif in the alphabeta T-cell receptor controls positive selection by modulating ERK activity. *Nature* 406, 422-426.
- Wolthuis, R. M., and Bos, J. L. (1999). Ras caught in another affair: the exchange factors for Ral. *Curr Opin*

Genet Dev 9, 112-117.

Wolthuis, R. M., de Ruiter, N. D., Cool, R. H., and Bos, J. L. (1997). Stimulation of gene induction and cell growth by the Ras effector Rlf. *Embo J* 16, 6748-6761.

Wu, J. C., Chen, T. Y., Yu, C. T., Tsai, S. J., Hsu, J. M., Tang, M. J., Chou, C. K., Lin, W. J., Yuan, C. J., and Huang, C. Y. (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, 9013-9022.

Yamashita, I., Nagata, T., Tada, T., and Nakayama, T. (1993). CD69 cell surface expression identifies developing thymocytes which audition for T cell antigen receptor-mediated positive selection. *Int Immunol* 5, 1139-1150.

Yin, J., Pollock, C., Tracy, K., Chock, M., Martin, P., Oberst, M., and Kelly, K. (2007). Activation of the RalGEF/Ral pathway promotes prostate cancer metastasis to bone. *Mol Cell Biol* 27, 7538-7550.

Zhang, L., Zhang, J., Lambert, Q., Der, C. J., Del Valle, L., Miklosy, J., Khalili, K., Zhou, Y., and Pagano, J. S. (2004). Interferon regulatory factor 7 is associated with Epstein-Barr virus-transformed central nervous system lymphoma and has oncogenic properties. *J Virol* 78, 12987-12995.

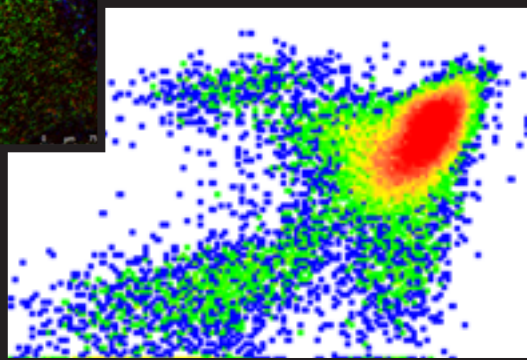
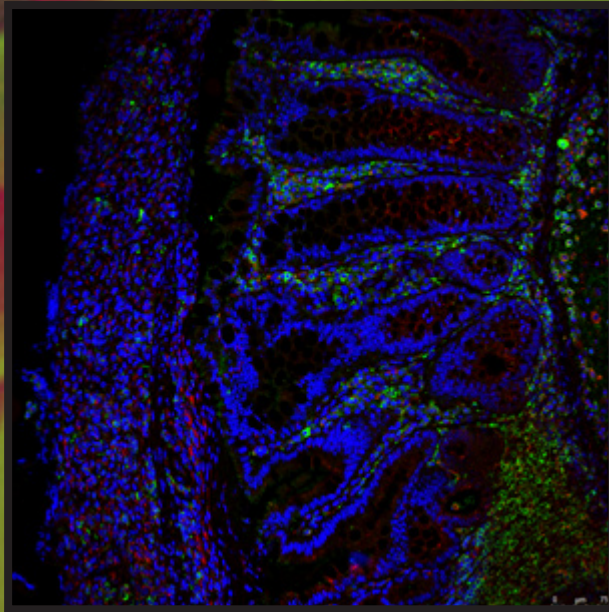
Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R. P., and Samelson, L. E. (1998). LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 92, 83-92.



*“Todo parece imposible hasta que se hace”*

Nelson Mandela





Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Inmunología y Oncología del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) dentro del programa de doctorado de Bioquímica, Biología Molecular, Biomedicina y Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid.

En esta memoria se muestran los resultados obtenidos tras el estudio de la función de RalGDS tanto en el desarrollo del cáncer de colon asociado a inflamación como en el desarrollo de la célula T en el timo.

Las imágenes de la contraportada son características del trabajo realizado, mostrándose una tinción de inmunofluorescencia de linfocitos T (verde) y de macrófagos (rojo) en el colon de ratones  $RalGDS^{f/f}/LysM-Cre^{-/-}$  y un gráfico de densidad de citometría de flujo de las poblaciones que definen el desarrollo de la célula T en el timo (DN, DP, CD4 SP, CD8 SP) de un ratón  $RalGDS^{-/-}$ xOT-I.