

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS –BIOQUÍMICA

**GANGLIOSÍDIOS E A MODULAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO MEDIADA
PELO FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIAS DE MACRÓFAGOS E
GRANULÓCITOS (GM-CSF)**

Dissertação de Mestrado

ALINE XAVIER DA SILVEIRA DOS SANTOS

Porto Alegre, 2009

ALINE XAVIER DA SILVEIRA DOS SANTOS

**GANGLIOSÍDIOS E A MODULAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO MEDIADA
PELO FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIAS DE MACRÓFAGOS E
GRANULÓCITOS (GM-CSF)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica.

**Orientadora: Prof^ª Fátima Teresinha Costa Rodrigues Guma
Co-orientadora: Prof^ª Vera Maria Treis Trindade**

Porto Alegre, 2009

SUMÁRIO

PARTE I

RESUMO	2
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS	4
INTRODUÇÃO	5
1. Gangliosídios	
1.1. Conceito, biossíntese, transporte e reciclagem intracelular	5
1.2 Gangliosídios e microdomínios de membrana	8
2. Hematopoiese	13
2.1. Conceito e características	13
2.2. Citocinas hematopoiéticas	16
2.3 Sinalização via GM-CSF	17
3. GANGLIOSÍDIOS E HEMATOPOIESE	20
OBJETIVOS	23

PARTE II

CAPÍTULO 1	25
CAPÍTULO 2	52

PARTE III

DISCUSSÃO	69
PERSPECTIVAS	73
REFERÊNCIAS	74
ANEXO 1 – LISTA DE FIGURAS	82
ANEXO 2 – LISTA DE TABELAS	84

PARTE I

RESUMO

Gangliosídeos são glicoesfingolipídios que possuem pelo menos um resíduo de ácido siálico em sua estrutura. Localizam-se principalmente na membrana plasmática, podendo ser encontrados em microdomínios de membrana enriquecidos em colesterol e glicoesfingolipídios, chamados *rafts* - estruturas de membrana dinâmicas consideradas como plataformas de sinalização. Gangliosídeos têm sido amplamente descritos por estarem envolvidos em processos de proliferação em diversos tipos celulares através da modulação de receptores de fatores de crescimento e suas rotas de sinalização. O GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos) é uma das principais citocinas que controlam os eventos da cascata mielopoética. Seu receptor (GMR) é um heterodímero composto de uma sub-unidade alfa ($GMR\alpha$) específica para o ligante e uma sub-unidade beta (β) responsável pela transdução dos sinais de sobrevivência, proliferação e diferenciação celular. O objetivo deste trabalho é estudar a modulação dos gangliosídeos na resposta proliferativa induzida por GM-CSF em uma linhagem mielóide murina, FDC-P1. Para isto, utilizamos abordagens complementares de adição exógena de gangliosídeos purificados e/ou depleção endógena através de um inibidor da enzima glicosilceramida sintase (D-PDMP). Além disso, avaliamos se a modulação observada na resposta ao GM-CSF se dá via ativação do receptor e cascata *downstream*, expressão gênica do GMR e fator de transcrição C/EBP α , distribuição na membrana e da formação de complexos macromoleculares com gangliosídeos. Em resumo, os resultados demonstram que alterações no conteúdo de gangliosídeos celulares podem modular a proliferação induzida por GM-CSF através da modulação de vias de sinalização incluindo eventos de transcrição gênica. Além disso, a caracterização e quantificação diferencial da expressão das isoformas tmGMR α e solGMR α na linhagem FDC-P1, constitui uma interessante ferramenta para análise da modulação da expressão gênica deste receptor em diferentes estudos envolvendo a sinalização via GM-CSF.

ABSTRACT

Gangliosides are glycosphingolipids with at least one residue of siálico acid. They localize mainly at plasma membrane, frequently in microdomains enriched in cholesterol and glycosphingolipids, called *rafts* – dynamic membrane structures related to signaling processes. Gangliosides have been extensively reported to be involved in proliferation in several cell types through the modulation of growth factor receptors and signaling cascades. GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) is one of the major cytokines that regulate myelopoiesis. Its receptor is a heterodimer composed of a specific ligand-binding alpha subunit (GMR α) and a beta subunit (β c) responsible for signal transduction. This work aimed to study the modulation of ganglioside in the GM-CSF-induced proliferation in a murine myeloid lineage, FDC-P1. For that, we used complementary approaches of ganglioside exogenous addition and/or endogenous depletion by the use of a glucosylceramide synthase inhibitor (D-PDMP). Moreover, we studied if the observed proliferative modulation was through modulation of GMR downstream signaling, GMR and C/EBP α gene expression, membrane distribution and receptor complex formation with gangliosides. Taken together, these results indicate that gangliosides (either those arising from extra cellular media or endogenously expressed) modulate GM-CSF-mediated proliferative response through modulation of signaling cascade and gene transcription. Moreover, the characterization of and differential quantification of GMR α isoformas (tmGMR α e solGMR α) in FDC-P1 cell lineage constitute a useful tool to study GMR α gene expression modulation.

LISTA DE ABREVIATURAS

Cer, ceramida
CMP, célula precursora mielóide
CLP, célula precursora linfóide
DRM, microdomínios resistentes a detergente
EGF, fator de crescimento epidermal
EGFR, receptor de fator de crescimento epidermal
Epo, eritropoetina
ERK, proteína quinase regulada por sinal extracelular
FBS, soro fetal bovino
FGF, fator de crescimento de fibroblasto
FGFR, receptor de fator de crescimento de fibroblasto
Gal, galactose
GalNAc-T, UDP-GalNAc:LacCer/GM3/GD3/GT3 *N*-acetilgalactosamiltransferase
Gal-T, UDP-Gal: glicosilceramida galactosiltransferase
GEM, microdomínios enriquecidos em glicosfingolípídios
Glc, glicose
GlcCer, glicosilceramida
G-CSF, fator estimulador de colônias de granulócitos
GM-CSF, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GMR, receptor de fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GM1, β -Gal-(1-3)- β -GalNAc-(1-4)-[α -Neu5Ac-(2-3)]- β -Gal-(1-4)- β -Glc-(1-1)-Cer
GM2, β -GalNAc-(1-4)-[α -Neu5Ac-(2-3)]- β -Gal-(1-4)- β -Glc-(1-1)-Cer
GM3, α -Neu5Ac-(2-3)- β -Gal-(1-4)- β -Glc-(1-1)-Cer
GD1a, α -Neu5Ac-(2-3)- β -Gal-(1-3)- β -GalNAc-(1-4)-[α -Neu5Ac-(2-3)]- β -Gal-(1-4)- β -Glc-(1-1)-Cer
GD3, α -Neu5Ac-(2-8)- α -Neu5Ac-(2-3)- β -Gal-(1-4)- β -Glc-(1-1)-Cer
GT1b, α -Neu5Ac-(2-3)- β -Gal-(1-3)- β -GalNAc-(1-4)-[α -Neu5Ac-(2-8)- α -Neu5Ac-(2-3)]- β -Gal-(1-4)- β -Glc-(1-1)-Cer
GPI, glicosilfosfatidilinositol
GSL, Glicosfingolípídios
HSC, célula tronco hematopoiética
HPTLC, cromatografia em camada delgada de alta performance
IL-2, interleucina-2
IL-3, interleucina-3
IL-4, interleucina-4
IL-5, interleucina-5
IL-6, interleucina-6
IL-7, interleucina-7
JAK, Janus quinase
LacCer, lacotsilceramida
NeuAc, ácido *N*-acetil-neuramínico
MAPK, proteína quinase ativada por mitógeno
PBS, solução de potássio tamponada
PDGF, fator de crescimento derivado de plaquetas
D-PDMP, D-threo-1-fenil-2-decanoilamino-3-morfolino-1-propanol
PI3K, fosfatidil-inositol-3-quinase
SFB, soro fetal bovino
STAT, proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição
tmGMR α , isoforma transmembrana da sub-unidade alfa de GMR
solGMR α , isoforma solúvel da sub-unidade alfa de GMR
VEGF, fator de crescimento epidermal vascular
VEGFR, receptor de fator de crescimento epidermal vascular

INTRODUÇÃO

1 GANGLIOSÍDIOS

1.1 Conceito, biossíntese, transporte e reciclagem intracelular

Glicoesfingolipídios (GSL) compõem uma família heterogênea de lipídios presentes, principalmente, na face externa da membrana plasmática. São moléculas anfipáticas formadas por uma porção glicídica hidrofílica e uma cauda lipídica hidrofóbica (ceramida, formada por uma base esfingóide e um ácido graxo). Inúmeras combinações possíveis de bases esfingóides, ácidos graxos e cadeias oligossacarídicas são responsáveis pela vasta heterogeneidade de estruturas nesta classe de moléculas. Em eucariotos, a porção glicídica básica é um monossacarídeo (glicose ou galactose) que juntamente com a ceramida formam glicosilceramida ou galactosilceramida (Varki *et al*, 1999).

Gangliosídios são glicoesfingolipídios complexos que contém pelo menos um resíduo de ácido siálico na sua estrutura (ácido N-acetilneuramínico ou ácido N-glicolilneuramínico). A nomenclatura comumente utilizada foi proposta por Svennerholm (1956; 1963) e baseia-se no número de ácidos siálicos presentes na molécula e na sua mobilidade cromatográfica, correspondente à complexidade estrutural dos gangliosídios.

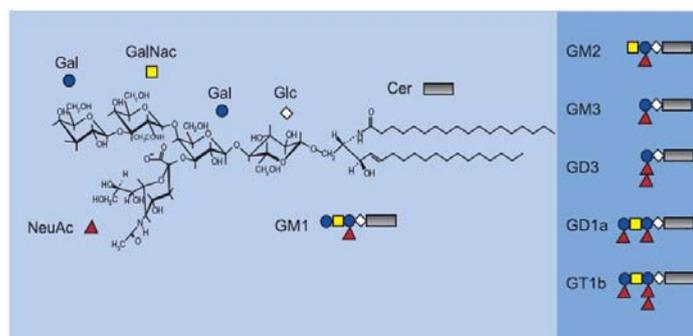


Figura 1 – Representação esquemática da estrutura química de alguns gangliosídios.
Cer: ceramida, Glc: glicose, Gal: galactose, GalNac: N-acetilgalactosamina, NeuAc: ácido

N-acetil-neuramínico. GM2, GM3, GD3, GD1a, GT1b: gangliosídios (Miljan & Bremer, 2002).

Os compostos são abreviados pela letra G, seguido pelas letras maiúsculas M (monosialo), D (disialo), T (trisialo), Q (tetrasialo), P (pentasialo), H (hexasialo) e S (septasialo) para designar a presença de um a sete resíduos de ácido siálico, respectivamente, e mais um número e/ou letra minúscula para distinguir os diferentes membros de cada grupo (Figura 1) (Zeller & Marchase, 1992).

A síntese *de novo* de gangliosídios inicia-se pela conversão de uma molécula de glicosilceramida (GlcCer) a lactosilceramida (LacCer) na face interna do Complexo de Golgi seguido da ação seqüencial de diferentes glicosil-, galactosil-, N-acetilgalactosaminil- e sialiltransferases que darão origem as séries *o*, *a*, *b*, *e c* de gangliosídios (Maccioni et al, 1999) (Figura 2).

O transporte dos gangliosídios recém sintetizados até a membrana plasmática é feito através de vesículas pelo fluxo exocítico, um processo de tráfego intracelular compartilhado com proteínas, regulado para a adequada distribuição lipídica e protéica na membrana plasmática e demais organelas. A degradação de gangliosídios, por sua vez, ocorre através do fluxo endocítico, na via de degradação endossomal-lisossomal, em compartimentos acídicos pela ação seqüencial de hidrolases específicas (Tettamanti *et al*, 2003).

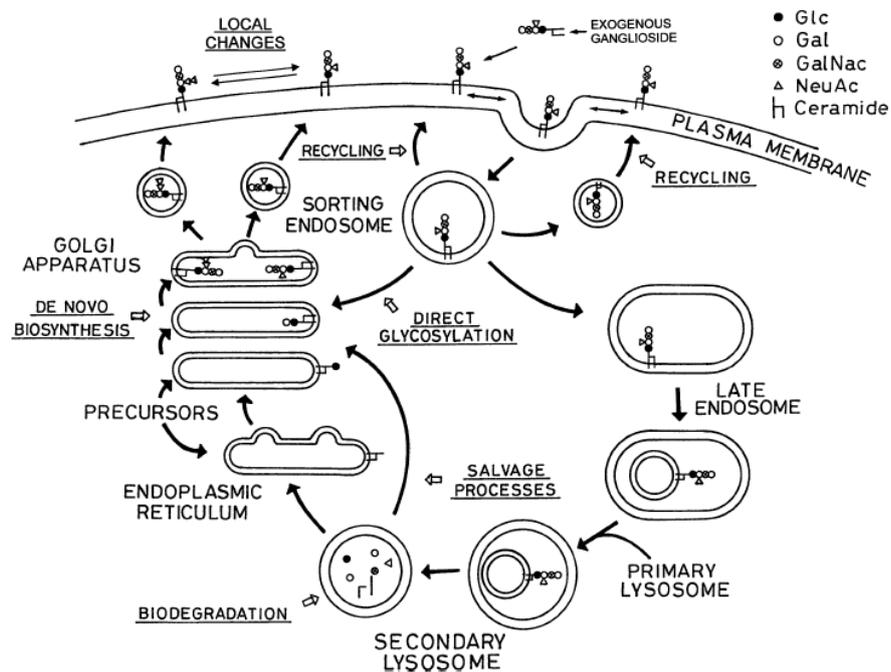


Figura 3 – Esquema ilustrativo das vias de síntese, degradação e turnover de gangliosídeos. Síntese *de novo* no retículo endoplasmático e complexo de Golgi, reciclagem para membrana plasmática, reciclagem e glicosilação direta no Golgi, degradação nos endossomos tardios/lisossomos, rotas de salvatagem no retículo endoplasmático e Golgi e alterações locais (glicosilações e deglicosilações) na membrana plasmática (Tettamanti, 2004).

O fluxo metabólico de gangliosídeos é então um processo dependente da combinação das enzimas de síntese/degradação e modulação de suas atividades, do fluxo nas rotas exo e endocítico associados ao metabolismo celular e da taxa de *turnover* de membrana, associada ao *status* de proliferação celular (Tettamanti, 2004).

1.2 Gangliosídeos e microdomínios de membrana

Gangliosídeos localizam-se principalmente na camada externa da membrana plasmática. Diversos estudos sugerem que sua distribuição na membrana não seja uniforme, encontrando-se segregados em microdomínios de membrana enriquecidos em

glicosfingolípídios (conhecidos como GEMs ou *rafts*) compostos de colesterol, fosfolípídios saturados e esfingolípídios (Figura 4) (Simons & Ikonen, 1997; Pike, 2006). Esfingolípídios e colesterol podem organizar-se de forma transiente em fases líquidas ordenadas. Estudos com modelos artificiais de membranas demonstram claramente que isso ocorre pela associação preferencial das caudas longas e saturadas dos ácidos graxos dos esfingolípídios com colesterol, ao contrário de outros lípidios de membrana, como glicerofosfolípídios com ácidos graxos insaturados.

Entretanto, a composição lipídica de membranas celulares é altamente heterogênea e, associado às inúmeras proteínas nela presentes, torna-se difícil extrapolar os conceitos de segregação lateral baseados em interações moleculares de membranas artificiais (Mukherjee & Maxfield, 2004; Simons & Vaz, 2004; Silvius, 2006; Eididin, 2003).

Embora a existência desses domínios em membranas biológicas seja aceita por inúmeros autores, a identificação e caracterização têm sido comumente feitas por metodologia indireta e controversa, baseada principalmente no isolamento físico por resistência a diferentes detergentes em baixas temperaturas. O uso de protocolos não-padronizados leva à multiplicidade de caracterizações de *rafts*, bem como de terminologias que freqüentemente se sobrepõem na literatura como *rafts* lipídicos, microdomínios resistentes a detergentes (DRM) e microdomínios enriquecidos em glicosfingolípídios (GEM) (Munro, 2003; Babyschuk & Drager, 2006).

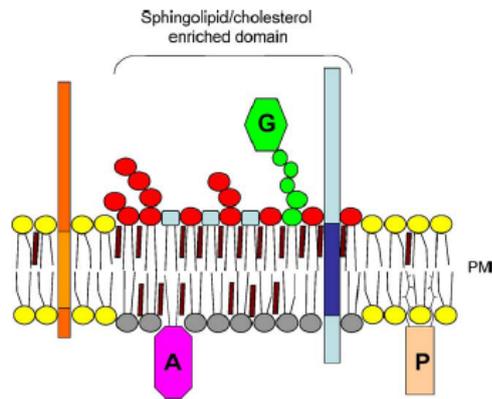


Figura 4 – Modelo esquemático de um raft lipídico composto de esfingolípídios, colesterol e proteínas. (A) representa uma proteína ancorada à membrana interna, (P) representa uma proteína intracelular associada à membrana e (G) representa uma glicoproteína ancorada à membrana externa. Esferas escuras correspondem a resíduos glicídicos de esfingolípídios, barras escuras representam colesterol. (Adaptado de Degroote *et al*, 2004).

Mais ainda, *rafts* são definidos como estruturas transientes altamente dinâmicas e possuem tamanho inferior à resolução óptica atualmente disponível, tornando a existência dessas estruturas *in vivo* um assunto de grande debate na comunidade científica (Shaw, 2006). Avanços vêm sendo feitos nas técnicas de análise, associando fluorescência à microscopia de alta resolução, tornando possível a análise de difusão de moléculas supostamente residentes em *rafts* na membrana (Hess *et al*, 2007; Lommerse *et al*, 2004; Marguet *et al* 2006). Recentemente, Lingwood e colaboradores (2008) demonstraram pela primeira vez que membranas biológicas *in vivo* possuem microdomínios metaestáveis enriquecidos em esfingolípídios, colesterol e proteínas específicas a 37°C, que podem coalescer em uma organização supramolecular semelhante a um *raft* na membrana plasmática.

Uma das principais características atribuídas a *rafts* é a capacidade de incluir ou excluir determinadas proteínas. Proteínas com afinidade por *rafts* lipídicos incluem, por exemplo, as proteínas ancoradas a glicosilfosfatidilinositol (GPI), quinases da família Src,

subunidades alfa de proteínas G heterotriméricas e proteínas transmembrana. *Rafts* lipídicos são considerados então plataformas de compartimentalização de lipídios e proteínas, formando uma rede de interações que modulam transdução de sinal, tráfego de membranas, organização de citoesqueleto, polarização e entrada de patógenos (Brown & London, 1998; Simons & Toomre, 2000).

Devido a sua localização preferencial em microdomínios na membrana plasmática, gangliosídeos foram relacionados ao contexto social da célula, onde as interações entre ligantes e células desencadeiam eventos moleculares de controle da função celular, como proliferação, diferenciação e resposta imune através de receptores. Desde o primeiro trabalho relacionando gangliosídeos à redução da proliferação e migração de uma linhagem celular carcinogênica – através da modulação da atividade do receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) (Bremer & Hakomori, 1982; Bemer *et al*, 1986) – quase todos os receptores de fatores de crescimento até hoje estudados apresentam algum tipo de modulação por gangliosídeos, que varia conforme o tipo celular (Simons & Toomre, 2000; Miljan & Bremer, 2002).

Baseados nos dados de estudos com receptores de fatores de crescimento, três modelos não-excludentes foram propostos para a ação dos gangliosídeos sobre os receptores: (i) interação gangliosídeo-ligante, (ii) regulação da dimerização do receptor, e (iii) modulação da localização sub-celular (recrutamento para microdomínios de membrana) e atividade do receptor (Figura 5) (Mijan & Bremer, 2002).

Exemplificando, a atividade tirosina quinase do EGFR é modulada negativamente pelo gangliosídeo GM3 através da interação do mesmo com resíduos N-glicosilados do receptor (Yoon *et al*, 2006). O gangliosídeo GD1a aumenta tanto a ligação de EGF ao receptor quanto a dimerização do receptor (Liu *et al*, 2004), modulando positivamente a

proliferação e migração de células endoteliais (Lang *et al*, 2001) por aumentar a sensibilidade do receptor aos níveis do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (Liu *et al*, 2006).

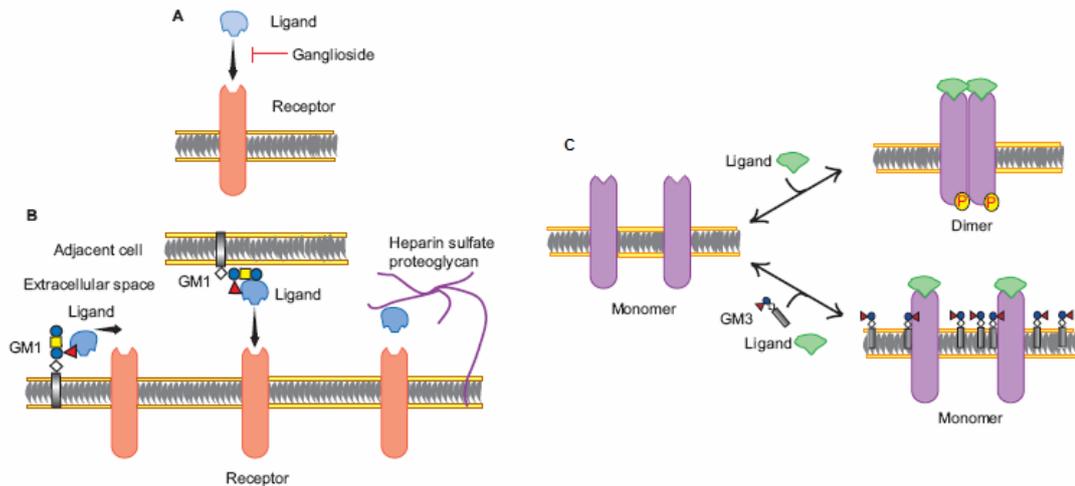


Figura 5 – Esquema ilustrativo dos modelos propostos para modulação de gangliosídeos na sinalização de fatores de crescimento. (A) Interação de gangliosídeos com o ligante impedindo (A) ou favorecendo (B) a associação ao receptor; (C) modulação de gangliosídeos na dimerização e ativação do receptor (adaptado de Miljan & Bremer, 2002).

O gangliosídeo GM3 também atua como repressor da sinalização de insulina por deslocar o receptor (IR) de caveolas na membrana (Kabayama *et al*, 2007). Já o gangliosídeo GM1 atua como co-receptor do receptor de fator de crescimento de fibroblastos (FGFR) favorecendo a ligação da citocina (Rusnati *et al*, 2002).

Diversas metodologias foram empregadas para demonstrar o efeito dos gangliosídeos na atividade de diferentes tipos de receptores. Os métodos experimentais envolvem saturação do sistema celular com gangliosídeos através da adição exógena, depleção por inibição de enzimas da biossíntese de gangliosídeos ou pela alteração da expressão gênica de

enzimas metabólicas de gangliosídeos (Lang *et al*, 2002, Liu *et al*, 2006, Haga *et al*, 2008; Zurita *et al*, 2004; Liu *et al*, 2008).

2 HEMATOPOIESE

2.1. Conceito e características

A hematopoiese é o processo de formação, desenvolvimento e maturação das células sanguíneas. É o sistema que mantém a renovação contínua das células e que, sob condições de estresse hematopoiético como infecções e/ou sangramentos, pode responder à demanda específica modificando a taxa e o padrão de produção de determinado tipo celular para defesa e manutenção da homeostase sanguínea.

Durante a embriogênese de mamíferos, as células sanguíneas originam-se em pelo menos dois eventos distintos: no saco vitelínico (hematopoiese primitiva) e dentro do embrião propriamente dito (hematopoiese definitiva) (Orkin, 2000). O fígado fetal, o baço e a medula óssea são sítios hematopoiéticos seqüenciais durante o desenvolvimento do organismo (Cumano & Godin, 2007). Sob situações de estresse medular, como leucemias, mielofibroses e infecções, a hematopoiese pode ser deslocada para órgãos periféricos, como fígado e baço, caracterizando a hematopoiese extramedular (Borojevic *et al*, 1993).

Através de uma cascata de proliferação e diferenciação de células precursoras, chamadas de células-tronco hematopoiéticas (HSC), são formadas as linhagens mielóide e linfóide (Figura 6). Em indivíduos saudáveis, as HSC encontram-se em estado quiescente com constante proliferação assimétrica. Cada HSC dá origem a duas células filhas não idênticas, sendo que uma mantém a identidade de célula-tronco e a outra entra em diferenciação, em um processo denominado hematopoiese constitutiva. (Huang & Spangrude, 2007; Barreda *et*

al, 2004). Os eventos de proliferação das HSC ocorrem em nichos na medula óssea responsáveis pela manutenção e regulação funcional das mesmas (Figura 7). Em mamíferos adultos, todas as células sanguíneas são geradas na medula óssea, com exceção de linfócitos T (cuja maturação ocorre no timo) e macrófagos (que se originam a partir de monócitos circulantes).

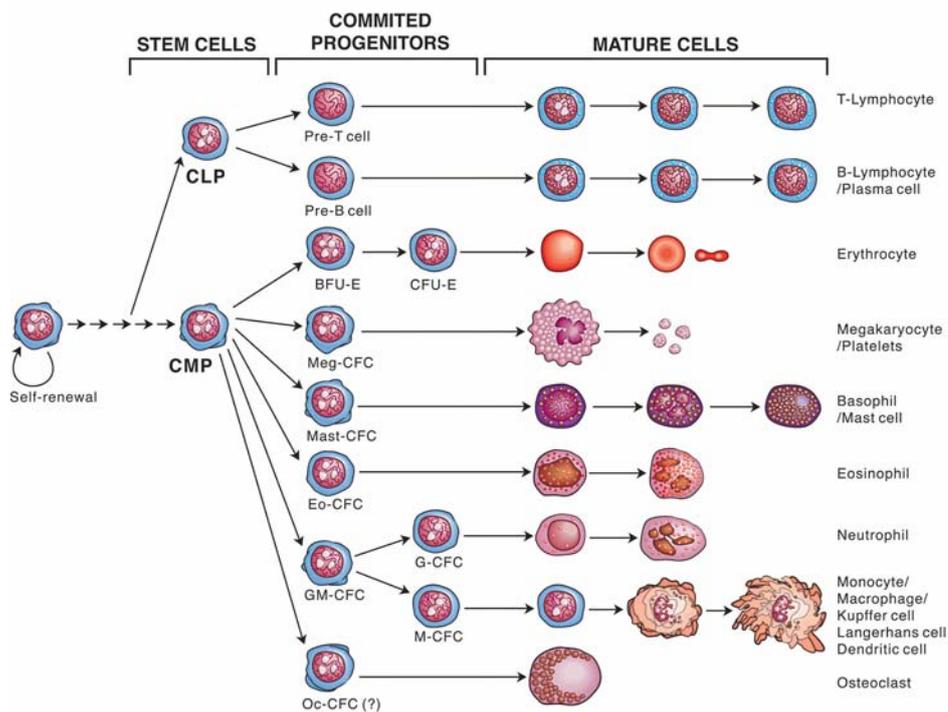


Figura 6 – Esquema ilustrativo da diferenciação hematopoiética. Uma célula-tronco multipotente divide-se assimetricamente em uma célula-tronco (auto-renovação) e uma célula progenitora comprometida com a linhagem mielóide (CMP) ou linfóide (CLP). As células progenitoras entram em ciclos de proliferação e diferenciação, tornando-se cada vez mais especializadas e gerando todas as células sanguíneas maduras. BFU-E CFU-E: unidades formadoras de colônias de eritrócitos; Meg-CFC: células formadoras de colônias de megacariócitos; Mast-CFC: células formadoras de colônias de mastócitos; Eo-CFC: células formadoras de colônias de eosinófilos; GM-CFC: células formadoras de colônias de macrófagos e granulócitos; G-CFC: células formadoras de colônias de granulócitos; M-CFC: células formadoras de colônias de macrófagos; Oc-CFC: células formadoras de colônias de osteoclastos. (disponível em <www.bloodlines.stemcells.com/chapters.html>).

A diferenciação hematopoiética ocorre a partir do comprometimento das HSC em células progenitoras linfóides ou mielóides que, por sua vez, passam por inúmeros ciclos de divisão celular para amplificar o número de células terminais diferenciadas.

O conceito de nicho hematopoiético foi proposto por Shofield (1983) descrevendo a relação de dependência de células-tronco hematopoiéticas com o microambiente medular. A composição desse microambiente é de difícil definição em função das limitações técnicas de caracterização dos tipos celulares e seus papéis específicos na manutenção das HSC (Dorshkind *et al*, 1990; Wilson & Trumpp, 2006).

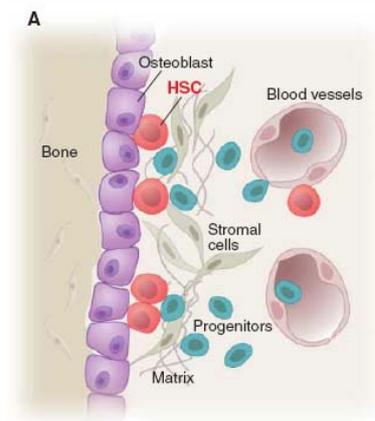


Figura 7 – Esquema ilustrativo do nicho hematopoiético na medula óssea. (Moore & Lemischka, 2006).

Sabe-se que diferentes células mesenquimais (endoteliais, adipócitos, células de músculo liso, células reticulares, osteoblastos e fibroblastos) estão presentes produzindo citocinas e componentes de matriz extracelular (colágeno tipo I e III, elastina, fibronectina, laminina, proteoglicanos e glicosaminoglicanos) importantes para o suporte funcional e estrutural da hematopoiese, compondo o estroma mielossuportivo (Gupta *et al*, 1998; Cumano & Godin, 2007).

2.2. Citocinas hematopoiéticas

Tanto a homeostase hematopoiética quanto a modulação funcional das células diferenciadas (em eventos de resposta imune e inflamação) exigem um controle bastante complexo. A caracterização da diversidade de fatores de crescimento, interferons e interleucinas, que, em conjunto, são chamadas de citocinas, revela uma rede intrincada de sinais freqüentemente redundantes, necessários na modulação de múltiplos eventos de proliferação e diferenciação hematopoiética conforme a demanda específica (Metcalf, 1993).

As citocinas hematopoiéticas são proteínas que podem ser produzidas localmente ou trazidas pela circulação ao ambiente hematopoiético, atuando de maneira autócrina, parácrina e/ou justácrina, através de receptores específicos expressos nas membranas de células-alvo (Barreda *et al*, 2004). A família de receptores de citocinas hematopoiéticas (ou receptores de citocina tipo I) é composta pelos receptores de interleucina 2 (IL-2), interleucina 3 (IL-3), interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6), interleucina 7 (IL-7), fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), eritropoietina (Epo) e fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF). Os membros dessa família são proteínas do tipo transmembrana caracterizadas por resíduos conservados de cisteína na porção N-terminal extracelular e um motivo composto de resíduos de triptofano (W) e serina (S): “WSXWS” na sua porção intracelular (Myajima *et al*, 1992).

Os receptores de GM-CSF (GMR), IL-3 (IL-3R) e IL-5 (IL-5R) pertencem a uma sub-família específica (gp140) e diferenciam-se por serem heterodímeros compostos de uma cadeia alfa específica para o ligante (GMR α , IL-3R α e IL-5R α respectivamente) e uma cadeia beta (β c) comum aos três receptores e responsável pela transdução do sinal (Guthridge *et al*, 1998, Degroot *et al*, 1998).

A ativação dos receptores de citocina tipo I segue o modelo de dimerização de receptor seguido de fosforilação intracelular de resíduos de tirosina. Entretanto, os receptores desta família não possuem atividade quinásica intrínseca, sendo necessária associação com uma ou mais proteínas tirosina quinase intracelulares. As principais vias descritas de fosforilação e transdução de sinal de receptores de citocinas tipo I são as rotas envolvendo JAK/STAT (Janus quinase/ proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição), MAPK (quinase ativada por mitógeno) e PI3K (fosfatidilinositol-3-quinase) (Figura 8) (Rane & Reddy, 2002).

2.3 Sinalização via GM-CSF

A ligação do GMCSF à cadeia alfa de seu receptor ($GMR\alpha$) dá-se inicialmente com baixa afinidade e alta constante de dissociação (K_d 1 - 10nM). O complexo GMCSF: $GMR\alpha$ associa-se então à cadeia β formando um receptor heterodimérico ativado de alta afinidade (K_d 30 -100pM) capaz de desencadear a sinalização intracelular (Park *et al*, 1992).

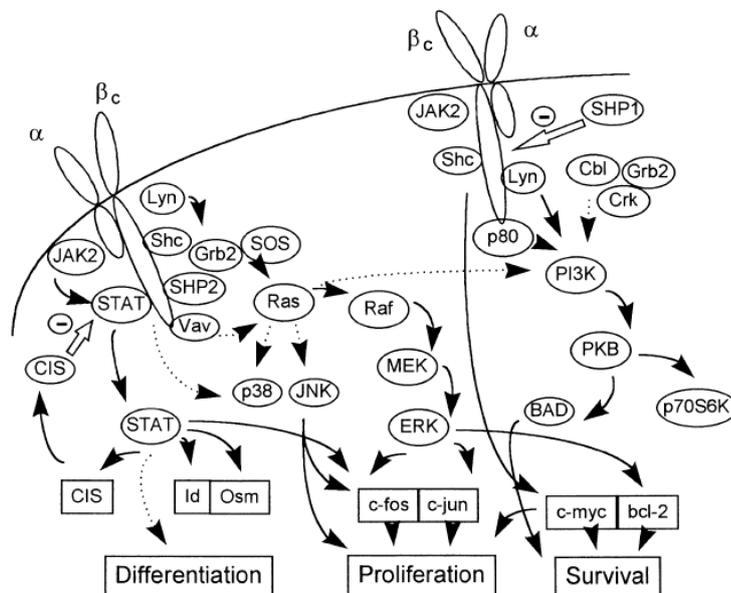


Figura 8 – Representação esquemática das vias de sinalização ativadas pelos receptores de IL-3, IL-5 e GM-CSF de diferentes tipos celulares. A ativação do receptor desencadeia o recrutamento de diversas moléculas de sinalização intracelular, levando a alterações transcricionais de genes envolvidos em processos de diferenciação, proliferação e sobrevivência. Linhas cheias: modulação positiva; linhas tracejadas: modulação não totalmente descrita (adaptado de Degroot *et al*, 1998).

A cadeia β do receptor e proteínas JAK encontram-se em estado latente inativo. Após a ativação do receptor, ocorre a transfosforilação de proteínas JAK associadas e fosforilação de múltiplos resíduos de tirosina do receptor que, por sua vez, tornam-se sítios de ligação para uma variedade de proteínas contendo o domínio SH2, principalmente as STAT. Uma vez fosforiladas, as STAT dimerizam-se e são translocadas para o núcleo onde atuam como reguladoras da transcrição gênica. Existem pelo menos quatro isoformas diferentes de JAK e oito de STAT permitindo uma alta especificidade na sinalização (Degroot *et al*, 1998). Recentemente, Hansen e colaboradores (2008) elucidaram a estrutura do receptor funcional de GM-CSF demonstrando a formação de um complexo dodecamérico – composto de dois hexâmeros com estequiometria 2:2:2 (GM-CSF:GMR α :GMR β) – necessário para a dimerização funcional, transfosforilação via JAK2 e transdução do sinal.

Além desta via, rotas de sinalização envolvendo ativação de diferentes MAPK (proteínas quinase ativadas por mitógeno) como ERK1/2, quinase p38 e JNK/SAPK também são ativadas por GM-CSF, e requerem a presença de proteínas adaptadoras Shc. A via de sinalização mediada por PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase) também é rapidamente ativada após a ativação do GMR (Degroot *et al*, 1998). Mutações em diferentes resíduos de tirosina da cadeia β do receptor revelam um papel distinto para cada na ativação das diferentes rotas de sinalização (Itoh *et al*, 1998).

Processos pleiotrópicos de proliferação, sobrevivência e diferenciação celular são desencadeados através do receptor de GMCSF. A especificidade da resposta a uma mesma

citocina pode advir da expressão diferencial do receptor nos estágios de maturação celular, de diferentes concentrações da citocina bem como do tempo e intensidade do sinal (Geijsen *et al*, 2001). Recentemente, Guthridge e colaboradores (2006) demonstraram que a especificidade do sinal mediado por GM-CSF é controlada pela fosforilação alternada de resíduos citoplasmáticos específicos de serina e tirosina de GMR (β c). Esses sítios são fosforilados de forma mutuamente excludente conforme a concentração de GM-CSF, gerando uma alternância binária de respostas de sobrevivência e proliferação, permitindo a regulação das respostas biológicas.

A expressão de GMR humano é regulada ao longo da diferenciação hematopoiética. Células precursoras apresentam, inicialmente, baixos níveis de GMR (β c) que vão aumentando conforme o comprometimento com as linhagens megacariocítica, eritrocítica, granulocítica e monocítica, e permanece aumentado nos estágios finais de diferenciação das duas últimas (Militi *et al*, 2000). Com relação à cadeia alfa humana, são descritas isoformas solúveis, provenientes da ação de metaloproteínases ou *splicing* alternativo, que mantêm a propriedade de ligação ao GM-CSF, mas não são capazes de associar à cadeia β e desencadear o sinal, atuando como antagonistas funcionais do GMCSF (Prevost *et al*, 2007). Rosas e colaboradores (2007) identificaram que, em camundongos, GMR α é também polimórfica; seu gene sofre *splicing* alternativo, gerando três transcritos: (i) *full-length* (proteína transmembrana normal, tmGMR α), (ii) truncado (proteína solúvel por perda do domínio transmembrana, solGMR α) e (iii) deletado (proteína com resíduos deletados, delGMR α), indicando que a regulação de sua função biológica pode ser tão complexa quanto em humanos.

3 GANGLIOSÍDIOS E HEMATOPOIESE

O papel dos gangliosídeos na regulação da hematopoiese vem sendo estudado por diversos grupos e com diferentes abordagens. Em estudos sobre o envolvimento de células tumorais na inibição da hematopoiese, Kaucic e colaboradores (1994) demonstraram que tumores localizados na medula são capazes de modular a hematopoiese através da liberação de gangliosídeos biologicamente ativos de sua membrana que atuam nos progenitores hematopoiéticos alterando seus mecanismos de diferenciação e proliferação.

Um estudo com células leucêmicas demonstrou que cada estágio da maturação e desenvolvimento de neutrófilos é marcado por um perfil de glicosfingolipídios específico e que a maturação é acompanhada por uma perda do gangliosídeo GM3 (Smolenska-Sym *et al.*, 2004). Sabe-se que o GM3 induz à diferenciação monocítica das linhagens leucêmicas HL-60 e a partir disso o grupo de Hee-Jung Choi (2003) analisou a regulação transcricional da GM3 sintase humana durante a diferenciação induzida por ésteres de forbol e demonstraram um aumento da expressão do gene da enzima através da regulação via PKC e CREB. Estudos realizados com células da linhagem leucêmica multipotente K562 mostraram que o gangliosídeo GM3 estimula a diferenciação para megacariócitos induzida por forbol-éster e inibe a diferenciação eritróide induzida por hemina (Nakamura *et al.*, 1991). Recentemente, descreveu-se o papel da sialidase de membrana NEU3 na modulação do conteúdo de gangliosídeos e na diferenciação dessa mesma linhagem celular (Jin *et al.*, 2008). Já em células da linhagem HL-60, o GM3 está aumentado durante a diferenciação monocítica, mas não durante a diferenciação granulocítica (Nakamura *et al.*, 1992).

Sabe-se que o GM-CSF é uma citocina que se associa a componentes de matriz extracelular como proteoglicanos contendo heparan-sulfato através da ligação em resíduos

específicos de histidina da citocina, tendo sua atividade mitogênica e sinalização moduladas (Sebollela *et al*, 2005). Essa associação física somente ocorre em pH ácido, onde mudanças conformacionais na molécula de GM-CSF o tornam capaz de interagir com os glicosaminoglicanos (Alvarez-Silva *et al*, 1996). Estudos com modelos de células estromais demonstraram que a capacidade de suporte da proliferação de células mielóides está relacionada aos tipos de proteoglicanos por eles sintetizados. (Alvarez Silva *et al*, 1996; Carvalho *et al*, 2000). Além disso, a caracterização da organização espacial entre células estromais e células precursoras mielóides, realizada por microscopia eletrônica (Borojevic *et al*, 2003), evidenciou um extensivo deslocamento (*capping*) de moléculas carregadas negativamente para a região de contato e interface entre os dois tipos celulares, provavelmente associado à diminuição do pH local. Essas moléculas carregadas negativamente demonstraram suscetibilidade à ação de sialidase, sugerindo a participação de glicoproteínas sialiladas e/ ou gangliosídios na formação de complexos macromoleculares que determinam as características físicas e químicas necessárias para a diminuição local de pH (Wettreich *et al*, 1999).

A liberação e incorporação de gangliosídios por diferentes tipos celulares foram revisadas por Lauc & Lauc (2006) e reforçam estudos de nosso grupo que demonstraram que gangliosídios são liberados por células estromais e incorporados por células precursoras mielopoéticas. Interessantemente, demonstramos que os perfis de expressão e liberação de gangliosídios correlacionam-se com as diferentes capacidades de suporte da proliferação de células mielóides apresentadas pelos diferentes estromas (Ziulkoski *et al*, 2006; Andrade *et al*, 2006). Além disso, constatamos também que o gangliosídio GM3 foi seletivamente incorporado na membrana das células mielóides colocalizando com a cadeia alfa do receptor de GM-CSF das células FDC-P1 (Ziulkoski *et al*, 2006), sugerindo que, assim como outros

receptores de fatores de crescimento, o GMR e sua sinalização possam estar sob modulação de gangliosídios.

OBJETIVOS

Baseado nos estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa e com o objetivo de entender o papel dos gangliosídeos na sinalização via GM-CSF, este trabalho se propôs a avaliar a modulação da atividade mitogênica desta citocina bem como possíveis interações entre gangliosídeos e GMR α e β c. Como modelo experimental, utilizamos a linhagem precursora mielóide murina FDC-P1, a qual é dependente de GM-CSF e/ou IL-3 para sobrevivência e proliferação.

Objetivos específicos:

1. Avaliar o papel de gangliosídeos exógenos na modulação da atividade mitogênica de GM-CSF através da adição de gangliosídeos GM3, GD1a e GM1 purificados ao sistema de cultivo;
2. Avaliar o papel dos gangliosídeos expressados através da redução do conteúdo sintetizado pelo uso de inibidor específico da enzima glicosilceramida sintase, D-PDMP;
3. Isolar as frações de membrana resistentes a detergente (GEMs ou *rafts*) de células FDC-P1 e analisar a composição em gangliosídeos e a presença do GMR α e β c nesses microdomínios;
4. Imunoprecipitar GMR α e β c e verificar a possível co-imunoprecipitação de gangliosídeos;
5. Avaliar a distribuição dos gangliosídeos GM3 e GD1a na membrana e sua possível co-localização com GMR α e β c;
6. Caracterizar as células FDC-P1 quanto à expressão de das isoformas tmGMR α e solGMR α ;
7. Avaliar a possível modulação dos gangliosídeos na expressão gênica diferencial das isoformas tmGMR α e solGMR α , bem como do fator de transcrição C/EBP α ;
8. Avaliar a ativação de GMR pela fosforilação de β c e a possível modulação por gangliosídeos,
9. Avaliar a possível modulação de gangliosídeos na cascata de sinalização via ERK1/2.

PARTE II

CAPÍTULO 1

MANUSCRITO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO *CELL PROLIFERATION*

GANGLIOSIDES REGULATE GM-CSF-INDUCED CELL PROLIFERATION OF A MURINE MYELOID CELL LINE.

^{1,4}Silveira-Santos, AX; ¹Maia, J.E; ²Crespo, P; ²Daniotti, J.L; ^{1,4}Trindade, V.M.T; ³Borojevic, R; ^{1,4}Guma, F.C.R.

¹Laboratório de Bioquímica e Biologia Celular de Lipídios, Depto Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil; ²Depto Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina; ³Instituto de Ciências Biomédicas, Hospital Clementina Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil; ⁴Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ABSTRACT

Objectives: Gangliosides have been extensively reported to be involved in the processes of proliferation in various cell types by modulating growth factor receptor and signaling pathways. However, the specific modulation of gangliosides in GM-CSF-induced proliferation has not been described so far. In this work we attempt to study the modulation of gangliosides on GM-CSF-induced proliferation in a murine myeloid precursor cell lineage, FDC-P1, which is dependent of GM-CSF (or IL-3) for survival and proliferation.

Methods: For that, we cultured cells with GM-CSF (0-10ng/ml) and used the exogenous addition of gangliosides GM3, GD1a and GM1 (20uM each) to the culture medium, as well as endogenous ganglioside synthesis inhibition by the use of a glucosylceramide synthase inhibitor *D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol*, D-PDMP (10uM). In order to see if there was an association of gangliosides and GMR, we performed co-immunoprecipitation assay (co-IP), isolation of detergent resistant microdomains (DRM) and immunocytochemistry.

Results: Exogenous additon of GM3 and GD1a, but not GM1, enhanced the proliferation of FDC-P1 cells induced by GM-CSF. GM3 and GD1a also enhanced activation of MAPK (ERK1/2). The reduced ganglioside synthesis by the use of D-PDMP was accompanied by a decrease in cell proliferation, compared to untreated cells showing a role of endogenous gangliosides in the proper cell responsiveness to the cytokine. Addition of exogenous GD1a, but not GM3, to D-PDMP-treated cells, restored their proliferative response to GM-CSF to levels of control cells (untreated cells). We found a co-distribution of gangliosides and GMR

in membrane microdomains by sucrose density gradient, as well as colocalization of GD1a and GMR by immunocytochemistry. However, we did not find an association of gangliosides and GMR by co-IP.

Conclusion: Taken together, these results indicate that gangliosides (either those arising from extracellular media or endogenously expressed) play a role on the modulation of GM-CSF-mediated proliferative response. Gangliosides are components of membrane microdomains, called rafts, and the role of these domains on growth factor signaling has been extensively studied. It is possible that, alike other growth factor receptors, the GM-CSF signaling cascade, could be under ganglioside modulation.

INTRODUCTION

Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) is a hematopoietic and inflammatory cytokine involved in cell functions as survival, proliferation, differentiation and functional activation, being one of the major cytokines regulating blood homeostasis (Barreda *et al*, 2004). It is also therapeutically used as adjunct to mielosuppressive chemotherapy, and a potential target in leukemias (Pelley *et al*, 2007) and pulmonary alveolar proteinosis (Venkateshiah *et al*, 2004). All functional activities of GM-CSF are exerted through the binding on GM-CSF receptor (GMR) at the surface of target cells. GMR is a member of the gp140 family of type I cytokine receptor superfamily. It is a heterodimer composed of a specific ligand binding alpha chain (GMR α) and a common β chain (β c), shared with IL-3 and IL-5 receptors, responsible for the signal transduction (Miyajima *et al*, 1992). Binding of mouse GM-CSF to GMR α occurs firstly with low affinity (Kd 1-100nM) leading to the recruitment of β c, generating a high affinity GMCSF:GMR α : β c complex (Kd 30-100pM) which is able to trigger the intracellular signal (Paller *et al*, 1992). The biological function of GM-CSF on target cells is modulated by interaction with heparin-containing proteoglycans on cell surface. This interaction requires an acidic microenvironment to occur (Wettreich *et al*, 1999), and, thus, negatively charged glycolipids present on the plasma membrane of target cells were proposed to be involved in the functional role of GM-CSF (Borojevic *et al*, 2003).

Gangliosides, sialic acid-containing glycosphingolipids, are major components of the outer leaflet of mammalian plasma membranes contributing to membrane structure and organization (Sonnino *et al*, 2006). They are not homogeneously distributed on the membrane, but rather organized in microdomains enriched in sphingolipids and cholesterol,

often described as specialized signaling platforms (Simons and Ikonen, 1997). Gangliosides are largely associated to cellular processes as proliferation, differentiation, adhesion, migration, etc, through the modulation of transmembrane signaling receptors (Miljan and Bremer, 2002; Hakamori, 2008). When exogenously added, gangliosides can insert into membrane and alter biological outcome of several growth factors by modulating their receptors (Bremer *et al*, 1986; Rusnati *et al*, 1999; Mitsuda *et al*, 2002, Liu *et al*, 2004). On the other hand, studying endogenously expressed ganglioside underlines their physiological roles in growth factor signaling (Li *et al*, 2000; Zurita *et al*, 2001; Milani *et al*, 2007; Liu *et al*, 2008).

In the hematopoietic system, leukemic and normal cells are influenced by gangliosides. Hematopoiesis can be abrogated by T-cell lymphoma- or neuroblastoma-derived gangliosides (Barthi *et al*, 2001; Siestma *et al*, 1998). It has been shown that neutrophil development is accompanied by a switch in ganglioside profile, with a loss of ganglioside GM3 in maturation process (Smolenska-Sym *et al*, 2004). In HL-60 myelocytic differentiation induced by phorbol esters, GM3 content (Nakamura *et al*, 1992) and GM3 synthase activity (Momoi *et al*, 1986) are markedly increased. GM3 synthase expression is strongly associated with differentiation of monocytic (Chung *et al*, 2005) and megakaryocytic cells (Choi *et al*, 2004), leading to an increase of GM3 content, necessary for differentiation. Recently, the role of membrane sialidase NEU3 was related in the modulation of megakaryocytic K562 cells (Jin *et al*, 2008). Our previous studies on murine models of stroma-mediate myelopoiesis have shown that gangliosides are required for optimal capacity of stromal cells to support proliferation of myeloid precursor cells (Ziulkoski *et al*, 2006; Andrade *et al*, 2006). Moreover, gangliosides from stromal cells were shed to the supernatant and selectively incorporated into myeloid cell membranes, where it

colocalized with the GMR α (Ziulkoski *et al*, 2006) suggesting that, as for most other growth factor, GM-CSF signaling could also be under ganglioside modulation.

Here, we study the putative modulation of gangliosides on GM-CSF-induced proliferation in a murine myeloid precursor cell lineage, FDC-P1, which is dependent of IL-3 or GM-CSF for survival and proliferation. For that, we used the exogenous addition of gangliosides GM3, GD1a and GM1 to the culture medium, as well as endogenous ganglioside synthesis inhibition by the use of a glucosylceramide synthase inhibitor *D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol*, D-PDMP. In order to see if there was an association of gangliosides and GMR, we performed co-immunoprecipitation assay (co-IP), isolation of detergent resistant microdomains (DRM) and immunocytochemistry.

MATERIALS AND METHODS

Materials: We purchased RPMI 1640 medium and lipid standards from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA), fetal bovine serum (FBS) from Cultilab (Campinas, SP, Brazil), D-[U-14C] galactose (300 mCi/mmol) from Amersham Life Science (Buckinghamshire, UK), glucosylceramide synthase inhibitor D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol (D-PDMP) and Fluorsave® from Calbiochem (USA). Gangliosides GM3, GD1a and GM1 from Matreya (Pleasant Gap, PA, USA), recombinant murine GM-CSF from PeproTech (Rocky Hill, NJ, USA). Rabbit anti-mouse GMR α and rabbit anti-mouse β c were from Santa-Cruz Biotechnology (USA). The supernatant of DH2 hybridoma was from Glycotech (USA). Human polyclonal serum anti-GD1a from Sigma-Aldrich (USA), FITC-conjugated cholera toxin from Sigma-Aldrich (USA). Secondary HRP-anti-mouse and HRP-anti-rabbit from Amersham. Secondary fluorescent antibodies anti-mouse 488, anti-rabbit 488, anti-mouse 555 and anti-rabbit 555 were from Molecular Probes and anti-human-FITC

from Sigma Aldrich. Silicagel high performance thin layer chromatography (HPTLC) plates from Merck (Darmstadt, Germany), plastic tissue culture dishes from Nunc (Roskilde, Denmark). CellTiter Aqueous Solution was from Promega (USA). Chemiluminescence detecton kit ECL from Amersham.

Cells: Murine myeloid precurosor cell lineage, FDC-P1, was obtained from Rio de Janeiro Cell Bank (PABCAM, Federal University, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Cells were maintained in RPMI 1640 (10%FBS) supplemented with murine GM-CSF (2ng/ml), at 37°C in 5% CO₂ humidified atmosphere. To determine the optimal cytokine concentration, cells were incubated with 0.2 to 10 ng/mL of GM-CSF.

Proliferation assay and ganglioside treatment: 3×10^4 cells were seeded on 96 well plates in 100ul RPMI (10%SFB) containing or not GM-CSF (0-10ng/ml) and 20uM of gangliosides GM3, GD1a or GM1 for 24h. Proliferation was assessed by Cell Titer Aqueous Assay (MTS) as a measure of absorbance in 490nm quantified by spectrophotometry in Spectramax 190 (Molecular Devices).

Endogenous ganglioside synthesis inhibition: 5×10^5 cells were seeded on 6 well plate and cultured for 48h in 3ml RPMI (10%FBS) containing GM-CSF (2ng/ml) and the glucosylceramide synthase inhibitor, D-PDMP (10uM). Cell viability during inhibition was accessed by hemocytometer counting with Trypan Blue exclusion dye.

Metabolic labelling and lipid extraction: D-PDMP-treated and control cells were incubated with [¹⁴C]galactose (0,5uCi/ml) for the last 12h of culture. Cells were washed in

cold PBS and briefly centrifuged. Lipids were extracted from the pellet with methanol:chloroform (2:1, v/v). Gangliosides were purified by Sepak C18 (Williams & McCluer, 1980). HPTLC analysis was performed with two successive systems chloroform:methanol (4:1, v/v) and chloroform:methanol:calcium chloride 0,25% (60:36:8). Radioactive bands were visualized by autoradiography of chromatographic film, identified by co-chromatographed standards and quantified by densitometry. Standards were visualized by Resorcinol-HCl (Andrade *et al*, 2006).

Sucrose-density-gradient separation: Cells were washed with cold PBS and briefly centrifuged. Pellets were treated with lysis buffer containing 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1M Na₂CO₃, 25mM Tris/HCl, pH 7.5 (TNE buffer) and protease inhibitors cocktail, at 4°C for 1 h. Lysates were centrifuged for 16h at 150000g at 4°C on continuous sucrose gradient (5–35%) in TNE buffer without Triton X-100. Eleven fractions were collected from the bottom of the tube with a fraction collector. Proteins in each fraction were precipitated with chloroform/methanol (1:4, v/v), resuspended in Laemmli buffer and subjected to SDS/PAGE and Western blotting. In a parallel experiment, lipids were extracted from the fractions and subjected to analysis.

Electrophoresis and Western blotting: Proteins were resolved by electrophoresis through SDS/PAGE gels (10%) under reducing conditions and then electrophoretically transferred to PVDF membranes for 2h at 300 mA. For immunoblotting, nonspecific binding sites on the PVDF membrane were blocked with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline (400 mM NaCl/100 mM Tris/HCl, pH 7.5) for 1h. Rabbit anti-mouse-GMR α polyclonal antibody and rabbit anti-mouse- β c polyclonal antibody were used at a dilution of 1:500. Bands were

detected by secondary HRP-anti-rabbit IgG (1:10000) combined with chemiluminescence detection kit and images were captured in a photo imager Geliance 600.

Immunoprecipitation: For immunoprecipitation of GMR α and β c, cells were lysed for 60 min on ice with TNE buffer 1% Triton X-100. Lysates were pre-incubated with Protein A Sepharose for 2h at 4°C under stirring to avoid non specific binding. After brief centrifugation (500xg for 1min), the supernatant was incubated with primary antibodies: rabbit polyclonal anti-GMR α (1:50) or rabbit polyclonal anti- β c (1:50) for 4h at 4°C under stirring. After brief centrifugation, the pellet of immunoprecipitate was subjected to western blotting. Lipids from immunoprecipitate and total extract were analyzed as described.

Immunofluorescence microscopy: Cells were washed twice with PBS and pelleted over coverslips using a micro plate centrifuge, fixed in paraformaldehyde 4% for 30 min at 37°C, washed in PBS and incubated in 3% BSA/PBS buffer for 1 h at 37°C to block non-specific binding sites. Coverslips were then incubated overnight at room temperature with primary antibodies, washed with PBS buffer, and exposed to secondary antibodies for 1.5 h at 37°C. The primary antibodies were: polyclonal rabbit anti-mouse GMR α (1:50), polyclonal rabbit anti-mouse- β c (1:50), monoclonal mouse anti-GM3 (clone DH2) 20%, human polyclonal serum anti-GD1a, Cholera toxin β -FITC 1:20. Secondary antibodies were Alexa 488- or Alexa 555-conjugated goat anti mouse antibodies, Alexa 488- or Alexa 555-conjugated anti-rabbit antibodies (10ug/ml). After final washes with PBS, coverslips were mounted in Fluorsave®. Confocal images were obtained using a FV1000 Olympus microscope.

Statistical Analysis: Data were expressed as mean \pm standard error, $p < 0,05$ was considered significant. Statistical comparisons were performed by Student's T test and, as appropriated by ANOVA and Tukey *post hoc* test. All analyses were performed with the SPSS statistical package (SPSS Inc. Chicago, Il, USA).

RESULTS

GM-CSF stimulation of FDC-P1 proliferation. To determine the optimal conditions for GM-CSF-induced proliferation, murine myeloid cells of FDC-P1 lineage were stimulated with 0 to 10ng/ml of recombinant GM-CSF for 24h. GM-CSF stimulated FDC-P1 proliferation in a dose-dependent manner as shown in Fig.1. GM-CSF concentration of 2ng/ml was used in all subsequent experiments.

Exogenous addition of ganglioside GM3 or GD1a, but not GM1, increases GM-CSF-induced cell proliferation. To determine whether exogenous gangliosides can modulate the mitogenic activity of GM-CSF on FDC-P1 cells, we incubated cells with 2ng/ml of GM-CSF and 20uM of each ganglioside for 24h. GM3 or GD1a, but not GM1, significantly enhanced the GM-CSF-induced proliferation ($p < 0,05$) (Fig.2). As expected, there was no independent effect of gangliosides.

Inhibition of ganglioside synthesis by D-PDMP. To study the role of cellular gangliosides in GM-CSF-induced cell proliferation, we modulated ganglioside metabolism by the use of a glucosylceramide synthase inhibitor, D-PDMP (REF). FDC-P1 cells normally synthesize gangliosides GD1a, GM1 as major glycolipids, and to a lesser extent, GM3, GM2, GD3, GD1b and GT1b (Ziulkoski et al, 2006). We cultured cells in medium containing 10uM D-PDMP for 48h. During the final 12h, [14C]-galactose (0,5uCi/ml) was added to the culture

medium. Densitometric analysis of HPTLC autoradiogram demonstrated that the exposure of FDC-P1 cells to D-PDMP (10uM) markedly reduced ganglioside synthesis, the total ganglioside synthesis in about 40%. Interestingly, in a differential form, the GD1a synthesis was reduced only 25% (Table 1).

Down-regulation of GM-CSF-induced proliferation by reduced ganglioside synthesis. The effect of inhibition of ganglioside synthesis on proliferation and viability was assessed by cell counting in hemocytometer with Trypan Blue exclusion dye. There was a significant decrease in cell proliferation after the 48h of ganglioside synthesis inhibition, compared to control group (Fig.3a). To assess the possibility that such reduction was due to a toxic effect of the inhibitor, cells were pretreated for 48h with 10uM D-PDMP, washed, fresh medium was replaced for more 24h. Proliferation level was restored to control levels (Fig.3b) suggesting that D-PDMP treatment is not toxic to the cells. We confirmed these findings using an analogue of the inhibitor, PPPP, which gave similar results. Ethanol 0,1% as vehicle had no toxic effect as well (data not shown).

Exogenous GD1a addition restored proliferative response of D-PDMP treated cells. To assess the contribution of individual gangliosides on the proliferative response to GM-CSF, we performed an assay in which cells were pretreated with D-PDMP for 48h to reduce endogenous ganglioside content and then maintained for additional 24h in (i) continued inhibition medium (ii) fresh medium after wash (iii) GD1a, (iv) GM3 or (v) both (Fig.4). Interestingly, exogenous addition of GD1a, but not GM3, was sufficient to overcome the inhibitory effect of D-PDMP, suggesting that an adequate proliferative response to the GM-CSF may be dependent of specific cellular ganglioside content.

Ganglioside GD1a co-localizes with GMR α and β c in FDC-P1 cells. Since the response of GM-CSF requires its association with GMR, we investigated the distribution of GD1a and

GM3 with GMR α and β c (Figure 6). In accordance with TLC analysis, FDC-P1 showed a strong labeling with anti-GD1a, mostly present in plasma membrane. Conversely, barely detectable labeling with DH2 (anti-GM3) was found (not shown). GMR α and β c had a similar distribution, slightly concentrated at the plasma membrane. In merged images, there were areas of colocalization for both receptor subunits with GD1a.

Cellular Gangliosides do not co-immunoprecipitate with GMR. To determine the ability of gangliosides to complex with GMR, the recovery of radiolabeled gangliosides after immunoprecipitation of GMR α or β c was assessed. Cells were incubated with GM-CSF for 24h, in which the final 12h was with addition of [14C]-galactose. The autoradiography of HPTLC plate showed no co-immunoprecipitation of gangliosides with either GMR α or β c (data not shown). However, we cannot rule out the possibility that weak interactions could occur at membrane level, as suggested by co-distribution of gangliosides and GMR in sucrose gradient and immunocytochemistry assays.

Distribution of cellular gangliosides and GMR α and β c in sucrose gradient. In order to determine whether gangliosides and GMR could be present in *rafts* we performed Triton X-100 extraction followed by sucrose gradient centrifugation and analyzed the obtained fractions. We observed that most ganglioside distribution was uneven in the eleven fractions, being concentrated at higher fractions. GMR α distributed equally along the gradient, with a slight increase in these higher fractions, where β c was also concentrated. The higher fractions correspond to the less dense membrane fractions, which retain membrane structures as *rafts*. These results suggest that GMR and gangliosides could be constituents of rafts in FDC-P1 cells (Figure 5).

DISCUSSION

The present study specifically addressed the influence of ganglioside content on the GM-CSF-induced myeloid proliferation. Based on our previous observations regarding the role of gangliosides in the mielossuportive capacity of stromal cells, we compared the GM-CSF-induced proliferation with complementary approaches of adding exogenous gangliosides to the GM-CSF-containing culture media as well as inhibiting endogenous synthesis by the use of a specific glycosylceramide synthase inhibitor, D-PDMP. We found that ganglioside enrichment with GM3 and GD1a, but not GM1, synergistically stimulated the GM-CSF-induced proliferation. Ganglioside addition is largely used to study the effects of exogenous gangliosides on cell biology. It is a helpful approach to understand the nature of ganglioside modulation on growth factor receptor, regarding direct association, receptor activation, dimerization and distribution in membrane microdomains (Liu *et al*, 2006; Liu *et al*, 2004; Kabayama *et al*, 2007).

In this study, specific inhibition of glucosylceramide synthase by D-PDMP treatment caused reduction in ganglioside synthesis and retarded cell proliferation. Interestingly, the reduction in ganglioside synthesis was not indiscriminate. Among the cellular synthesized gangliosides, GD1a was almost unaffected by D-PDMP, suggesting an important role for this ganglioside in FDC-P1 cell survival and proliferation. This is in accordance with the strong restoring effect of proliferation when exogenous GD1a was added back in D-PDMP-treated cells. While we cannot explain why GM3 addition did not reverse the low proliferation in these cells (compared to the synergic effect observed in control cells), it is plausible to think that exogenous addition of a ganglioside may have different effects in “normal” cells compared to ganglioside-depleted cells, regarding membrane insertion, internalization, microdomain organization and etc. The extent of added ganglioside insertion into membrane and where they exerts the observed effects remain unclear and we must

consider that ganglioside depletion may also have effects on impairment of intracellular trafficking of several cell constituents (Nakamura *et al*, 2001). GM3 and GD1a, when in solution may form micelles (Sonnino *et al*, 2006), and therefore, the blockage of GM3 on the restoring effect of GD1a could be due to less GD1a molecules available to interact with the cells.

D-PDMP is a widely used ganglioside synthesis inhibitor (Abe *et al*, 1995; Liour *et al*, 2002). It is known to cause accumulation of ceramide and derived metabolites, which may act as second messengers affecting cell proliferation (Bleicher, 2002; Blitterswijk *et al*, 2003). In the beginning of this work, we tested D-PDMP and the analogue PPPP (which causes no ceramide accumulation), and both had similar effects on viability and proliferation (data not shown). Even though, we cannot completely eliminate the possibility that the observed down-regulatory effects can be attributed to side effects of D-PDMP.

Gangliosides, as components of membrane microdomains, have been extensively associated to growth factor signaling. Depletion of cellular gangliosides plausibly interferes in the clustering of glycosphingolipid enriched domains in plasma membrane and, on the contrary, ganglioside enrichment by exogenous addition could enhance the formation of such signaling domains.

Our results showed that membrane ganglioside distribution was concentrated at the higher fractions of the sucrose gradient, as well as β c and GMR α , suggesting that GMR and gangliosides could be constituents of rafts in FDC-P1 cells and, therefore, modulated by ganglioside content. Moreover, gangliosides have been reported to be physically associated to growth factor receptors (Hanai, 1988; Milani, 2007). Even though we did not find a direct association of endogenous gangliosides with GMR by co-immunoprecipitation assay, we cannot rule out the possibility that interactions could occur at membrane level, as suggested

by co-distribution of gangliosides and GMR in sucrose gradient and shown by immunocytochemistry assays.

In the last years, diverse studies considering the modulation of growth factor receptor signaling by gangliosides have been done in a number of different cell types, with distinct ganglioside species and experimental conditions. There is an emergent idea that gangliosides could enhance cell sensitivity to growth factors, in that, membrane ganglioside enrichment may facilitate cellular responses by acting as an “amplification mechanism”, especially for suboptimal growth factor concentrations (Liu, 2006). Although several studies reported association of ganglioside expression with hematopoietic processes of differentiation, no study this far had described an effect of gangliosides in GM-CSF-induced myeloid proliferation.

In the hematopoietic context, the present work is in accordance with previous studies with stromal cells, where it was shown that the biological activity of GM-CSF-producing stromas depends upon tissue cofactors, including capping of both heparan-sulfate proteoglycans (Wettreich *et al*, 1999; Borojevic *et al*, 2003) and gangliosides (Andrade *et al*, 2006, Ziulkoski *et al*, 2006) at the interface between hematopoietic and stromal cells. These aggregates possibly generate a permissive signaling microdomain, where the increased amount of sialic acid could be related to local decrease in pH necessary for the interaction of heparan-sulfate and GM-CSF (Wettreich *et al*, 1999; Sebollela *et al*, 2005). The nature of ganglioside modulation of GM-CSF-induced proliferation remains unclear and belongs to our studies in progress. It is important to note that ganglioside modulation of GM-CSF signaling may be of great interest not only in hematopoiesis, but also in immunological processes, Alzheimer disease, alveolar proteinosis and wherever GM-CSF exerts its effects.

REFERENCES

1. Barreda DR, Hanington PC, Belosevic M (2004) Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors, *Dev. Comp. Immunol.* 28, 509-54. Review.
2. Peterson GL (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem*, 83(2):346-356.
3. Venkateshiah SB, Thamssen MJ, Kavuru MS (2004) Pulmonary alveolar proteinosis. Clinical manifestations and optimal treatment strategies. *Treat Respir Med.* 3(4):217-27
4. Miyajima A, Kitamura T, Harada N, Yokota T, Arai K (1992) Cytokine receptors and signal transduction. *Annu Rev Immunol*, 10:295-331. Review. Paller, 1992
5. Wettreich A, Sebollela A, Carvalho MA, Azevedo SP, Borojevic R, Ferreira ST, Coelho-Sampaio T (1999) Acidic pH modulates the interaction between human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and glycosaminoglycans. *J Biol Chem* 274(44):31468-31475.
6. Borojevic R, Carvalho MA, Corrêa-Junior JD, Arcanjo K, Gomes L, Joazeiro PP, Balduino A, Wettreich A, Coelho-Sampaio T (2003) Stroma-mediated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) control of myelopoiesis: spatial organisation of intercellular interactions, *Cell Tissue Res.* 313, 55–62.
7. Soninno S, Mauri L, Chigorno V, Prinetti A (2006) Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology.* 17 (1) 1-13.
8. Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569-572.
9. Miljan EA, Bremer EG (2002) Regulation of growth factor receptors by gangliosides, *Sci. STKE* 160, Review.
10. Hakomori SI (2008) Structure and function of glycosphingolipids and sphingolipids: recollections and future trends. *Biochim Biophys Acta.* 1780(3):325-46 Review.
11. Bremer EG, Schlessinger J and Hakomori S (1986) Ganglioside-mediated modulation of cell growth. Specific effects of GM3 on tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 261, 2434-2440
12. Rusnati M, Tanghetti E, Urbinati C, Tulipano G, Marchesini S, Ziche M, Presta M (1999) Interaction of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) with free gangliosides: biochemical characterization and biological consequences in endothelial cell cultures. *Mol Biol Cell*, 10(2):313-327.

13. Mitsuda T, Furukawa K, Fukumoto S, Miyazaki H, Urano T (2002) Overexpression of ganglioside GM1 results in the dispersion of platelet-derived growth factor receptor from glycolipid-enriched microdomains and in the suppression of cell growth signals. *J Biol Chem*, 277(13):11239-11246
14. Liu Y, Li R, Ladisch S (2004) Exogenous gangliosides GD1a enhances epidermal growth factor receptor binding and dimerization, *J. Biol. Chem.* 279 (35) 36481–36489.
15. Li R, Manela J, Ladisch S (2000) Cellular gangliosides promote growth factor-induced proliferation of fibroblasts. *J Biol Chem* 275: 34213-34223.
16. Zurita, AR, Maccioni HJ, Daniotti, JL (2001) Modulation of epidermal growth factor receptor phosphorylation by endogenously expressed gangliosides. *Biochem. J.* 355, 465-72.
17. Milani S, Sottocornola E, Zava S, Berzelli P (2007) Ganglioside GM3 is stably associated to tyrosine-phosphorylated ErbB2/EGFR receptor complexes and EGFR monomers, but not to ERBB2. *BBA* 1771: 873-878.
18. Liu Y, Su Y, Wiznitzer M, Epifano O, Ladisch S (2008) Ganglioside depletion and EGF responses of human GM3 synthase-deficient fibroblasts. *Glycobiology*, 18(8) 593-601.
19. Bharti AC, Singh SM (2001) Gangliosides derived from a T cell lymphoma inhibit bone marrow cell proliferation and differentiation, *Int. Immunopharmacol.* 1, 155–165.
20. Sietsma H, Nijhof W, Dontje B, Vellenga E, Kamps WA, KOK JW (1998) Inhibition of hemopoiesis in vitro by neuroblastoma-derived gangliosides. *Cancer Research*, 58, 4840-4844.
21. Smolenska-Sym G, Spsychalska J, Zdebska E, Wozniak J, Traczyk Z, Pszena E, Maj S, Danikiewicz W, Bienkowski T, Koscielak J (2004) Ceramides and glycosphingolipids in maturation process: leukemic cells as an experimental model. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 33(1): 68-76.
22. Nakamura M, Tsunoda A, Sakoe K, Gu J, Nishikawa A, Taniguchi N, Saito M (1992) Total metabolic flow of glycosphingolipid biosynthesis is regulated by UDP-GlcNAc:lactosylceramide β 1 \rightarrow 3N-acetylglucosaminyltransferase and CMP-NeuAc:lactosylceramide α 2 \rightarrow 3 sialyltransferase in human hematopoietic cell line HL-60 during differentiation. *J Biol Chem*, 267(33):23507-23514.
23. Momoi T, Shinmoto M, Kasuya J, Senoo H, Suzuki Y (1986) Activation of CMP-N-acetylneuraminic acid:lactosylceramide sialyltransferase during the differentiation of HL-60 cells induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *J Biol Chem.* 5;261(34):16270-3.

24. Choi H, Chung T, Kang N, Kim K, Lee Y, Kim C (2004) Involvement of CREB in the transcriptional regulation of the human GM3 synthase (hST3Gal V) gene during megakaryocytic differentiation of human leukemia K562 cells. *BBRC* 313, 142-147.
25. Jin UH, Ha KT, Kim KW, Chang YC, Lee YC, Ko JH, Kim CH (2008) Membrane type sialidase inhibits the megakaryocytic differentiation of human leukemia K562 cells. *Biochim Biophys Acta.* 1780(5):757-63
26. Ziulkoski AL, Andrade CM, Crespo PM, Sisti E, Trindade VM, Daniotti JL, Guma FC, Borojevic R (2006) Gangliosides of myelosupportive stroma cells are transferred to myeloid progenitors and are required for their survival and proliferation. *Biochem J*, 394(Pt 1):1-9.
27. Andrade CM, Ziulkoski AL, Santos AXS, Boldrini LC, Trindade VMT, Borojevic R, Guma FC (2006) Gangliosides of the stroma layer participate in the interferon-gamma receptor-dependent controls of myelopoiesis, *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 1030-40.
28. Williams MA, McCluer RH (1980) The use of Sep-Pak C18 cartridges during the isolation of gangliosides. *J Neurochem*, 35(1):266-269.
29. Kabayama K, Sato T, Salto K, Loberto N (2007) Dissociation of insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. *PNAS*, 104 13678-13683
30. Nakamura M, Kuroiwa N, Kono Y, Takatsuki A (2001) Glucosylceramide synthase inhibitors block pharmacological induced dispersal of the Golgi anterograde membrane flow from the endoplasmic reticulum: implication of sphingolipid metabolism in maintenance of the golgi architecture and anterograde membrane flow. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65 (6) 1369-1378.
31. Soninno S, Mauri L, Chigorno V, Prinetti A (2006) Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology.* 17 (1) 1-13.
32. Abe A, Radin NS, Shayman JA, Wotring LL, Zipkin RE, Sivakumar R, Ruggieri JM, Carson KG, and Ganem B (1995) Structural and stereochemical studies of potent inhibitors of glucosylceramide synthase and tumor cell growth. *J. Lipid Res.* 36, 611 - 621.
33. Liour S, Yu R (2002) Differential Effects of Three Inhibitors of Glycosphingolipid Biosynthesis on Neuronal Differentiation of Embryonal Carcinoma Stem Cells. *Neurochemical Research*, 27(11)1507–1512.
34. Bleicher RJ, Cabot MC (2002) Glucosylceramide synthase and apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 1585(2-3):172-8.
35. Blitterswijk WJ, van der Luit AH, Veldman RJ, Verheij M, Borst J (2003) Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? *Biochem J.* 15, 199-211.

36. Hanai N, Nores G, MacLeo C, Torres-Mendes C, Hakamori S (1988). *J. Bio Chem*, Vol. 263, No. 22, Issue of August 5, pp. 10915-10921.
37. Milani S, Sottocornola E, Zava S, Berzelli P (2007) Ganglioside GM3 is stably associated to tyrosine-phosphorylated ErbB2/EGFR receptor complexes and EGFR monomers, but not to ERBB2. *BBA 1771*: 873-878.
38. Liu Y, McCarthy J, Ladisch S (2006) Membrane ganglioside enrichment lowers the threshold for vascular endothelial cell angiogenic signaling. *Cancer Res.* 66(21) 10408-14.
39. Wettreich A, Sebollela A, Carvalho MA, Azevedo SP, Borojevic R, Ferreira ST, Coelho-Sampaio T (1999) Acidic pH modulates the interaction between human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and glycosaminoglycans. *J Biol Chem* 274(44):31468-31475.
40. Borojevic R, Carvalho MA, Corrêa-Junior JD, Arcanjo K, Gomes L, Joazeiro PP, Balduino A, Wettreich A, Coelho-Sampaio T (2003) Stroma-mediated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) control of myelopoiesis: spatial organisation of intercellular interactions, *Cell Tissue Res.* 313, 55–62.
41. Sebollela A, Cagliari TC, Limaverde GS, Chapearouge A, Sorgine MH, Coelho-Sampaio T, Ramos CH, Ferreira ST (2005) Heparin-binding sites in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor *J Biochem* 9;280(36):31949-56.

FIGURES

Figure 1 – Induction of FDC-P1 cell proliferation. Cells were incubated with 0-10ng/ml GM-CSF in RPMI (10% FBS) for 24h. Proliferation was measured with Cell Titer Aqueous Solution Proliferation Assay® (MTS). Results are expressed as absorbance in 490nm +/- SE of quadruplicates. Seeding density was 3×10^4 /well.

Figure 2 – GD1a and GM3, but not GM1 enhance FDC-P1 proliferative response to GM-CSF. Cells were incubated in RPMI (10% FBS) containing 2ng/ml GM-CSF and 20uM ganglioside (each) for 24h. Proliferation was measured with Cell Titer Aqueous Solution Proliferation Assay® (MTS). Results are expressed as absorbance in 490nm +/- SE of quadruplicates. Seeding density for FDC-P1 was 3×10^4 /well. (*) $P < 0,05$, different from GM-CSF group; Student's T test.

Figure 3 – Cell proliferation during ganglioside synthesis inhibition. (A) 1×10^5 cells were maintained in RPMI (10% FBS) containing 2ng/ml GM-CSF, 2ng/ml GM-CSF and 10uM D-PDMP, or RPMI (10% FBS) only for 48h. Proliferation and viability were assessed by cell counting in hemocytometer with Trypan Blue. Results are mean \pm SE of triplicate cultures. (B) After 48h inhibition, cells were maintained for additional 24h with inhibition medium (10uM D-PDMP) or with fresh medium after wash (washout medium). Proliferation was measured with Cell Titer Aqueous Solution Proliferation Assay® (MTS). Results are expressed as means of absorbance in 490nm \pm SE of quadruplicates. (*) $P < 0,05$, different from GM-CSF group; Student's T test.

Figure 4 – Effect of ganglioside exogenous addition on GM-CSF-induced proliferation in D-PDMP pretreated cells. 3×10^4 cells pretreated with 10uM D-PDMP for 48h were washed to remove inhibitor and further incubated with 2ng/mL GM-CSF (GMCSF, uninhibited cells); 2ng/mL GM-CSF and 10uM D-PDMP (DPDMP); 2ng/mL GM-CSF, 10uM D-PDMP and 20uM GD1a (DPDMP GD1a); 2ng/mL GM-CSF, 10uM D-PDMP and 20uM GM3 (DPDMP GM3); 2ng/mL GM-CSF, 10uM D-PDMP and 20uM GM3 and GD1a each (DPDMP GD1a GM3). Proliferation was measured with Cell Titer Aqueous Solution Proliferation Assay® (MTS). Results are expressed as absorbance in 490nm +/- SE of quadruplicates. (*) $P < 0,05$ different from DPDMP, DPDMP GM3 and DPDMP GD1aGM3 groups ; ANOVA and Tukey post hoc test.

Figure 5 – Sucrose density gradient analysis of GMR and ganglioside distribution in FDC-P1 cells. Cells were lysed in TNE 1% Triton X-100 buffer for 1h at 4°C. Lysates were put onto continuous sucrose gradient (5-35%) in TNE buffer and centrifuged at 150000xg for 16h at 4°C. Fractions were collected from the bottom of the tube. Proteins and lipids were isolated from each fraction of independent experiments and analyzed by western blotting and HPTLC, respectively, as described in methods.

Figure 6 – Subcellular location of Gd1a, GM3, GMR α and β c in FDC-P1 cells. Cells were immunostained for GD1a with human serum anti-GD1a, GM3 with DH2, GMR α and β c with specific antibodies. Single confocal sections (x , y) were taken parallel to the coverslip. 600x.

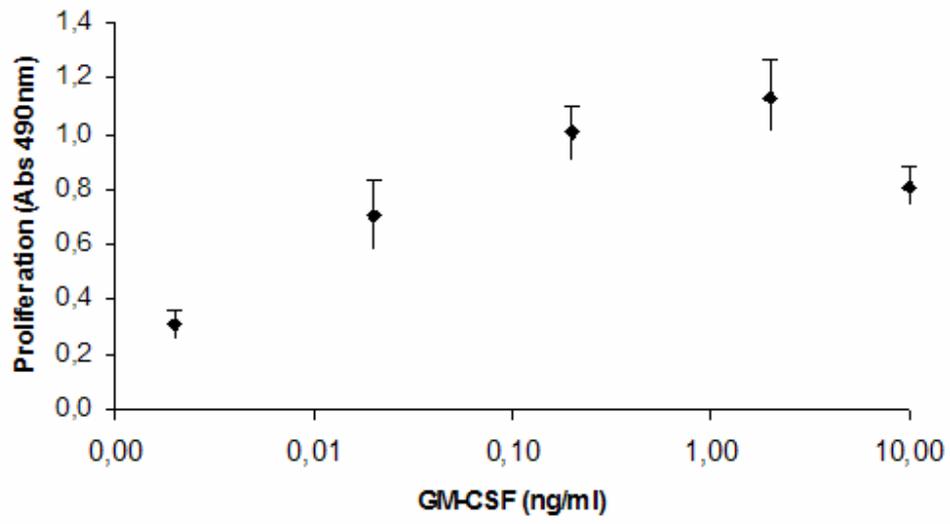


FIGURE 1

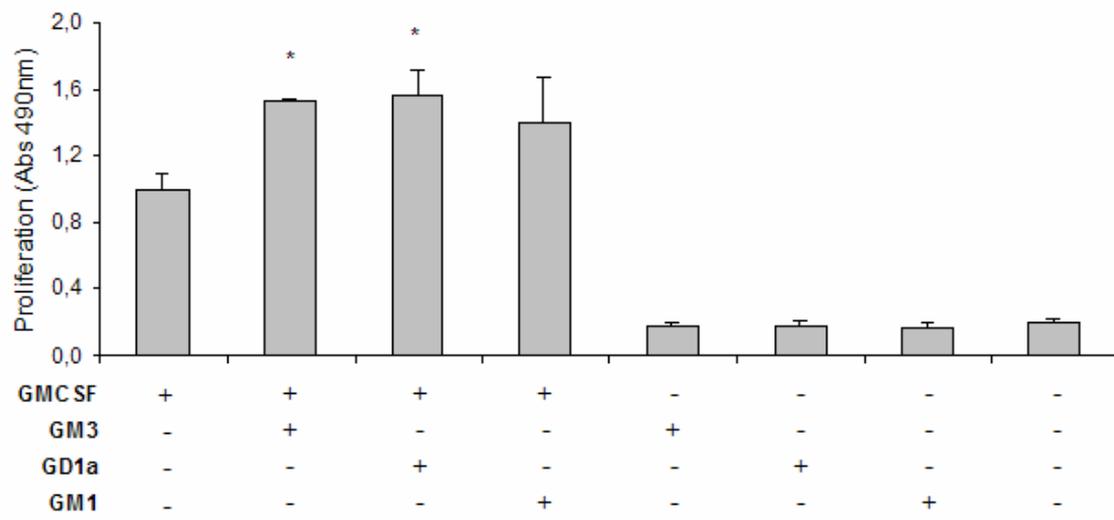


FIGURE 2

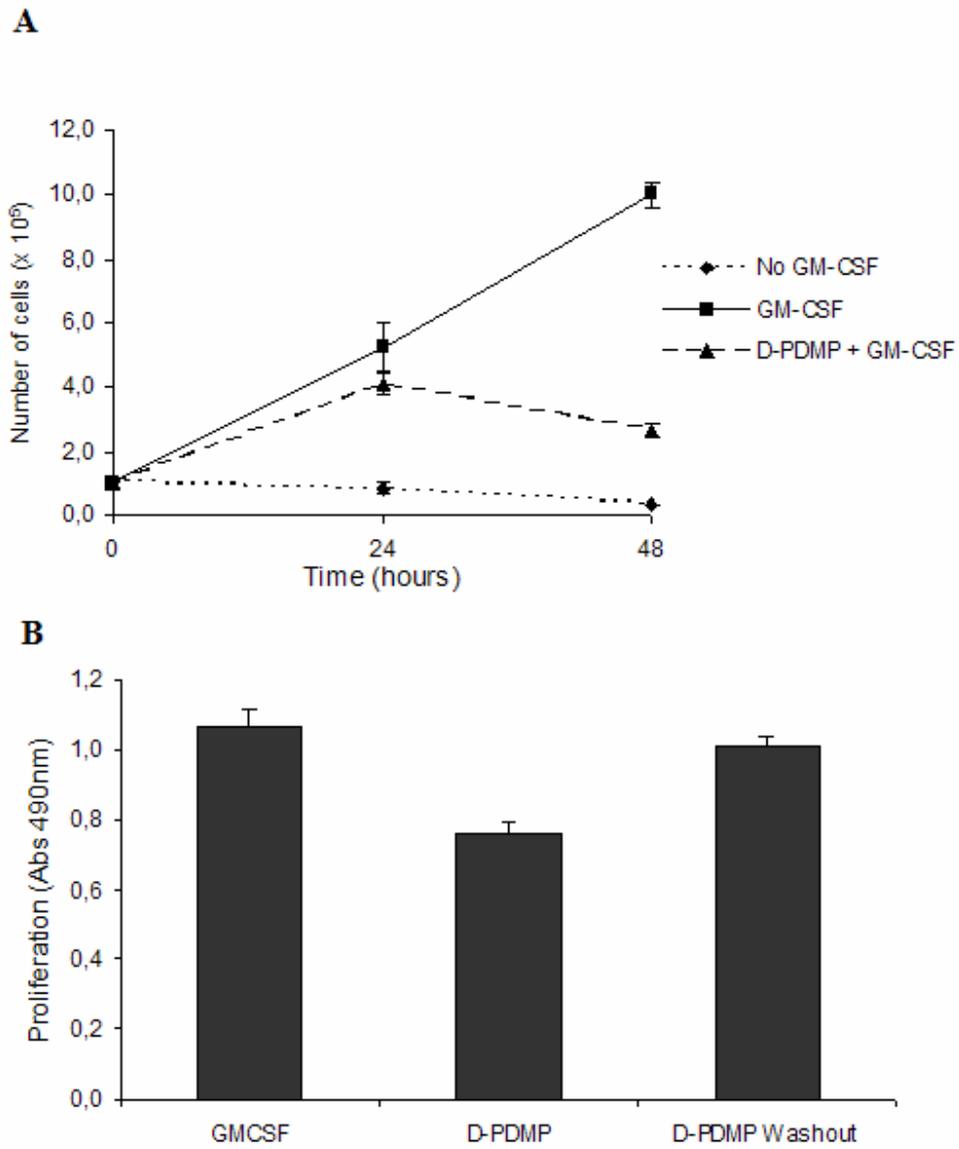


FIGURE 3

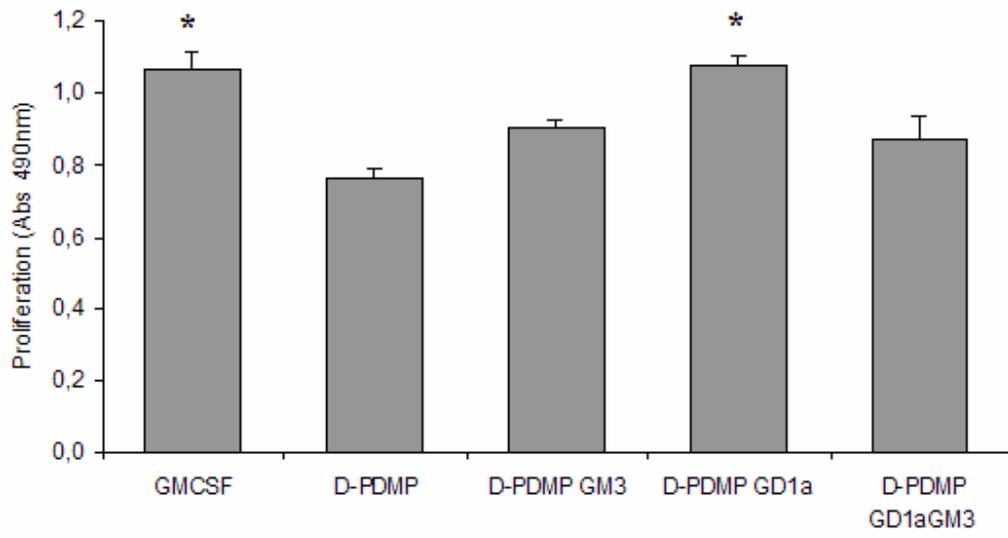


FIGURE 4

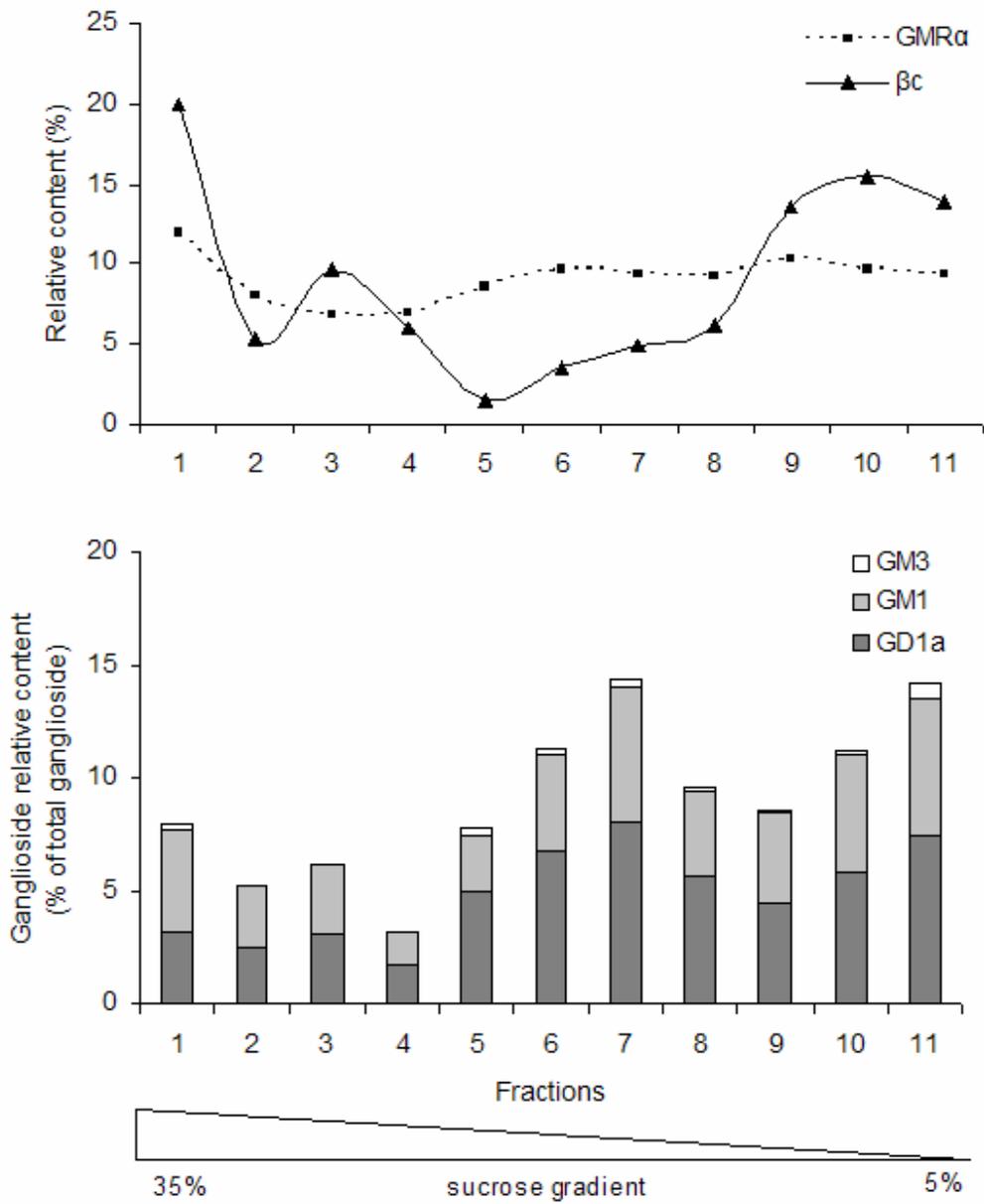


FIGURE 5

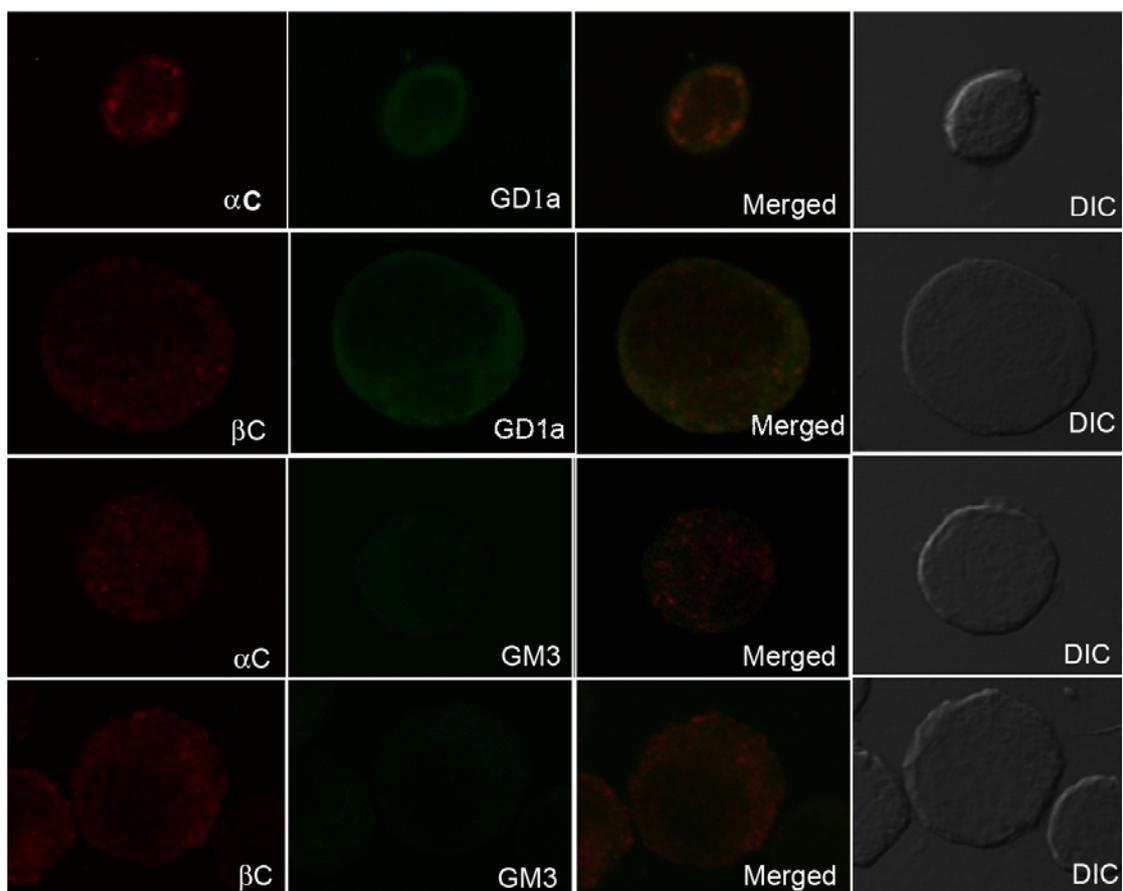


FIGURE 6

TABLES

Table 1 – Densitometric analysis of metabolically labeled gangliosides from FDC-P1 cells treated or not with D-PDMP

Proportion of ganglioside (% of total radioactivity in control)			
Gangliosides	Control	D-PDMP	% of Inhibition
GM3	3.60	1.64	54.4
GM2	5.77	0.55	90.5
GM1	33.09	18.44	44.3
GD3	3.94	2.02	48.7
GD1a	40.70	30.27	25.6
GD1b	10.88	5.16	47.7
GT1b	2.00	0.30	85.0
Total	100	58.38	

Cells were cultured for 48h in medium containing 2ng/ml GM-CSF in the presence or not of the glucosylceramide synthase inhibitor, D-PDMP (10uM). In the last 12h, [14C]-galactose (1uCi/ml) was added. Lipids were extracted, purified, analyzed by HPTLC and visualized by fluorography. Results are expressed as percentage of total radioactivity incorporated in gangliosides in control group. Representative data from triplicate are shown. GT1b, GD1b, GD1a, GD3, GM1, GM2 and GM3 are gangliosides.

CAPÍTULO 2

Gangliosídios e a modulação da sinalização mediada por GM-CSF: ativação da cascata de sinalização e análise da expressão gênica de GMR α e do fator de transcrição C/EBP α .

(Dados complementares)

INTRODUÇÃO

O GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos), é uma das principais citocinas que controlam a proliferação, diferenciação e ativação celular na cascata hematopoiética (Guthridge *et al*, 1998). A sinalização mediada por GM-CSF inicia-se com a ligação da citocina a GMR α , que se associa a β c formando um complexo (GM-CSF:GMR α : β c) capaz de desencadear o sinal. A sinalização intracelular do GM-CSF dá-se através da fosforilação de resíduos de tirosina e serina de β c por proteínas quinase associadas, servindo de sítio de ligação para diversas vias de sinalização. Uma das principais vias que controlam o processo de proliferação mediado por GM-CSF é a rota de ativação de ERK 1/2 (proteína quinase regulada por sinal extracelular) (Chang, 2003). O efeito de gangliosídeos na ativação de ERK é bem descrito em diversos tipos celulares e com diferentes abordagens (Zurita *et al*, 2001; Li *et al*, 2001; Yanagisawa *et al*, 2005).

Sabe-se que a expressão de GMR humano é regulada ao longo da diferenciação hematopoiética. Células precursoras apresentam baixos níveis de β c que vão aumentando conforme o comprometimento com as linhagens megacariocítica, eritrocítica, granulocítica e monocítica, e permanece aumentado nos estágios finais de diferenciação das duas últimas (Militi *et al*, 2000). Com relação a GMR α humana, são descritas isoformas solúveis (solGMR α), provenientes da ação de metaloproteinases ou *splicing* alternativo do mRNA. Estas proteínas são secretadas ao meio extracelular e mantêm a propriedade de ligação ao GM-CSF, mas não são capazes de associar à cadeia beta e desencadear o sinal, atuando como antagonistas funcionais do GM-CSF (Prevost *et al*, 2007). Rosas e colaboradores (2007) identificaram que, em camundongos, GMR α é também polimórfica; seu gene sofre *splicing* alternativo, gerando três transcritos: (i) normal ou *full-length* (proteína

transmembrana, tmGMR α), (ii) truncado (proteína solúvel por perda do domínio transmembrana, solGMR α) e (iii) deletado (proteína transmembrana com resíduos deletados no domínio extracelular, delGMR α), indicando que a regulação de sua função biológica pode ser tão complexa quanto em humanos (figura 1).

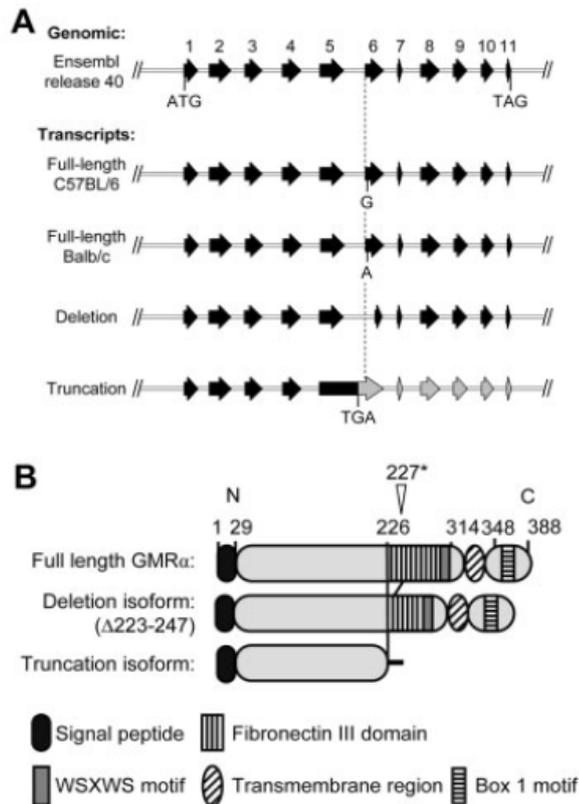


Figura 1 – Caracterização de GMR α murina. (A) Representação esquemática dos 11 exons codificantes para GMR α . A seqüência publicada (Ensembl release 40) corresponde à seqüência *full-length* de camundongos C57BL/6. Camundongos BALB/C apresentam polimorfismo no exon 6. Transcritos provenientes de *splicing* alternativo: deletado e truncado. Setas pretas correspondem aos exons codificados, setas cinzas aos não codificados. (B) Representação esquemática das três isoformas protéicas previstas de GMR α murina. A isoforma *full-length* (ou normal) contém uma cauda curta citoplasmática, uma região transmembrana e uma região extracelular. O transcrito deletado resulta em isoforma com deleção no domínio de fibronectina III, mas retém o domínio transmembrana. A isoforma truncada contém um *stop codon* prematuro, resultando em uma proteína mais curta. (Adaptado de Rosas *et al*, 2007).

A família de fatores de transcrição C/EBP é composta por seis membros que exercem papel fundamental no desenvolvimento mielocítico (C/EBP α , C/EBP β , C/EBP γ , C/EBP δ , C/EBP ϵ e C/EBP ζ). Dentre os sítios de ligação deste fator de transcrição, destacam-se as regiões promotoras de genes que codificam para receptores de fatores de crescimento, G-CSFR, M-CSF-R e GMR, modulando sua expressão e desempenhando papel importante na regulação da hematopoiese (Hohaus *et al*, 1995; Rosmarin *et al*, 2005; Suh *et al*, 2006).

Os resultados anteriores deste trabalho demonstraram que gangliosídeos estão envolvidos na modulação da atividade mitogênica do GM-CSF na linhagem mielóide murina, FDCP-1. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi (i) determinar a modulação de gangliosídeos na ativação do GMR (β c) e de ERK1/2 e (ii) analisar a modulação de gangliosídeos na expressão gênica do fator de transcrição CEBP α e das isoformas tmGMR α e solGMR α .

MÉTODOS

Materiais: o meio de cultivo RPMI 1640 e padrões de glicolipídios foram obtidos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA); Soro fetal bovino da Cultilab (Campinas, SP, Brasil), D-[U-14C] galactose (300 mCi/mmol) da Amersham Life Science (Buckinghamshire, UK), inibidor da glicosilceramida sintase *D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol* (D-PDMP) da Calbiochem (USA). Gangliosídios GM3, GD1a e GM1 da Matreya (Pleasant Gap, PA, USA), GM-CSF recombinante murino da PeproTech (Rocky Hill, NJ, USA). Anticorpos rabbit anti-mouse- β c, secundários HRP-anti-mouse e HRP-anti-rabbit da Amersham Life Science (Buckinghamshire, UK). Anticorpos mouse-anti-pTyr, rabbit anti-mouse-p44/p42 (ERK1/2) e rabbit anti-mouse ERK1/2 da Cell Signaling (USA), placas plásticas de cultura da Nunc (Roskilde, Denmark), reagente CellTiter Aqueous Solution® da Promega (USA), Kit de detecção por quimioluminescência da Amersham (UK), reagente de TRIzol, M-MLV RT e Taq DNA polimerase platinum da Invitrogen (Carlsbad, USA).

Cultura das células e obtenção dos meios condicionados: A linhagem FDC-P1 foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ – PABCAM, HUCFF, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil). As culturas foram mantidas em meio RPMI 1640, contendo 2ng/ml GM-CSF a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Para os experimentos, as células FDC-P1 foram cultivadas em presença de 2ng/ml de GM-CSF recombinante murino e /ou de 20μM dos gangliosídios GM3, GD1a ou GM1.

Avaliação da fosforilação de GMR (β c): 1×10^5 células foram mantidas em 1ml de meio RPMI em privação de soro e citocina por 4h, e, após este período, foram estimuladas com GM-CSF (2ng/ml, concentração final) por 0, 5, 10 e 15min. As células foram lavadas em

PBS frio e lisadas em tampão TNE 1% Triton X-100. As proteínas foram precipitadas por C:M (1:4) submetidas à eletroforese, seguida de transferência para membrana PVDF (300mA, 2h). A membrana foi bloqueada com T-TBS (Tween-20; 0,1%) contendo 5% de leite sem gordura (M-T-TBS) por 1h, lavada 3x com T-TBS e incubada overnight com anticorpo primário mouse-anti-p-Tyr (1:2000) em M-T-TBS a 4°C sob agitação. A membrana foi lavada 3x com T-TBS e incubada com anti-mouse-HRP (1:10000) por 1h a temperatura ambiente. A membrana foi lavada 3x com T-TBS e 1x com TBS. O imunoconteúdo foi visualizado por quimioluminescência (ECL) em um fotodocumentador (Geliance 600, PerkinElmer) e quantificado pelo software do mesmo. Os resultados foram normalizados pelo imunoconteúdo correspondente à banda de β c, usando-se anticorpo rabbit-anti-mouse- β c.

Avaliação da fosforilação de ERK1/2: 1×10^5 células foram incubadas em RPMI (10%SFB) contendo 2ng/ml de GM-CSF e 20uM de GM3 ou GD1a por 24h. As células foram lavadas em mantidas em privação de citocina por 4h. Após, foram estimuladas com 2ng/ml de GM-CSF por 10min. As proteínas foram precipitadas por C:M (1:4) e quantificadas pelo método de Lowry. Cerca de 30ug de proteína foi utilizado para SDS-PAGE e western como anteriormente descrito. A fosforilação de ERK1/2 foi determinada pelo uso de anticorpo específico anti-p-ERK1/2 (p44/p42). Os resultados foram normalizados pelo uso de anticorpo específico anti-ERK1/2. A quantificação foi realizada como já descrito.

Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR em tempo real: O mRNA total das células foi extraído utilizando o reagente Trizol de acordo com instruções do fabricante (Invitrogen). O cDNA foi sintetizado a partir do RNA total por transcrição reversa usando 1 ug de oligo(dT),

primer T23V (5' TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV3') e enzima transcriptase reversa M-MLV conforme instruções (Invitrogen). A reação foi feita por 60 min a 42°C. O PCR quantitativo foi realizado pelo sistema real-time PCR ABI PRISM 7500 sequence detector. SybrGreen foi utilizado como marcador fluorescente de dupla fita de DNA. Os primers utilizados estão listados na tabela 1. A reação era composta de um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 min, seguido de 40 ciclos de 10 seg a 94°C, 15 seg a 60°C e 15 seg a 72°C. As amostras foram mantidas a 40°C por 2 min para renaturação e aquecidas de 55°C a 90°C (1°C/seg) para gerar a curva de desnaturação dos produtos amplificados. A reação foi feita em um volume final de 20ul composto de 0,4uL do par de primers diluídos, 1,2uL de MgCl 50mM, 0,4uL de dNTPs 5mM, 0,2uL de tampão para PCR 10x, 1uL de SYBR Green (1:10000), 4,95uL de água e 0,05uL (0,25U/uL) da enzima Taq DNA polimerase Platinum. Todos os resultados foram analisados conforme o método 2- $\Delta\Delta$ CT (Livak *et al*, 2001) usando β -actina como controle interno.

Quantificação de proteínas: A determinação do conteúdo de proteínas foi realizada pela técnica descritas por Peterson(1977).

Análise estatística: Os dados são apresentados como média \pm erro padrão, $p < 0,05$ foi considerado significativo. Comparações entre grupos foram realizadas por Test t de Student e, quando apropriado, ANOVA e teste *pos hoc* de Tukey. Todas as analyses foram realizadas com o programa SPSS 14.0 (SPSS Inc. Chicago, Il, USA).

Tabela 2 – Primers utilizados para amplificação dos repectivos cDNAs

	Primer Forward	Primer Reverse
GMR α N1	5'- GAC GAC GTG GTG GCT ACG -3'	5'- CCA CTG GAC CTC AAA CTG GA -3'
GMR α N2	5'- GCT ACG AAG GCG CTC GAG -3'	5'- CCA CTG GAC CTC AAA CTG GA -3'
GMR α TRUNC	5'- CGG GAA TTG TGA GTG ACA GC -3'	5'- CCA CTG GAC CTC AAA CTG GA -3'
C/EBP α	5'- CCG ACT TCT ACG AGG TGG AG -3'	5'- GTC GAT GTA GGC GCT GAT GT -3'
b-actina	5'- TAT GCC AAC ACA GTT CGT GTC TGG -3'	5' TAC TCC TGC TTG CTG ATC CAC AT -3'

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados no capítulo 1 demonstraram que os gangliosídeos GM3 e GD1a, exogenamente adicionados, modulam positivamente a proliferação induzida por GM-CSF em células FDC-P1. Também demonstramos que gangliosídeos e GMR podem estar presentes nos mesmos microdomínios de membrana. Além disso, por imunocitoquímica apresentamos evidências de que o gangliosídeo GD1a endogenamente expresso colocaliza-se com GMR α e β c.

A influência de gangliosídeos na atividade de diversos receptores de fatores de crescimento tem sido amplamente descrita (Miljan % Bremer, 2002; Hakomori, 2008). A ligação do GM-CSF ao GMR desencadeia a fosforilação de resíduos citoplasmáticos de tirosina do receptor (Myajima, 1992). Para determinar o tempo ideal de ativação do receptor induzida por GM-CSF, as células foram mantidas em privação de soro e citocina e então estimuladas com GM-CSF por diferentes tempos (Figura 2). A maior ativação foi verificada após cinco minutos de estímulo. Para determinar o possível efeito modulador do gangliosídeo GD1a na ativação de β c, as células foram pré-incubadas por 24h com GD1a, lavadas e mantidas em privação de soro e citocina e estimuladas com GM-CSF (Figura 3). O pré-tratamento com o gangliosídeo não alterou significativamente o grau de fosforilação de resíduos tirosina do receptor, sugerindo que a modulação observada na proliferação possa não ocorrer em nível de ativação do GMR. Porém, devido falta de especificidade do anticorpo (anti-p-Tyr), que dispomos, e a conseqüente baixa resolução das imagens obtidas para quantificação, consideramos a possibilidade de que a ausência de diferença seja resultado de questões metodológicas.

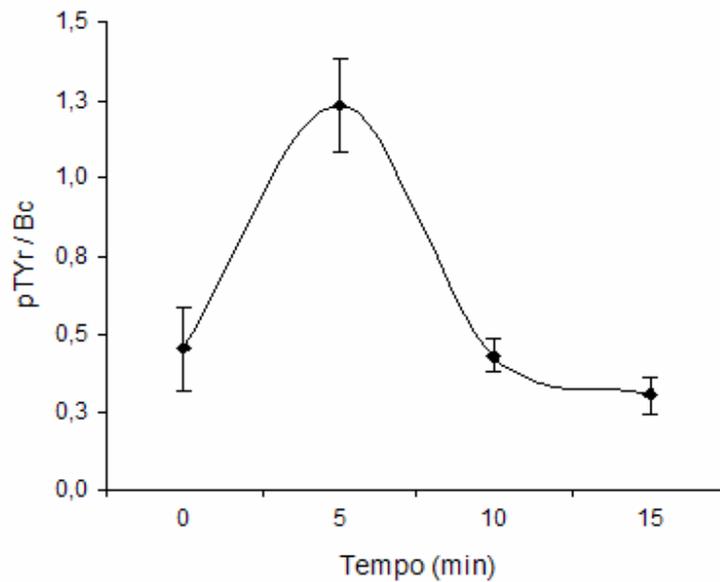


Figura 2 – Análise da fosforilação de βc em células FDC-P1 estimuladas com GM-CSF. As células foram mantidas em meio RPMI sem soro por 4h e então estimuladas com GM-CSF (2ng/ml) por 0, 5, 10 e 15min e colocadas imediatamente em gelo. As proteínas foram submetidas a SDS-PAGE, transferidas para membranas de PVDF. Foram utilizados anticorpos anti-fosfotirosina e anti- βc para quantificação relativa. O imunocnteúdo foi detectado por ensaio de quimiluminescência, as imagens obtidas por fotodocumentação e analisadas por *software* de quantificação. Resultados são expressos com Média +/- EP de triplicatas.

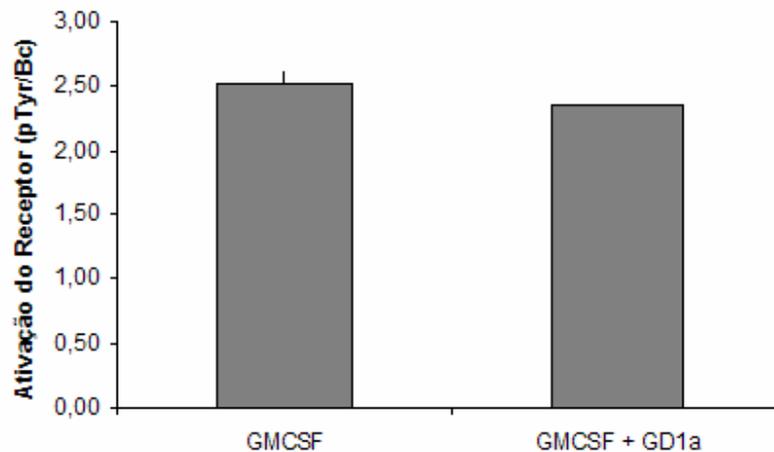


Figura 3 - Efeito do gangliosídeo GD1a na ativação de GMR (βc). As células foram mantidas em meio RPMI (10%SFB) contendo GM-CSF (2ng/ml) e GD1a (20uM) por 24h. Foram lavadas 3x com CMF, mantidas em RPMI sem soro por 4h e então estimuladas com GM-CSF (2ng/ml) por 10min e colocadas imediatamente em gelo. As proteínas foram submetidas a SDS-PAGE e transferidas para membranas de PVDF. Foram utilizados anticorpos anti-fosfotirosina e anti- βc para quantificação relativa. O imunocnteúdo foi

detectado por ensaio de quimiluminescência, as imagens obtidas por fotodocumentação e analisadas por *software* de quantificação. Resultados são expressos com Média +/- EP de quadruplicatas.

A ligação do GM-CSF ao receptor, desencadeia uma cascata de eventos de sinalização mediada por proteínas quinases intracelulares, dentre as quais, destaca-se, em processos de proliferação, a de ERK (Okuda, 1992). Para avaliar se a modulação da atividade mitogênica de GM-CSF por gangliosídeos ocorre via aumento de ativação de ERK, nós analisamos a ativação de ERK1/2 (p44/p42) por GM-CSF em células previamente incubadas com 20uM de GD1a ou GM3. Baseado na curva de tempo de ativação do GMR, as células foram estimuladas por 10min com 2ng/ml GMCSF. A adição exógena de GD1a ou GM3 aumentou significativamente a ativação de ERK1/2 induzida por GM-CSF (Figura 4), sugerindo que a modulação positiva da proliferação possa ser dependente da ativação de ERK via a estimulação do receptor de GM-CSF. Uma vez que as células FDC-P1 são dependentes da adição exógena de IL-3 e/ou GM-CSF ao meio de cultivo para sobrevivência e proliferação, não podemos testar a ativação dessa rota em células não tratadas com GM-CSF. Dessa forma, não podemos descartar a possibilidade de que os gangliosídeos estejam modulando vias secundárias de ativação de proliferação, através de fatores de crescimento presentes no soro fetal bovino.

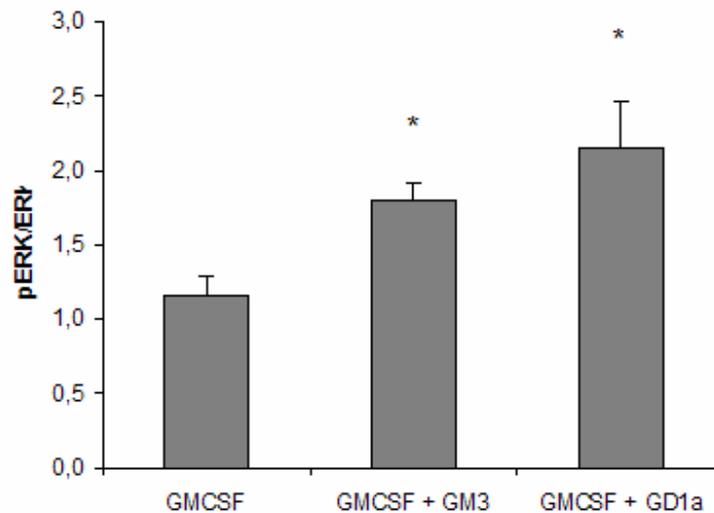


Figura 4 – Adição exógena de gangliosídeos aumenta a ativação de ERK1/2 por GM-CSF. As células foram mantidas em meio RPMI (10%SFB) contendo GM-CSF (2ng/ml) e GM3 ou GD1a (20uM) por 24h. Foram lavadas 3x com CMF, mantidas em RPMI sem soro por 4h e então estimuladas com GM-CSF (2ng/ml) por 10min e colocadas imediatamente em gelo. As proteínas foram submetidas a SDS-PAGE e transferidas para membranas de PVDF. Foram utilizados anticorpos anti-p-MAPK (p44/p42) e anti-MAPK para quantificação relativa. O imunocnteúdo foi detectado por ensaio de quimiluminescência, as imagens obtidas por fotodocumentação e analisadas por *software* de quantificação. Resultados são expressos com Média +/- EP de quadruplicatas. (*) diferente de GM-CSF ($p < 0,05$), Teste t de Student.

A regulação dos processos de proliferação e diferenciação hematopoiética desencadeados pelo sinal de uma citocina ocorre através de uma rede integrada de ativação de enzimas de sinalização e ativação de fatores de transcrição específicos, que redefinem o perfil de expressão gênica associado a determinado processo. O C/EBP α é um dos principais fatores de transcrição associados à mielopoiese, e um de seus sítios de ligação é a região promotora do gene para o GMR α (Rosmarin, 2005). A análise quantitativa da expressão gênica do C/EBP α demonstrou que o tratamento com o gangliosídeo GD1a, resulta em níveis aumentados de mRNA deste fator de transcrição, sugerindo que a expressão de genes sujeitos a sua regulação também possa estar modulada por gangliosídeos (Figura 5).

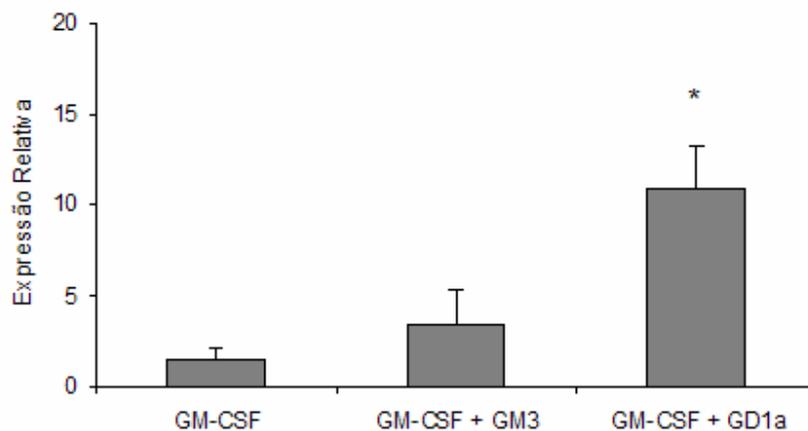


Figura 5 – Expressão relativa de C/EBP α no tratamento com diferentes gangliosídeos qRT-PCR. As células foram mantidas em meio RPMI (10%SFB) contendo GM-CSF (2ng/ml) e gangliosídeos GM3, GD1a e GM1 por 24h. O RNA total foi extraído, sintetizado o cDNA e a reação de amplificação realizada com uso do *primers* C/EBP α , descrito na tabela 1. β -actina foi utilizada como gene constitutivo (primer na tabela 1). Resultados são Média +/- EP de triplicatas. (*) diferente de GM-CSF ($p < 0,05$), Teste T de Student.

São descritas pelo menos 3 variantes murinas de GMR α provenientes de *splicing* alternativo: normal, truncada e deletada (Rosas, 2007). Com o objetivo de caracterizar a expressão gênica das isoformas de GMR α nas células FDC-P1, desenvolvemos um par de *primers* capaz de amplificar os três transcritos simultaneamente. Interessantemente, somente os transcritos condizentes com o tamanho esperado para tmGMR α e solGMR α foram detectados (Figura 5), sendo posteriormente amplificados isoladamente pelo uso de *primers* específicos (Figura 6). A quantificação relativa demonstrou que os tratamentos com GM-CSF e os gangliosídeos GD1a ou GM3 não afetam a expressão gênica de tmGMR α . A expressão gênica de solGMR α também encontra-se inalterada, entretanto, devido a variação interna no grupo GM-CSF (controle), o desvio padrão calculado dificulta a comparação acurada com os tratamentos com gangliosídeos.

Em resumo, estes resultados demonstram que o conteúdo de gangliosídeos específicos, neste caso GM3 e GD1a, pode modular vias de sinalização na proliferação induzida por GM-CSF, incluindo eventos de transcrição gênica. Além disso, caracterizamos a expressão das isoformas tmGMR α e solGMR α na linhagem FDC-P1, além de desenvolvemos primers específicos para quantificação diferencial de ambas, constituindo uma interessante ferramenta para análise de modulação da expressão gênica deste receptor em diferentes estudos envolvendo a sinalização via GM-CSF.

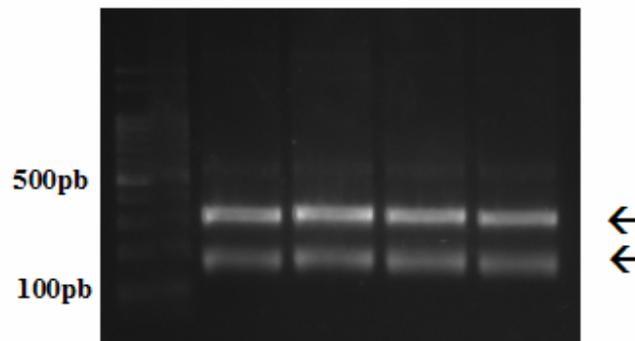


Figura 5 – Identificação da expressão das isoformas tmGMR α , solGMR α , mas não delGMR α nas células tratadas com GMCSF por RT-PCR. As células foram mantidas em meio RPMI (10%SFB) contendo GM-CSF (2ng/ml) por 24h. O RNA total foi extraído, sintetizado o cDNA e a reação de amplificação realizada com uso do *primer* N1, descrito na tabela 1. Setas indicam dois produtos amplificados nos tamanhos aproximados de 153bp e 312bp, correspondentes às isoformas Normal e Truncada. Quadruplicatas.

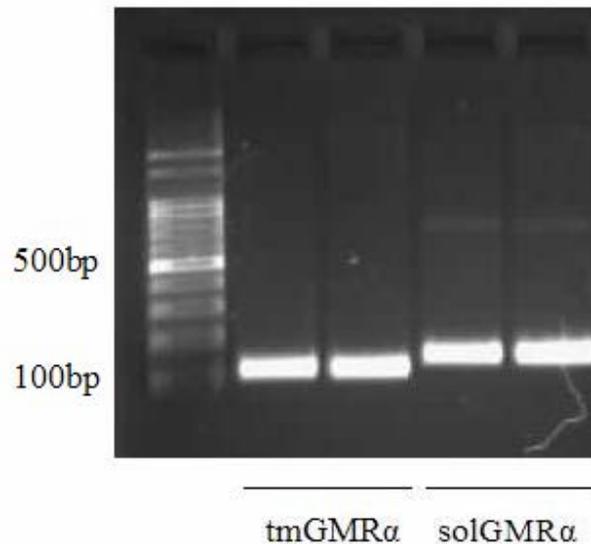


Figura 6 – Identificação específica das isoformas tmGMR e solGMR nas células tratadas com GMCSF por RT-PCR. As células foram mantidas em meio RPMI (10%SFB) contendo GM-CSF (2ng/ml) por 24h. O RNA total foi extraído, sintetizado o cDNA e a reação de amplificação realizada com uso dos *primers* N2 e TRUNC, descritos na tabela 1. Setas indicam dois produtos amplificados nos tamanhos aproximados de 151bp e 171bp, correspondentes às isoformas Normal e Truncada. Quadruplicatas.

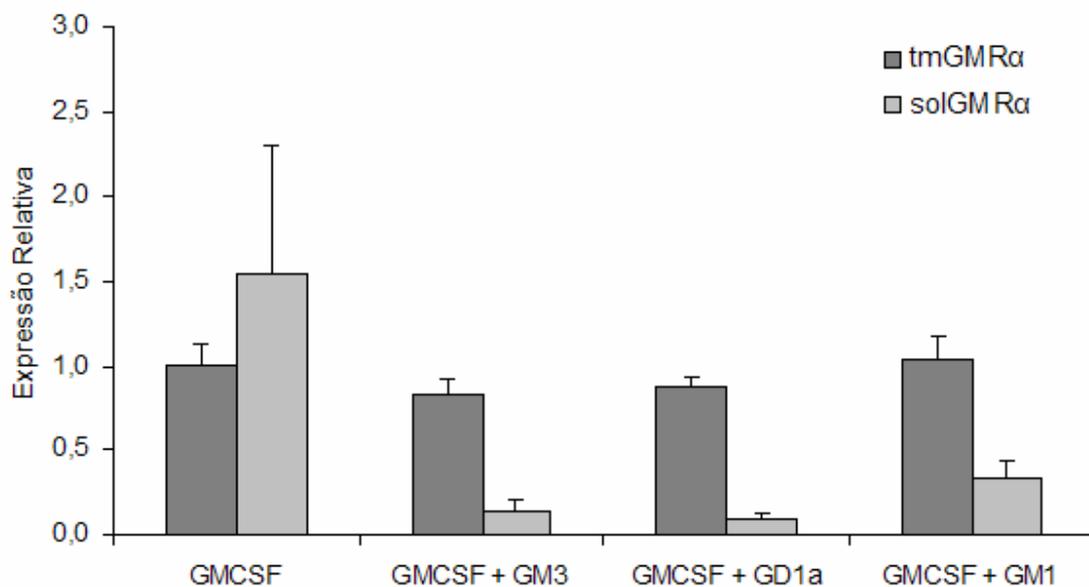


Figura 7 – Expressão relativa das isoformas tmGMRalfa e solGMRalfa no tratamento com diferentes gangliosídios qRT-PCR. As células foram mantidas em meio RPMI (10%SFB) contendo GM-CSF (2ng/ml) e gangliosídios GM3, GD1a e GM1 por 24h. O RNA total foi extraído, sintetizado o cDNA e a reação de amplificação realizada com uso

dos primers N2 e TRUNC, descritos na tabela 1. β -actina foi utilizada como gene constitutivo. Resultados são Média \pm EP de triplicatas.

PARTE III

DISCUSSÃO

O GM-CSF é uma das principais citocinas envolvidas nos processos de proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas. É uma glicoproteína de 14kDa que atua através de um receptor (GMR) composto de uma subunidade específica para o ligante (GMR α) e uma subunidade responsável pela transdução do sinal (β c) (Miyajima *et al*, 1992). O envolvimento de gangliosídios na proliferação mediada por fatores de crescimento é bem descrito para diversos tipos celulares, ocorrendo através da modulação dos respectivos receptores na membrana das células-alvo (Simons & Toomre, 2000; Miljan & Bremer, 2002; Yoon *et al*, 2006; Liu *et al*, 2004; Liu *et al*, 2006; Kabayama *et al*, 2007). Curiosamente, até o momento não há trabalhos descrevendo o papel de gangliosídios na resposta proliferativa ao GM-CSF.

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a capacidade de diferentes células estromais em sustentar a proliferação de células mielóides está relacionada ao perfil de gangliosídios expressos e liberados ao meio de cultura pelos estromas (Ziulkoski *et al*, 2006; Andrade *et al*, 2006). No presente trabalho, nós estudamos o efeito dos gangliosídios na resposta proliferativa mediada por GM-CSF na linhagem mielóide murina FDC-P1. Para isso, utilizamos abordagens de enriquecimento através da adição exógena de gangliosídios, bem como, da inibição da síntese endógena pelo uso de inibidor D-PDMP. O conjunto de dados aqui apresentados demonstra que gangliosídios modulam a resposta proliferativa mediada por GM-CSF nas células FDC-P1. Essas células expressam principalmente os gangliosídios GD1a e GM1, e em menor quantidade, GM3, GM2, GD3, GT1b e GD1b (Ziulkoski *et al*, 2006). Quando adicionados exogenamente, os gangliosídios GM3 e GD1a aumentaram significativamente a proliferação induzida por GM-CSF. De acordo, quando a síntese de gangliosídios foi inibida pelo uso de D-PDMP, observou-se uma

redução da proliferação; e a adição de GD1a foi capaz de retomar a proliferação a níveis do controle. Estes resultados sugerem um papel importante deste gangliosídeo na resposta mediada por GM-CSF nestas células.

Gangliosídios localizam-se principalmente na camada externa da membrana plasmática, podendo ser encontrados em microdomínios de membrana enriquecidos em glicoesfingolipídios (conhecidos como GEMs ou *rafts*) compostos de colesterol, fosfolipídios saturados e esfingolipídios (Pike, 2006; Simons & Ikonen, 1997). Uma das principais características atribuídas a *rafts* é a capacidade de incluir ou excluir determinadas proteínas, como receptores de fatores de crescimento. *Rafts* lipídicos são considerados plataformas de compartimentalização de lipídios e proteínas, que modulam transdução de sinal, tráfego de membranas, organização de citoesqueleto, polarização e entrada de patógenos. Suas características de alto grau de empacotamento lipídico, associado à alta razão de lipídios/proteínas conferem a essas estruturas de membrana a característica de insolubilidade a detergentes não-iônicos, a 4°C (Babiychuk *et al*, 2006).

Nas células FDC-P1, já se havia demonstrado a presença de gangliosídios GM3, GD1a e GM1 na fração resistente ao tratamento de lise com o detergente Triton X-100 (1%), considerada a fração que retém os *rafts* (Ziulkoski *et al*, 2006). Neste trabalho, confirmamos por fracionamento em gradiente de sacarose que os gangliosídios distribuem-se preferencialmente nas frações resistentes ao tratamento com detergente, e que, GMR α e β c também se encontram distribuídas nestas frações, sugerindo que tanto GMR quanto os gangliosídios localizam-se em *rafts* nas células FDC-P1.

A revelação por imunocitoquímica dos gangliosídios GM3 e GD1a foi condizente com o perfil encontrado nas análises por HPTLC; encontramos uma intensa marcação para GD1a e apenas um débil sinal para o GM3. Estes resultados, obtidos por técnicas diferentes,

confirmam os conteúdos celulares desses glicolípidios. Já a análise das imagens obtidas por microscopia confocal mostra que o GD1a distribui-se preferencialmente na membrana plasmática, e a sobreposição das imagens com GMR α e β c, sugere a existência de pontos de co-localização entre este gangliosídeo e GMR. Embora não tenhamos encontrado associação física entre gangliosídios e GMR através do ensaio de imunoprecipitação, os resultados aqui apresentados permitem sugerir que gangliosídios e GMR interajam através de complexos macromoleculares na membrana plasmática, organizados na forma de *rafts*, como regiões com alta densidade de cargas negativas necessárias para atividade do GM-CSF.

A modulação por gangliosídios de eventos *downstream* de cascatas de sinalização de diferentes tipos de receptores é bem demonstrada (Zurita *et al*, 2001; Li *et al*, 2001; Yanagisawa *et al*, 2005). Em células hematopoiéticas, o estímulo proliferativo induzido por GM-CSF via GMR desencadeia ativação da via das MAPK (Kanakura *et al*, 1991; Okuda, 1992). A análise da ativação de ERK1/2 revelou que a adição exógena de gangliosídios GM3 e GD1a aumenta a fosforilação de ERK1/2, sugerindo que a modulação positiva observada na proliferação induzida por GM-CSF seja dependente de da via das ERK.

O sinal desencadeado por uma citocina, transmitido através de uma rede integrada de enzimas de sinalização, termina por ativar fatores de transcrição específicos que redefinem o perfil de expressão gênica necessário para a resposta biológica ao sinal. O C/EBP α é um dos principais fatores de transcrição associados à mielopoiese, e um de seus sítios de ligação é a região promotora do gene para o GMR α (Rosmarin *et al*, 2005). A análise quantitativa da expressão gênica do C/EBP α demonstrou que o tratamento com os gangliosídios GD1a ou GM3, resulta em níveis aumentados de mRNA deste fator de transcrição, sugerindo que a expressão de genes sujeitos a sua regulação também possa estar modulada.

Isoformas solúveis provenientes de *splicing* alternativo de GMR α murina foram descritas (Rosas *et al*, 2007), bem como para a cadeia alfa do receptor de interleucina-5 (IL-5R α) (Tavernier *et al*, 2000). No caso de IL-5R α , a expressão gênica diferencial entre as duas isoformas parece estar sob regulação da própria citocina, favorecendo a expressão da isoforma transmembrana em detrimento da isoforma solúvel. Nas FDC-P1 não conseguimos demonstrar a relação entre tratamentos com diferentes doses de GM-CSF e a expressão das isoformas do GMR (dados não mostrados). Já os gangliosídeos GD1a e GM3 parecem afetar a expressão gênica de solGMR α , mas não a de tmGMR α .

Em resumo, estes resultados demonstram que o conteúdo de gangliosídeos pode modular a proliferação induzida por GM-CSF através da modulação de vias de sinalização incluindo eventos de transcrição gênica. Além disso, a caracterização e quantificação diferencial da expressão das isoformas tmGMR α e solGMR α na linhagem FDC-P1, constitui uma interessante ferramenta para análise da modulação da expressão gênica deste receptor em diferentes estudos envolvendo a sinalização via GM-CSF.

Estudos anteriores (Borojevic *et al*, 2003; Ziulkoski *et al*, 2006; Andrade *et al*, 2006) e os resultados relatados acima sugerem que a interação entre GM-CSF e GMR nas células FDC-P1 é controlada por complexos macromoleculares, incluindo o receptor, gangliosídeos e proteoglicanos contendo heparan sulfato, localizados em microdomínios de membrana, chamados de *rafts*. O efeito modulador desencadeado no nível da membrana seria então mantido ao longo da cascata de sinalização intracelular, resultando na modulação da maquinaria de transcrição gênica da célula, resultando na alteração da resposta biológica ao sinal modulado.

PERSPECTIVAS

Com o objetivo de elucidar os mecanismos pelos quais os gangliosídeos modulam a sinalização via GM-CSF, as perspectivas deste trabalho são avaliar a ativação de componentes da rota de sinalização de GM-CSF (GMR, JAK2, STAT, PI3K, AKT, ERK1/2) através de abordagens experimentais de adição exógena de gangliosídeos e depleção endógena através do uso de inibidor da enzima-chave da rota de biossíntese (glicosilceramida sintase), o D-PDMP. O uso de inibidores específicos de PI3K, AKT e ERK para confirmar a participação desses componentes ativados na sinalização de GM-CSF contribuirá para o esclarecimento da dependência de determinada rota para a amplificação do sinal mitogênico neste e outros tipos celulares nos quais o GM-CSF atue.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe A, Radin NS, Shayman JA, Wotring LL, Zipkin RE, Sivakumar R, Ruggieri JM, Carson KG, and Ganem B (1995) Structural and stereochemical studies of potent inhibitors of glucosylceramide synthase and tumor cell growth. *J. Lipid Res.* 36, 611 - 621.
- Alvarez-Silva M, Borojevic R (1996) GM-CSF and IL-3 activities in schistosomal liver granulomas are controlled by stroma-associated heparan-sulfate proteoglycans, *J. Leukocyte Biol.* 59, 435–441.
- Andrade CM, Ziulkoski AL, Santos AXS, Boldrini LC, Trindade VMT, Borojevic R, Guma FC (2006) Gangliosides of the stroma layer participate in the interferon-gamma receptor-dependent controls of myelopoiesis, *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 1030-40.
- Babiychuk EB, Draeger A (2006) Biochemical characterization of detergent-resistant membranes: a systematic approach. *Biochem J.* 1:397(3) 407-16.
- Barreda DR, Hanington PC, Belosevic M (2004) Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors, *Dev. Comp. Immunol.* 28, 509-54. Review.
- Bharti AC, Singh SM (2001) Gangliosides derived from a T cell lymphoma inhibit bone marrow cell proliferation and differentiation, *Int. Immunopharmacol.* 1, 155–165.
- Bleicher RJ, Cabot MC (2002) Glucosylceramide synthase and apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 1585(2-3):172-8.
- Blitterswijk WJ, van der Luit AH, Veldman RJ, Verheij M, Borst J (2003) Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? *Biochem J.* 15, 199-211
- Borojevic R, Carvalho MA, Corrêa-Junior JD, Arcanjo K, Gomes L, Joazeiro PP, Balduino A, Wettreich A, Coelho-Sampaio T (2003) Stroma-mediated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) control of myelopoiesis: spatial organisation of intercellular interactions, *Cell Tissue Res.* 313, 55–62.
- Bremer EG, Hakomori S (1982) GM3 ganglioside induces hamster fibroblast growth inhibition in chemically-defined medium: Ganglioside may regulate growth-factor function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106, 711-718.
- Bremer EG, Schlessinger J and Hakomori S (1986) Ganglioside-mediated modulation of cell growth. Specific effects of GM3 on tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 261, 2434-2440
- Brown CB, Beaudry P, Laing TD, Shoemaker S, Kaushansky K (1995) In vitro characterization of the human recombinant soluble granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor. *Blood*, 85(6):1488-1495.

Brown DA, London E (1997) Structure of detergent-resistant membrane domains: Does phase separation occur in biological membranes? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240 1-7.

Brown DA, London E (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14:111-36

Carvalho MA, Arcanjo K, Silva LCF, Borojevic, R (2000) The capacity of connective tissue stromas to sustain myelopoiesis depends both upon the growth factors and the local intercellular environment, *Biol. Cell* 92, 605-614.

Chang F, Steelman LS, Lee JT, Shelton JG, Navolanic PM, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA (2003) Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia* 17, 1263-1293

Choi H, Chung T, Kang N, Kim K, Lee Y, Kim C (2004) Involvement of CREB in the transcriptional regulation of the human GM3 synthase (hST3Gal V) gene during megakaryocytic differentiation of human leukemia K562 cells. *BBRC* 313, 142-147.

Chung, T, Choi H, Lee Y, Kim C (2005) Molecular mechanism for transcriptional activation of ganglioside GM3 synthase and its function in differentiation of HL-60 cells. *Glycobiology*, 15, 233-244.

Cumano A, Godin I (2007) Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu Rev Immunol.* 25:745-85. Review.

De Groot RP, COFFER P, Koenderman L (1998) Regulation of proliferation, differentiation and survival by the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor family. *Cell Signal*, 10 (9) 619-628.

Degroote S, Wolthoorn J, Meer G (2004) The cell biology of glycosphingolipids. *Sem. Cell & Development Biology*, 15, 375-387, Review.

Dorshkind K (1990) Regulation of hematopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Ann. Rev. Immunol*, 8, 111-137.

Edidin M (2003) The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 32, 257-83.

Geijsen N, Koenderman L, Coffey PJ (2001) Specificity in cytokine signal transduction: lessons learned from the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor family. *Cytokine Growth Factor Rev.* 12(1):19-25. Review.

Gupta P, Oegema J, Brazil JJ, Dudek AZ, Slungaard A, Verfaillie CM (1998) Structurally specific heparan sulfates support primitive human hematopoiesis by formation of a multimolecular stem cell niche. *Blood*, 92 (12) 4641-4651.

Guthridge MA, Stomski FC, Thomas D, Woodcock JM, Bagley CJ, Berndt MC, Lopez AF (1998) Mechanism of activation of the GM-CSF, IL-3, and IL-5 family of receptors. *Stem Cells*, 16(5):301-313.

Guthridge MA, Powell JA, Barry EF, Stomski FC, McClure BJ, Ramshaw H, Felquer FA, Dottore M, Thomas DT, To B (2006) Growth factor pleiotropy is controlled by a receptor Tyr/Ser motif that acts as a binary switch. *EMBO J*, 25(3):479-489.

Haga Y, Hatanaka K, Hakomori SI (2008) Effect of lipid mimetics of GM3 and lyso-GM3 dimer on EGF receptor tyrosine kinase and EGF-induced signal transduction. *Biochim Biophys Acta*. 1780(3) 393-404.

Hakomori SI (2008) Structure and function of glycosphingolipids and sphingolipids: recollections and future trends. *Biochim Biophys Acta*. 1780(3):325-46 Review.

Hanai N, Nores G, MacLeo C, Torres-Mendes C, Hakomori S (1988). *J. Bio Chem*, Vol. 263, No. 22, Issue of August 5, pp. 10915-10921, 1

Hansen G, Hercus TR, McClure BJ, Stomski FC, Dottore M, Powell J, Ramshaw H, Woodcock JM, Xu Y, Guthridge M, McKinstry WJ, Lopez AF, Parker MW (2008) The structure of the GM-CSF receptor complex reveals a distinct mode of cytokine receptor activation. *Cell* 8;134(3):496-507.

Hess ST, Gould TJ, Gudheti MV, Maas SA, Mills KD, Zimmerberg J (2007) Dynamic clustered distribution of hemagglutinin resolved at 40 nm in living cell membranes discriminates between raft theories. *Proc Natl Acad Sci. USA* 104 (44):17370-5.

Hohaus S, Petrovick MS, Voso MT, Sun Z, Zhang DE, Tenen DG (1995) PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Mol Cell Biol*.15(10):5830-45.

Huang X, Cho S, Spangrude GJ (2007) Hematopoietic stem cells: generation and self-renewal. *Cell Death and Differentiation* 14, 1851–1859

Itoh T, Liu R, Yokota T, Arai KI, Watanabe S (1998) Definition of the role of tyrosine residues of the common β subunit regulating multiple signaling pathways of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor. *Mol Cell Biol* 18(2):742-752.

Jin UH, Ha KT, Kim KW, Chang YC, Lee YC, Ko JH, Kim CH (2008) Membrane type sialidase inhibits the megakaryocytic differentiation of human leukemia K562 cells. *Biochim Biophys Acta*. 1780(5):757-63

Kabayama K, Sato T, Salto K, Loberto N (2007) Dissociation of insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. *PNAS*, 104 13678-13683.

Kanakura Y, Druker B, Wood KW, Mamon HJ, Okuda K, Roberts TM, Griffin JD (1991) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 induce rapid

phosphorylation and activation of the proto-oncogene Raf-1 in a human factor-dependent myeloid cell line. *Blood* 15;77(2):243-8.

Kaucic K, Grovas A, Li R, Quinones R, Ladisch S (1994) Modulation of human myelopoiesis by human gangliosides. *Experimental Hematology*, 22, 52-59.

Laemmli, UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lang Z, Guerrero M, Li R, Ladisch S (2001) Ganglioside GD1a enhances VEGF-induced endothelial cell proliferation and migration. *Bioch Biophys Res Com*, 282, 1031-1037.

Lauc G, Heffer-Lauc M (2006) Shedding and uptake of gangliosides and glycosphosphatidylinositol-anchored proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1760: 584-602.

Li R, Manela J, Ladisch S (2000) Cellular gangliosides promote growth factor-induced proliferation of fibroblasts. *J Biol Chem* 275: 34213-34223.

Lingwood D, Ries J, Schwille P, Simons K (2008) Plasma membranes are poised for activation of raft phase coalescence at physiological temperature. *Proc Natl Acad Sci.* 22 105(29):10005-10.

Liour S, Yu R (2002) Differential Effects of Three Inhibitors of Glycosphingolipid Biosynthesis on Neuronal Differentiation of Embryonal Carcinoma Stem Cells. *Neurochemical Research*, 27(11)1507–1512.

Liu Y, Li R, Ladisch S (2004) Exogenous gangliosides GD1a enhances epidermal growth factor receptor binding and dimerization, *J. Biol. Chem.* 279 (35) 36481–36489.

Liu Y, McCarthy J, Ladisch S (2006) Membrane ganglioside enrichment lowers the threshold for vascular endothelial cell angiogenic signaling. *Cancer Res.* 66(21) 10408-14.

Liu Y, Su Y, Wiznitzer M, Epifano O, Ladisch S (2008) Ganglioside depletion and EGF responses of human GM3 synthase-deficient fibroblasts. *Glycobiology*, 18(8) 593-601.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*, 25(4):402-408.

Lommerse PHM, Spaink HP, Schmidt T (2004) In vivo plasma membrane organization: results of biophysical approaches. *Bioch Biophys Acta* 1664, 119-131.

Maccioni HJF, Daniotti JL, Martina JA (1999) Organization of ganglioside synthesis in the Golgi apparatus. *Biochim. Biophys Acta* 1437, 101-118.

Marguet D, Lenne PF, Rigneault H, He HT (2006). Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order. *EMBO J.* 25 (15):3446-57. Review.

Metcalf D (1993) Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety? *Blood* 82 3515-3523.

Milani S, Sottocornola E, Zava S, Berzelli P (2007) Ganglioside GM3 is stably associated to tyrosine-phosphorylated ErbB2/EGFR receptor complexes and EGFR monomers, but not to ERBB2. *BBA* 1771: 873-878.

Militi S, Riccioni R, Parolini I, Sposi NM, Samoggia P, Pelosi E, Testa U, Peschle C (2000) Expression of interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor common chain β_c , β_{IT} in normal haematopoiesis: lineage specificity and proliferation-independent induction. *Br J Haematol*, 111(2):441-51.

Miljan EA, Bremer EG (2002) Regulation of growth factor receptors by gangliosides, *Sci. STKE* 160, Review.

Miyajima A, Kitamura T, Harada N, Yokota T, Arai K (1992) Cytokine receptors and signal transduction. *Annu Rev Immunol*, 10:295-331. Review.

Mitsuda T, Furukawa K, Fukumoto S, Miyazaki H, Urano T (2002) Overexpression of ganglioside GM1 results in the dispersion of platelet-derived growth factor receptor from glycolipid-enriched microdomains and in the suppression of cell growth signals. *J Biol Chem*, 277(13):11239-11246

Momoi T, Shinmoto M, Kasuya J, Senoo H, Suzuki Y (1986) Activation of CMP-N-acetylneuraminic acid:lactosylceramide sialyltransferase during the differentiation of HL-60 cells induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *J Biol Chem*. 5;261(34):16270-3.

Moore MA, Shieh JH, Lee G (2006) Hematopoietic cells. *Methods Enzymol*. 418 208-42.

Mukherjee S, Maxfield FR (2004) Membrane domains. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 20:839-66.

Munro S (2003) Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell*. 14 (2003) 377-88.

Nakamura M, Kirito K, Yamanoi J, Wainai T, Nojiri H, Saito M (1991) Ganglioside GM3 can induce megakaryocytoid differentiation of human leukemia cell line K562 cells. *Cancer Res* 51(7):1940-1945.

Nakamura M, Tsunoda A, Sakoe K, Gu J, Nishikawa A, Taniguchi N, Saito M (1992) Total metabolic flow of glycosphingolipid biosynthesis is regulated by UDP-GlcNAc:lactosylceramide β 1 \rightarrow 3N-acetylglucosaminyltransferase and CMP-NeuAc:lactosylceramide alpha 2 \rightarrow 3 sialyltransferase in human hematopoietic cell line HL-60 during differentiation. *J Biol Chem*, 267(33):23507-23514.

Nakamura M, Kuroiwa N, Kono Y, Takatsuki A (2001) Glucosylceramide synthase inhibitors block pharmacological induced dispersal of the Golgi anterograde membrane flow from the endoplasmic reticulum: implication of sphingolipid metabolism in maintenance of the golgi architecture and anterograde membrane flow. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 65 (6) 1369-1378.

Orkin SH (2000) Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet*. 1(1) 57-64.

Park LS, Martin U, Sorensen R, Luhr S, Morrissey PJ, Cosman D, Larsen A (1992) Cloning of the low-affinity murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor and reconstitution of a high-affinity receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(10):4295-9.

Pelley JL, Nicholls CD, Beattie TL, Brown CB: Discovery and characterization of a novel splice variant of the GM-CSF receptor alpha subunit. *Exp Hematol* 2007, 35(10):1483-1494.

Peterson GL (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem*, 83(2):346-356.

Pike LJ (2006) Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res.* 47, 1597-8.

Prevost JM, Pelley JL, Zhu W, D'Egidio GE, Beaudry PP, Pihl C, Neely GG, Claret E, Wijdenes J, Brown CB (2002) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and inflammatory stimuli up-regulate secretion of the soluble GM-CSF receptor in human monocytes: evidence for ectodomain shedding of the cell surface GM-CSF receptor alpha subunit. *J Immunol* , 169(10):5679-5688.

Rane SG, Reddy EP (2002) JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis. *Oncogene*, 13;21(21):3334-58. Review.

Rosas M, Gordon S, Taylor PR (2007) Characterisation of the expression and function of the GM-CSF receptor α -chain in mice. *Eur J Immunol*, 37(9):2518-2528.

Rosmarin AG, Yang Z, Resendes KK (2005) Transcriptional regulation in myelopoiesis: Hematopoietic fate choice, myeloid differentiation, and leukemogenesis. *Exp Hematol.* 33(2):131-43. Review.

Rusnati M, Tanghetti E, Urbinati C, Tulipano G, Marchesini S, Ziche M, Presta M (1999) Interaction of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) with free gangliosides: biochemical characterization and biological consequences in endothelial cell cultures. *Mol Biol Cell*, 10(2):313-327.

Rusnati M, Urbinati E, Tanghetti E, Dell'Era P, Lortat-Jacob H, Presta M (2002) Cell membrane GM1 ganglioside is a functional coreceptor for fibroblast growth factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 4367-4372.

Schofield R (1983) The stem cell system. *Biomed Pharmacother.* 37(8) 375-80. Review.

Sebollela A, Cagliari TC, Limaverde GS, Chapearouge A, Sorgine MH, Coelho-Sampaio T, Ramos CH, Ferreira ST (2005) Heparin-binding sites in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor *J Biochem* 9;280(36):31949-56.

Shaw AS (2006). Lipid rafts: now you see them, now you don't.. *Nat Immunol.* 7(11):1139-42. Review.

Sietsma H, Nijhof W, Dontje B, Vellenga E, Kamps WA, KOK JW (1998) Inhibition of hemopoiesis in vitro by neuroblastoma-derived gangliosides. *Cancer Research*, 58, 4840-4844.

Silvius J (2005) Lipid microdomains in model and biological membranes: how strong are the connections? *Q Rev Biophys.* 38, 373-83.

Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569-572.

Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nature reviews* 1, 31-39.

Simons K, Vaz WL (2004) Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.*, 33:269-95.

Simons M, Friedrichson T, Schulz JB, Pitto M, Masserini M, Kurzchalia TV (1999) Exogenous administration of gangliosides displaces GPI-anchored proteins from lipid microdomains in living cells. *Mol. Biol. Cell.* 10, 3187–3196.

Smolenska-Sym G, Szychalska J, Zdebska E, Wozniak J, Traczyk Z, Pszenna E, Maj S, Danikiewicz W, Bienkowski T, Koscielak J (2004) Ceramides and glycosphingolipids in maturation process: leukemic cells as an experimental model. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 33(1): 68-76.

Soninno S, Mauri L, Chigorno V, Prinetti A (2006) Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology.* 17 (1) 1-13.

Suh HC, Gooya J, Renn K, Friedman AD, Johnson PF, Keller JR (2006) C/EBP α determines hematopoietic cell fate in multipotential progenitor cells by inhibiting erythroid differentiation and inducing myeloid differentiation. *Blood.* 1;107(11):4308-16.

Svennerholm, L (1956) Composition of gangliosides from human brain. *Nature* v.177, p524-52.

Svennerholm L (1957) Quantitative estimation of sialic acids a colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method, *Biochim. Biophys. Acta* 24, 604–611

Svennerholm, L (1963) Chromatographic separation of human brain gangliosides. *J. Neurochem.* 10, 613±623

Tavernier J, Van der Heyden J, Verhee A, Brusselle G, Van Ostade X, Vandekerckhove J, North J, Rankin SM, Kay AB, Robinson DS (2000) Interleukin 5 regulates the isoform expression of its own receptor α -subunit. *Blood* 95(5):1600-1607.

Tettamanti G, Bassi R, Viani P, Riboni L (2003) Salvage pathways in glycosphingolipid metabolism. *Biochimie*, 85, 423-437. Review.

Tettamanti G. (2004) Ganglioside/glycosphingolipid turnover: new concepts. *Glyconj. J.* 20, 301-317, Review.

Varki A, Cummings, R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J (1999) Essentials of glycobiology. Ed. Cold Spring Harbor.

Venkateshiah SB, Thamssen MJ, Kavuru MS (2004) Pulmonary alveolar proteinosis. Clinical manifestations and optimal treatment strategies. *Treat Respir Med.* 3(4):217-27

Yanagisawa M, Nakamura K, Tetsuya T (2005) Glycosphingolipid synthesis inhibitor represses cytokine-induced activation of the Ras-MAPK pathway in embryonic neural precursor cells. *J. Biochem,* 138, 285-291.

Yoon SJ, Nakayama K, Hikita T, Handa K, Hakomori SI (2006) Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase is modulated by GM3 interaction with N-linked GlcNAc termini of the receptor. *Proc Natl Acad Sci.* 12, 103(50):18987-91.

Wettrich A, Sebollela A, Carvalho MA, Azevedo SP, Borojevic R, Ferreira ST, Coelho-Sampaio T (1999) Acidic pH modulates the interaction between human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and glycosaminoglycans. *J Biol Chem* 274(44):31468-31475.

Williams MA, McCluer RH (1980) The use of Sep-Pak C18 cartridges during the isolation of gangliosides. *J Neurochem,* 35(1):266-269.

Wilson A, Trumpp, A (2006) Bone-marrow haematopoietic stem-cell niches. *Nat Rev Immunology,* 6 93-106

Zeller, CB, Marchase RB (1992) Gangliosides as modulators of cell function. *The American Physiological Society,* 262, 1341-1355, Review.

Ziulkoski AL, Andrade CM, Crespo PM, Sisti E, Trindade VM, Daniotti JL, Guma FC, Borojevic R (2006) Gangliosides of myelosupportive stroma cells are transferred to myeloid progenitors and are required for their survival and proliferation. *Biochem J,* 394(Pt 1):1-9.

Zurita, AR, Maccioni HJ, Daniotti, JL (2001) Modulation of epidermal growth factor receptor phosphorylation by endogenously expressed gangliosides. *Biochem. J.* 355, 465-72.

Zurita AR, Crespo PM, Koritschoner NP, Daniotti JL (2004) Membrane distribution of epidermal growth factor receptors in cells expressing different gangliosides. *Eur. J. Biochem.* 271, 2428-2737.

ANEXO 1 – LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura química de alguns gangliosídeos.	5
Figura 2 – Biossíntese das séries <i>o</i> , <i>a</i> , <i>b</i> e <i>c</i> de gangliosídeos.	7
Figura 3 – Esquema ilustrativo das vias de síntese, degradação e turnover de gangliosídeos.	8
Figura 4 – Modelo esquemático de um <i>raft</i> lipídico composto de esfingolipídios, colesterol e proteínas.	10
Figura 5 – Esquema ilustrativo dos modelos propostos para modulação de gangliosídeos na sinalização de fatores de crescimento.	12
Figura 6 – Esquema ilustrativo da diferenciação hematopoiética.	14
Figura 7 – Esquema ilustrativo do nicho hematopoiético na medula óssea.	15
Figura 8 – Representação esquemática das vias de sinalização ativadas pelos receptores de IL-3, IL-5 e GM-CSF de diferentes tipos celulares.	17

CAPITULO 1

Figure 1 – Induction of FDC-P1 cell proliferation.	45
Figure 2 – GD1a and GM3, but not GM1 enhance FDC-P1 proliferative response to GM-CSF.	46
Figure 3 – Cell proliferation during ganglioside synthesis inhibition.	47
Figure 4 – Effect of ganglioside exogenous addition on GM-CSF-induced proliferation in D-PDMP pretreated cells.	48
Figure 5 – Sucrose density gradient analysis of GMR and ganglioside distribution in FDC-P1 cells.	49
Figure 6 – Subcellular location of Gd1a, GM3, GMR α and β c in FDC-P1 cells.	50

CAPÍTULO 2

Figura 1 – Caracterização de GMR α murina.	54
Figura 2 – Análise da fosforilação de β c em células FDC-P1 estimuladas com GM-CSF.	61
Figura 3 – Efeito do gangliosídeo GD1a na ativação de GMR (β c).	61

Figura 4 – Adição exógena de gangliosídios aumenta a ativação de (ERK1/2) por GM-CSF.	63
Figura 5 – Expressão relativa de C/EBP α no tratamento com diferentes gangliosídios qRT-PCR.	64
Figura 5 – Identificação da expressão das isoformas tmGMR α , solGMR α , mas não delGMR α nas células tratadas com GMCSF por RT-PCR.	65
Figura 6 – Identificação específica das isoformas tmGMR e solGMR nas células tratadas com GMCSF por RT-PCR.	66
Figura 7 – Expressão relativa das isoformas tmGMR α e solGMR α no tratamento com diferentes gangliosídios qRT-PCR.	66

ANEXO 2 – LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1. Densitometric analysis of metabolically labeled gangliosides from FDC-P1 cells treated or not with D-PDMP

CAPÍTULO 2

Tabela 2. Primers utilizados para amplificação dos repectivos cDNAs