

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**Papel dos gangliosídios de células estromais sobre a proliferação e
sobrevivência de células precursoras mielóides**

Ana Luiza Ziulkoski

**Orientador: Prof. Dr. Radovan Borojevic
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Fátima T.C.R. Guma**

Tese de doutorado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas –
Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica.

**Porto Alegre
2006**

Ao Arthur, meu filho, meu sonho
Ao Günther, meu porto seguro

“Aproveite tudo que puder a cada hora, cada dia e cada época da vida.
Assim você poderá olhar para frente com confiança e para trás sem ressentimentos.
Seja você mesmo, mas dê o melhor de você.
Atreva-se a ser diferente e seguir sua própria estrela...
E nunca tenha medo de ser feliz!”

AGRADECIMENTOS

Ao professor Radovan Borojevic, pela orientação, pelo exemplo, pela oportunidade.

A Fátima, pela orientação, pela amizade, pela confiança, pela paciência e pelos dez anos de convivência.

A Vera (Trindade), por um dia ter me catado no corredor do antigo Biociências pra me falar da bolsa de monitoria com a Fátima, a qual fez tudo começar. Obrigada também pelas dicas, pela força e por Córdoba.

Ao professor José Luiz Daniotti, pelo período que passei em seu laboratório, pelas discussões dos resultados, pela ótima crítica e pelas idéias.

Ao Laboratório de Imunogenética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo empréstimo da citocentrífuga.

A professora Elena, pela disposição em ajudar a esclarecer as dúvidas químicas protocolo.

A Cláudia, incansável, prestativa, companheira, amiga. Obrigada pela presença, pelos papos, pelos cafezinhos, pela ajuda inestimável e por ensinar tudo que sabes de gangliosídeos.

A Pilar, pelo companheirismo, pelo auxílio, pela dedicação com as imagens e por tornar meus dias em Córdoba mais fáceis.

A Elisa, meu braço direito, por sua preciosa colaboração e por sobreviver ao meu jeito “faz duas coisa ao mesmo tempo” de trabalhar.

A Ju e a Mari, por todo o auxílio no início desta jornada.

A Gis, pela colaboração com os meios e manutenção das células. A Lica, pela ajuda nos experimentos finais. Ao Dudu, pelos “chimas” e aos demais bolsistas do Lab 21 pela convivência.

A Dona Lia, cujo trabalho é essencial para que o nosso ande bem. Obrigada pelo bom humor e pela prestatividade.

A Cléia, pelo sorriso gentil e pela ajuda com os problemas burocráticos.

Às minhas culturas de células, como prometido.

Aos colegas da Farmácia Escola da Feevale, especialmente a Ane, Eliane, Letícia e Paola, por compartilharem das preocupações nos últimos dois anos deste trabalho.

Aos meus pais e ao meu irmão, pelo carinho, pelo apoio e pelo interesse.

À minha vó Marietinha, que mesmo sem fazer idéia do que é uma tese de doutorado, se preocupava em saber quando eu iria terminar.

Ao Günther, por ouvir meus desabafos, por suportar minhas ausências e entender que culturas de células precisam de cuidados quase que diários.

APRESENTAÇÃO

Esta tese encontra-se apresentada no formato de artigos científicos e organizada da seguinte forma:

PARTE I

Introdução, contendo uma revisão da literatura sobre os aspectos que fundamentaram este trabalho.

Objetivos gerais e específicos do trabalho.

PARTE II

Capítulo 1, contendo artigo científico publicado em periódico internacional.

Capítulo 2, contendo dados complementares do artigo científico já publicado.

Capítulo 3, contendo manuscrito a ser submetido.

Capítulo 4, contendo dados preliminares.

PARTE III

Discussão, contendo uma interpretação geral dos resultados apresentados nos diferentes capítulos, além da conclusão final.

Perspectivas originadas a partir deste trabalho.

REFERÊNCIAS

Referências bibliográficas citadas nas Partes I e III.

ANEXOS

Anexo 1, contendo a lista de figuras.

Anexo 2, contendo a lista de tabelas.

ÍNDICE

PARTE I

RESUMO.....	2
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
INTRODUÇÃO.....	5
1. Gangliosídios	5
1.1. Gangliosídios e receptores.....	8
1.2. Gangliosídios e hematopoiese	9
1.3. Glicosinapses.....	11
2. Rafts.....	12
3. Hematopoiese	15
3.1. O GM-CSF	17
OBJETIVOS.....	19
1. Objetivos específicos.....	20

PARTE II

CAPÍTULO 1	22
CAPÍTULO 2	32
CAPÍTULO 3	49
CAPÍTULO 4	76

PARTE III

DISCUSSÃO.....	87
PERSPECTIVAS	96
REFERÊNCIAS	97
ANEXO 1 – Lista de figuras	107
ANEXO 2 – Lista de tabelas	109

PARTE I

RESUMO

A mielopoiese depende do estroma mielossuportivo tanto no que diz respeito a produção de fatores de crescimento como de proteoglicanos de heparan-sulfato. O ambiente intercelular formado entre células do estroma e células progenitoras mielóides possui características ácidas, conferidas por moléculas carregadas negativamente e sensíveis a sialidase. Gangliosídios, glicoesfingolípídios contendo pelo menos uma molécula de ácido siálico, têm sido relacionados à modulação de fatores de crescimento e à diferenciação de células hematopoiéticas. Neste trabalho, estudamos a produção, a distribuição e o papel dos gangliosídios em um modelo experimental *in vitro* de mielopoiese dependente do estroma derivado de fígado fetal murino AFT-024. Utilizamos como sistema de resposta para o monitoramento da disponibilidade e atividade local de GM-CSF a linhagem celular precursora mielóide FDC-P1, a qual é dependente de GM-CSF para sua sobrevivência e proliferação. O GM3 foi o principal gangliosídio produzido pelo estroma, mas não pelas células mielóides, sendo requerido para que a função mielossuportiva do estroma seja ótima. Este gangliosídio foi liberado para o sobrenadante de cultura das células AFT-024 e seletivamente incorporado pelas células progenitoras mielóides, onde foi segregado em *rafts* e colocalizou-se com a cadeia α do receptor de GM-CSF. Além disso, o gangliosídio GM3 foi encontrado na fração insolúvel de células AFT-024 tratadas com Triton X-100 a 4°C, estando presente também nas frações menos densas do fracionamento em gradiente de sacarose, indicando sua presença em *rafts*. O GM3 captado pelas células FDC-P1 foi metabolizado, gerando gangliosídios das séries *a* e *b*, da mesma forma que o GM3 endógeno. Nestas células, o GM1 é o principal gangliosídio, também sendo encontrado na interface entre estroma e células mielóides, mas com colocalização apenas parcial com a cadeia α do receptor de GM-CSF. As imagens de imunocitoquímica ainda revelaram que o GM1 não apresenta colocalização significativa com a cadeia β do receptor de GM-CSF, com o gangliosídio GM3, ou com CD44. Em um outro grupo de experimentos, analisamos o perfil de síntese e *shedding* de gangliosídios em um estroma derivado de medula óssea, a linhagem celular S17; na linhagem celular GRX, derivada de células estreladas hepáticas isoladas de reação fibro-granulomatosa inflamatória; e em cultivos primários de fibroblasto de pele murinos. Além disso, comparamos a habilidade destes estromas para sustentar a sobrevivência e a proliferação das células precursoras mielóides. A concentração de ácido siálico reflete a capacidade mielossuportiva dos estromas. Embora os diferentes estromas sintetizem os mesmos gangliosídios, existem diferenças no conteúdo relativo de cada gangliosídio. Aparentemente, o GM3 é o principal gangliosídio envolvido na modulação da atividade dos fatores de crescimento. O *shedding* foi similar ao perfil de síntese de gangliosídios, mas a atividade mielossuportiva dos sobrenadantes foi diferente entre os tipos celulares e em relação a sustentação por contato. No entanto, a proliferação das células FDC-P1 diminuiu em todos os sobrenadantes obtidos de células estromais em que a síntese de gangliosídios foi inibida e onde o gangliosídio GM3 foi neutralizado pelo anticorpo monoclonal anti-GM3. As diferenças encontradas na capacidade de sustentação da proliferação de células progenitoras mielóides por fator de crescimento solúvel ou apresentado podem estar relacionadas a diferenças na concentração de gangliosídios inseridos na membrana plasmática ou liberados para o meio de cultura. Sendo assim propomos que as células do estroma mielossuportivo produzem e secretam os fatores de crescimento necessários e seus cofatores, tais como proteoglicanos de heparan-sulfato. O estroma também fornece gangliosídios, os quais são transferidos do estroma para as células-alvo, onde geram domínios de membrana específicos contendo complexos macromoleculares que incluem os receptores para fatores de crescimento.

ABSTRACT

Stroma-mediated myelopoiesis depends upon myelosupportive stroma required production of growth factors and heparan-sulfate proteoglycans, as well as generation of negatively-charged sialidase-sensitive intercellular environment between the stroma and the myeloid progenitors. Gangliosides, sialic acid-containing glycosphingolipids had been related to modulation of growth factors receptors and differentiation of hematopoietic cells. Here we studied production, distribution and role of gangliosides in the experimental model of *in vitro* myelopoiesis dependent upon AFT-024 murine fetal liver-derived stroma. We used the FDC-P1 cell line that is dependent upon GM-CSF for both survival and proliferation as a reporter system to monitor bioavailability and local activity of GM-CSF. GM3 was the major ganglioside produced by stroma, but not by myeloid cells, and it was required for the optimal stroma myelosupportive function. It was released into the supernatant and selectively incorporated into the myeloid progenitor cells, where it segregated into *rafts* in which it co-localized with the GM-CSF receptor α chain. Indeed, this ganglioside was found into insoluble fraction of Triton X-100 treatment at 4°C and into buoyant sucrose gradient fractions. The GM3 uptaken was also further metabolized by myeloid cells into gangliosides of the *a* and *b* series, similar to the endogenous GM3. In these cells, GM1 was the major ganglioside, and it was segregated at the interface by stroma and myeloid cells, partially colocalizing with the GM-CSF receptor α chain. In addition, the ganglioside GM1 showed none significant co-localization with ganglioside GM3, GM-CSF receptor β chain or CD44. Moreover, we analyzed the pattern cell production and shedding of gangliosides in a S17 bone marrow stroma, a murine hepatic stellate cell line derived from inflammatory fibrogranulomatous reactions that sustain myelopoiesis (GRX cell line) and primary skin fibroblasts, and compared the ability of these stromata to sustain the survival and proliferation of the myelopoietic progenitor cells. The concentration of sialic acid reflects the myelosupportive capacity of the studied cell stromas. Although the stromal cells synthesize the same gangliosides their relative content were quite different and GM3 being apparently the major ganglioside species involved for optimal activity of the growth factors. The shedding was similar to the ganglioside synthesis pattern, but the net myelosupportive activity was quite different. FDC-P1 proliferation decreased in stroma cells supernatants obtained from cultures in which ganglioside synthesis was inhibited, as well as in presence of supernatants in which GM3 was neutralized by the anti-GM3 monoclonal antibody. Then, the differences in the capacity of sustain myeloid cell proliferation by presented or soluble growth factor could be related to differences in the concentration of gangliosides present in membrane or shed to supernatants. We conclude that myelosupportive stroma cells produce and secrete the required growth factors, the cofactors such as heparan-sulfate proteoglycans, and also supply gangliosides that are transferred from stroma to target cells, generating on the latter ones specific membrane domains with molecular complexes that include growth factor receptors.

LISTA DE ABREVIATURAS

EGF, epidermal growth factor
EGFR, epidermal growth factor receptor
FAK, focal adhesion kinase
FBS, fetal bovine serum
FGF, fibroblast growth factor
FGFR, fibroblast growth factor receptor
GalNAc-T, UDP-GalNAc:LacCer/GM3/GD3/GT3 *N*-acetylglucosaminyltransferase
Gal-T, UDP-Gal:glucosylceramide galactosyltransferase
GEMs, glycosphingolipid-enriched microdomains
GlcCer, glucosylceramide
GM-CSF, granulocyte-macrophage colony stimulator factor
GM-CSFR, granulocyte-macrophage colony stimulator factor receptor
GPI, glycosylphosphatidylinositol
GSLs, glycosphingolipids
HPTLC, high performance thin layer chromatography
HSPGs, heparan-sulphate proteoglycans
IL-3, interleukin-3
IL-5, interleukin-5
MAP, mitogen-activated protein
MAPK, mitogen-activated protein kinase
NBD, *N*-(7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-ceramide
PBS, phosphate buffered solution
PDGF, platelet-derived growth factor
PDMP, D,L-threo-1-phenyl-2-decanoilamino-3-morpholino-1-propanol
SCF, stem cell factor
Sial-T1, CMP-NeuAc:lactosylceramide sialyltransferase
Sial-T2, CMP-NeuAc:GM3 sialyltransferase
Sial-T3, CMP-NeuAc:GD3 sialyltransferase
SFB, serum fetal bovine
TIFF, Triton X-100 insoluble floating fraction

INTRODUÇÃO

1. Gangliosídios

Os gangliosídios, glicosíngolípídios complexos contendo pelo menos um resíduo de ácido siálico, foram descobertos por Ernst Klenk (1942) e nomeados com base em seu isolamento e altas concentrações em algumas células. No entanto, a nomenclatura comumente utilizada foi proposta por Svennerholm (1956; 1963) e fundamenta-se no número de ácidos siálicos presentes na molécula e na sua mobilidade cromatográfica, condizente com a complexidade estrutural dos gangliosídios (Figura 1). Essas moléculas pertencem a grande e heterogênea família dos glicolípídios e participam da constituição das membranas celulares, estando enriquecidos na membrana plasmática. Encontram-se embebidos na face extracitoplasmática destas membranas através de sua porção ceramida e expõem a porção hidrofílica contendo carboidrato para o lado extra-citoplasmático (Maccioni *et al.*, 1999).

A síntese de novo dos gangliosídios se inicia na face citossólica do Golgi proximal com a geração de glicosilceramida (GlcCer) (Figura 2). Ocorrem então adições sequenciais de unidades de oses a uma molécula de GlcCer, catalisadas por glicosiltransferases ligadas à membrana, ainda no Golgi proximal. Diferentes sialiltransferases (Sial-T1, Sial-T2/Sial-T3) são responsáveis pela geração dos gangliosídios GM3, GD3 e GT3. Estes três gangliosídios são convertidos nos diferentes constituintes das séries ganglio *a*, *b* e *c*, respectivamente. Essas reações de glicosilação, também, são sequenciais e catalisadas pelas enzimas GalNAc-T e Gal-T, formando os intermediários das séries *o*, *a*, *b* e *c* (Maccioni *et al.*, 1999). Além da síntese de novo dos gangliosídios, a reciclagem desses compostos através do transporte

retrogrado de endossomas para o complexo de Golgi também tem sido bem documentada. As rotas de reciclagem predominam em células que se dividem lentamente, enquanto a síntese de novo predomina nas células de multiplicação rápida (Gillard *et al.*, 1998).

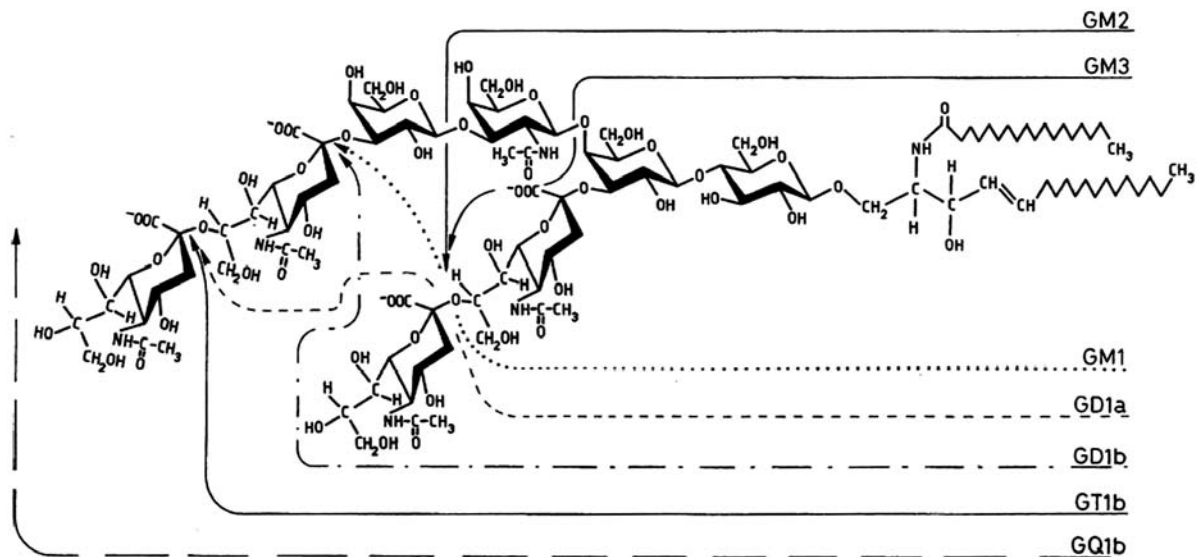


Figura 1. Estrutura química de alguns gangliosídeos. O gangliosídeo em detalhe corresponde ao gangliosídeo GM1. O quadro ilustra a estrutura de diferentes gangliosídeos. A nomenclatura de Svennerholm é utilizada: G, gangliosídeo; M, monosialo; D, disialo; T, trisialo. A porção carboidrato consiste dos seguintes carboidratos: glicose, galactose, *N*-acetilgalactosamina, ácido *N*-acetilneuramínico ou ácido siálico. A porção ceramida é composta de esfingosina unida por uma ligação amida a um ácido graxo, geralmente ácido esteárico (18:0) ou ácido palmítico (16:0). Adaptado de Tettamanti (2004).

Esses glicosfingolipídios têm sido relacionados à regulação da adesão, à proliferação e à diferenciação celular, bem como a processos de progressão tumoral, a imunossupressão e ao aparecimento de resistência a múltiplas drogas (Hakamori, 1981; Sietsma *et al.*, 1998). Os gangliosídeos foram os primeiros antígenos descritos como associados a tumores. Além disso, modificações na composição celular de gangliosídeos têm sido relacionadas com alterações na proliferação celular. De fato, além de seu papel estrutural na organização da membrana plasmática, essas moléculas têm sido implicadas na regulação dos processos de sinalização mediados por fatores de crescimento (Miljan & Bremer, 2002).

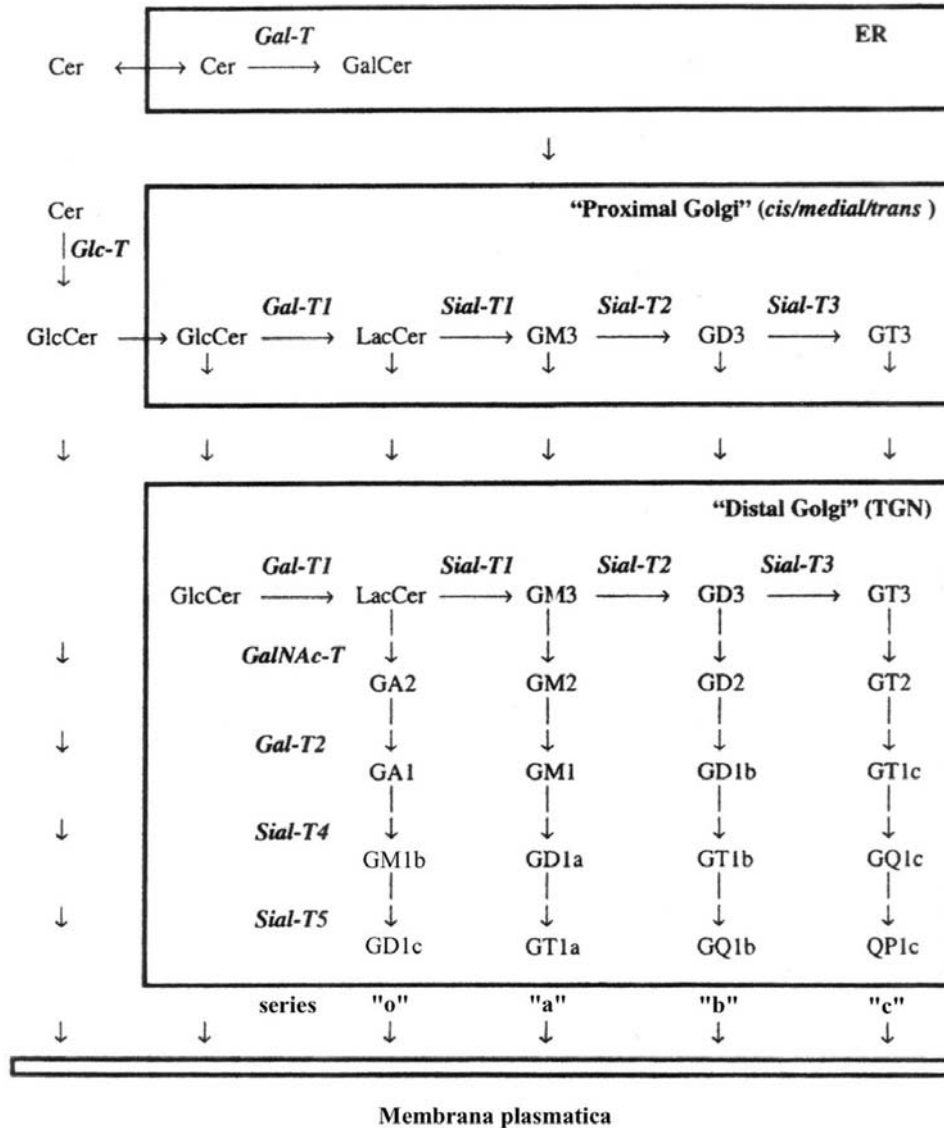


Figura 2. Representação esquemática da síntese de gangliosídeos. Os passos ilustrados dentro dos retângulos representam reações ligadas à membrana e que ocorrem na face luminal, cujos produtos se deslocam para a membrana plasmática por transporte vesicular. Os passos ilustrados fora dos retângulos representam reações ligadas à membrana que ocorrem na face citosólica dos compartimentos membranares do Golgi, cujos produtos se deslocam para a membrana plasmática por transporte não-vesicular. Glc-T, UDP-Glc:ceramida glicosiltransferase; Gal-T1, UDP-Gal:glicosilceramida galactosiltransferase; GalNAc-T, UDP-GalNAc:LacCer/GM3/GD3/GT3 *N*-acetilgalactosamiltransferase; Sial-T1, CMP-NeuAc:lactosilceramida sialiltransferase; Sial-T2, CMP-NeuAc:GM3 sialiltransferase; Sial-T3, CMP-NeuAc:GD3 sialiltransferase; Sial-T4, CMP-NeuAc:GA1/GM1/GD1b/GT1c sialiltransferase; Sial-T5, CMP-NeuAc:GM1b/GD1a/GT1b:GQ1c sialiltransferase. Ainda é incerto se Sial-T2 e Sial-T3 sejam enzimas diferentes ou a mesma enzima. Os gangliosídeos estão nomeados segundo Svennerholm. ER, retículo endoplasmático, GlcCer, glicosilceramida; GalCer, galactosilceramida, LacCer, lactosilceramida. Adaptado de Maccioni e colaboradores (1999).

1.1. Gangliosídios e receptores

Uma série de trabalhos tem demonstrado a participação de gangliosídios nos fenômenos de adesão celular, geralmente, interferindo na ligação de moléculas de adesão aos receptores de integrina. Por exemplo, alguns trabalhos relatam que gangliosídios altamente sialilados, como GT1b, estão envolvidos na inibição da adesão celular de células epiteliais sobre fibronectina mediada pela integrina $\alpha_5\beta_1$ (Wang *et al.*, 2001b), enquanto o gangliosídio GM3 exerce regulação positiva sobre este receptor de integrina (Zheng *et al.*, 1993). Este mesmo gangliosídio promove a interação entre a integrina α_3 e a tetraspanina CD9 (Kawakami *et al.*, 2002), assim como a adesão de células de melanoma a células endoteliais parece ser um fenômeno dependente de GM3 (Song *et al.*, 1998).

Os gangliosídios também têm sido relacionados à regulação de receptores envolvidos com transdução de sinal. Nesse sentido, várias metodologias têm sido utilizadas para demonstrar os efeitos de gangliosídios sobre a atividade desses receptores, sendo que duas formas de abordagem experimental são bastante utilizadas: a adição de gangliosídios exógenos ao sistema em estudo e a manipulação da síntese endógena destes glicolípidios (Miljan & Bremer, 2002). A maioria dos trabalhos relata efeitos de gangliosídios sobre receptores de fatores de crescimento tipo tirosina quinase, com maior ênfase nos gangliosídios GM1 e GM3. No entanto, o gangliosídio GM1 já foi relacionado com a modulação de receptores tipo proteína G, como os receptores β_1 -adrenérgicos (Saito *et al.*, 1995).

Estudo realizado por Hynds e colaboradores (1995) relata a inibição da dimerização e da conseqüente autofosforilação do receptor de PDGF pelos gangliosídios GM1, GM2, GD3, GD1b e GT1b. Os vários trabalhos que relacionam o gangliosídio GM3 e o receptor de EGF também propõem a inibição da autofosforilação deste receptor, assim como a inibição da fosforilação de componentes da cascata de sinal subseqüente (Rebbaa *et al.*, 1996, Zurita *et al.*, 2001) e da ligação do receptor ao seu ligante (Wang *et al.*, 2001a). Além disso, o GM3

co-imunoprecipita com EGFR (Hanai *et al.*, 1988) e demonstra ter capacidade de ligar-se ao mesmo através de resíduos de carboidrato existentes no EGFR glicosilado (Wang *et al.*, 2001c).

O receptor de insulina, também, interage com o gangliosídeo GM3, podendo haver participação do GM3 no processo patológico de resistência à insulina presente no diabetes melito tipo 2 e na obesidade (Tagami *et al.*, 2002; Yamashita *et al.*, 2003). O excesso do gangliosídeo GM1, provavelmente, inibe o receptor de FGF por competição com o fator de crescimento, enquanto concentrações fisiológicas de GM1 podem auxiliar na ativação de FGFR (Miljan & Bremer, 2000). Nesse caso, o GM1 poderia estar atuando como um co-receptor, apresentando o FGF ao seu receptor de forma análoga ao descrito para os proteoglicanos de heparan sulfato (Rusnati *et al.*, 2002).

O conjunto destes trabalhos, principalmente, os que relatam a influência de gangliosídeos sobre os receptores de FGF, PDGF e EGF, culminou na proposição de três modelos mecanísticos para a ação de gangliosídeos sobre receptores: interação gangliosídeo-ligante, regulação da dimerização do receptor, e modulação da localização sub-celular e atividade do receptor (Miljan & Bremer, 2002). Estes modelos não são excludentes, ou seja, um determinado gangliosídeo pode estar atuando sobre um mesmo receptor por mais de uma forma.

1.2. Gangliosídeos e hematopoiese

A partir do conhecimento do potencial modulador de proliferação exercido por gangliosídeos presentes na superfície celular, Kaucic e colaboradores (1994) sugeriram que gangliosídeos liberados (*shedding*) por células tumorais poderiam contribuir para supressão da hematopoiese associada a tumores, podendo, também, estar associados com a hipoplasia da medula óssea, observada em certos processos malignos. Seus resultados mostraram que

moléculas mais complexas (GD1a, GD1b e GT1b) demonstram um maior potencial inibitório, indicando que os níveis de inibição estão relacionados à complexidade estrutural do gangliosídeo.

O tratamento *in vivo* ou *in vitro* de células de medula óssea com gangliosídios derivados de linfoma de Dalton resulta na inibição da capacidade proliferativa e da formação de colônias (Bharti & Singh, 2001). O tratamento dos extratos contendo esses gangliosídios com neuraminidase impede a sua ação inibitória sobre a medula óssea. Anticorpos contra GD3 e, em menor extensão, contra GM2, também, neutralizam os efeitos inibitórios dos gangliosídios derivados de linfoma de Dalton. Além disso, os efeitos inibitórios dos gangliosídios isolados de pacientes com leucemia linfoblástica aguda, na eritropoiese *in vitro* sugerem que a supressão hematopoiética *in vivo* deva ter origem nos gangliosídios presentes nas células tumorais, e que esses gangliosídios provavelmente sejam liberados tanto para o microambiente intercelular e como para o plasma. Sietsma e colaboradores (1999) mostraram que gangliosídios inibem a eritropoiese *in vitro* em vários estágios de diferenciação, através de um mecanismo que envolve a modulação da maturação de células eritróides.

Gangliosídios isolados do plasma de pacientes com neuroblastoma inibem tanto a eritropoiese quanto a mielopoiese normais em maior extensão do que os isolados do plasma de pacientes saudáveis (Sietsma *et al.*, 1998). A extensão da inibição parece depender da espécie e da quantidade total dos gangliosídios liberados. Na presença de gangliosídios exógenos, células imaturas hematopoiéticas humanas CD34(+), estimuladas por SCF e eritropoietina, diferenciam-se, predominantemente, para a linhagem mielóide ao invés da linhagem eritróide. Esta diferenciação é acompanhada por uma redução da capacidade proliferativa (Kawishima *et al.*, 1993).

Estudos, realizados com células da linhagem leucêmica multipotente K562, mostraram que o gangliosídeo GM3 tem papel crucial na diferenciação dessas células, aumentando a

diferenciação para megacariócitos induzida por éster de forbol e inibindo a diferenciação eritróide induzida por hemina (Nakamura *et al.*, 1991). Já, em células da linhagem HL-60, o GM3 está aumentado durante a diferenciação monocítica, enquanto gangliosídios da série neolacto estão enriquecidos durante a diferenciação granulocítica (Nakamura *et al.*, 1992).

1.3. Glicosinapses

Uma das possíveis funções descritas para os gangliosídios na superfície celular é a de fazer parte de sítios de identificação de interações célula-célula específicas. Células em diferentes estágios de diferenciação apresentam diferentes tipos de moléculas glicosiladas, as quais devem reconhecer moléculas complementares existentes na superfície das células com as quais devem interagir. As moléculas para reconhecimento de carboidratos podem ser proteínas (glicoproteínas ou lectinas endógenas), ou carboidratos idênticos (interação homotípica) ou carboidratos diferentes (interação heterotípica). Em 1991, Kojima e Hakamori sugeriram a interação célula-célula heterotípica como um novo sistema de reconhecimento, independente do bem conhecido sistema mediado por integrinas. De fato, durante o desenvolvimento e progressão tumoral, uma série de glicosfingolipídios (GSLs) têm sido identificada como moléculas reguladoras da adesão celular através deste tipo de interação (Varki, 1994; Song *et al.*, 1998).

Baseado nestes achados e nas descrições de GSLs, particularmente, gangliosídios, interagindo com receptores transmembranares e moléculas transdutoras de sinal envolvidas na adesão ou sinalização celular, Hakomori (2002) construiu o conceito de glicosinapses e propôs três arranjos moleculares para as mesmas. A glicosinapse tipo 1, corresponde a agregados de GSLs associados com transdutores de sinal citoplasmáticos e tetraspanina, com ou sem receptores de fatores de crescimento. A glicosinapse tipo 2, corresponde a microdomínios de membrana ricos em colesterol, contendo glicoproteínas transmembranares

tipo mucina com glicoepitopos *o*-ligados e associados a transdutores de sinal. Já, a glicosinapse tipo 3 constitui-se em microdomínios de membrana contendo receptores de adesão transmembranares *N*-glicosilados e complexados com tetraspanina e gangliosídios.

As funções dos GSLs como antígenos, mediadores da adesão celular ou moduladores da transdução de sinal, estão baseadas em sua organização na membrana (Hakomori, 2003). O microambiente formado na interface entre células que estão interagindo, como proposto nas glicosinapses, possui um papel central na definição de mudanças fenotípicas após a adesão celular, tais como as que ocorrem na progressão tumoral e no desenvolvimento ontogênico.

2. Rafts

Durante anos a bicamada lipídica da membrana plasmática de células eucarióticas foi considerada como uma estrutura bidimensional seguindo o modelo de mosaico fluído de Singer-Nicholson (1972). No entanto, inúmeras evidências apontam para a existência de pelo menos dois estados da bicamada lipídica: líquido-ordenado (L_o) e líquido-desordenado (L_d). Na fase líquida-ordenada, fosfolipídios saturados associam-se ao colesterol formando agregados, onde os lipídios encontram-se gelificados. Esses agregados encontram-se dispersos em uma matriz líquida-desordenada de glicerolipídios insaturados e conservam a capacidade de mover-se no plano da membrana (Wisniewska *et al.*, 2003).

O termo *lipid raft* (Simons & Ikonem, 1997) foi introduzido para referir-se a uma subpopulação de membranas celulares isoladas por sua característica de insolubilidade em detergentes não-iônicos, na temperatura de 4°C. Os *rafts* são enriquecidos em colesterol, esfingomiélin e glicolipídios, e sua densidade baixa faz com que flutuem em gradientes de sacarose (Figura 3). A utilização de diferentes metodologias para estudar os rafts gerou uma certa heterogeneidade na nomenclatura atual, a qual reflete a própria heterogeneidade desses microdomínios. Outros termos são utilizados para descrever o mesmo tipo de estrutura membranar, tais como domínios de GPI (glicosilfosfatidilinositol), TIFF (fração flutuante

insolúvel a Triton X-100) e GEMs (microdomínios enriquecidos em glicosfingolipídios). No entanto, é consenso que os *rafts* se diferenciam das cavéolas por não possuir caveolina como componente e não apresentarem invaginações da membrana em análises morfológicas (Simons & Toomre, 2000).

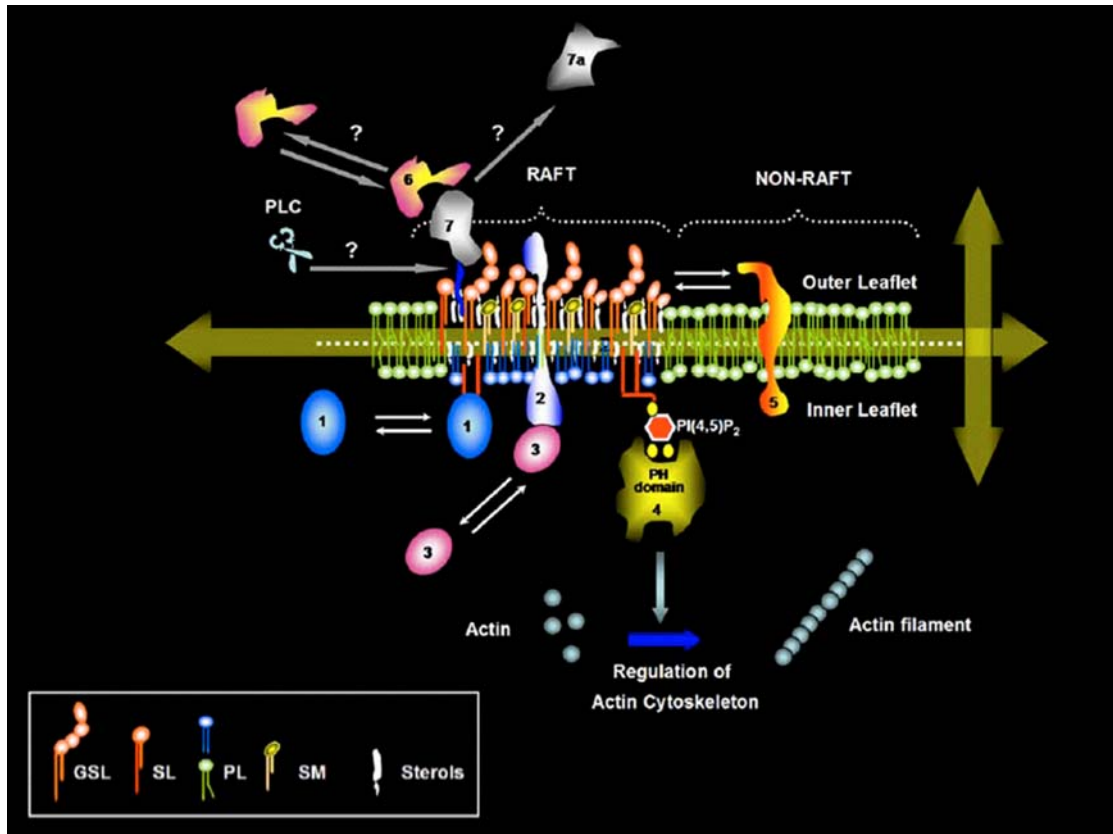


Figura 3. Esquema de um raft na membrana plasmática. O desenho representa um modelo de um raft biológico. As faces interna e externa de um raft possuem composição lipídica distinta enriquecida em glicosfingolipídios (GSL), esfingolipídios (SL), fosfolipídios saturados (PL), esfingomiéline (SM) e esteróis, como colesterol (mamíferos) e ergosterol (leveduras). Rafts são mais espessos do que o restante da bicamada e contém proteínas que se associam a eles por acilação (proteína 1), domínios transmembrana (proteína 2), interação proteína-proteína (proteína 3), interação lipídio-proteína (proteína 4) e ancoras de GPI (proteína 7). Algumas proteínas transmembranares (proteína 5) podem juntar-se aos rafts temporariamente. Setas duplas indicam associação supostamente reversível com o raft. É possível que proteínas ancoradas a GPI, como a proteína 7 do modelo, possam afastar-se da membrana após liberação da ancora, resultando em modificações conformacionais (proteína 7a). Também é possível que proteínas ancoradas a GPI possam carrear com elas proteínas do lúmen do retículo endoplasmático (proteína 6). O modelo descreve interações horizontais no plano da membrana entre alguns constituintes dos rafts e componentes não-rafts da membrana, e interações verticais entre certos constituintes membranares e a matriz extracelular ou o citoesqueleto subplasmalemal. Os dois tipos de constituintes membranares (lipídios e proteínas) podem engajar-se em cada uma dessas classes de interação molecular. Adaptado de Lucero e Robbins (2004).

Uma das mais importantes propriedades dos *rafts* é a sua capacidade de inclusão e exclusão de proteínas em extensão variável. A residência temporária de proteínas em *rafts* tem sido correlacionada com alterações na atividade dessas proteínas (Lucero & Robbins, 2004). É provável que as proteínas possam se associar aos *rafts* com diferentes coeficientes cinéticos e de partição. Proteínas com alta afinidade por *rafts* incluem proteínas ancoradas a GPI; proteínas com dupla acilação, como a família das Src quinases; subunidade α de proteínas G heterotriméricas; proteínas palmitoiladas e ligadas a colesterol, como a Hedgehog; e proteínas transmembranares, particularmente, aquelas palmitoiladas (Simons & Toomre, 2000).

A heterogeneidade lateral criada pelos *rafts* na membrana plasmática é acoplada à comunicação vertical entre os ambientes extra e intracelular (Lucero & Robbins, 2004). Pode-se considerar que os *rafts* formam plataformas de distribuição lateral de proteínas que se associam a eles, de forma a concentrar receptores isolados, ativados pela ligação do ligante respectivo (Hansen *et al.*, 2000). Além disso, acredita-se que o agrupamento de *rafts* expõe as proteínas a um novo ambiente, enriquecido em enzimas específicas, tais como quinases e fosfatases, palmitoilases e depalmitoilases. Dessa forma, pequenas modificações da partição em *rafts* poderiam, através de amplificação, iniciar cascatas de sinalização (Simons & Toomre, 2000).

Os gangliosídeos não apenas participam da composição dos *rafts*, uma vez que são glicoesfingolípídios, como alguns deles, tais como o gangliosídeo GM1, são considerados componentes típicos de *rafts* (Santos *et al.*, 2000; Millán *et al.*, 2001). A toxina colérica, a qual liga-se em GM1, e os anticorpos contra gangliosídeos têm sido utilizados para separar *rafts* de diferente composição em gangliosídeos (Miljan & Bremer, 2000), os quais podem estar associados a diferentes funções. Por exemplo, *rafts* enriquecidos em GM3 e em GM1 se distribuem em diferentes regiões de células polarizadas (Gómez-Moutón *et al.*, 2001; Giebel *et al.*, 2004). Rafts de GM1 têm sido associados ao CD44 e outras moléculas de adesão

(Gómez-Moutón et al., 2001). Por outro lado, existem trabalhos demonstrando que *rafts* de GM3 são enriquecidos em FAK, Src quinases e Rho GTPases (Yamamura *et al.*, 1997; Iwabuchi *et al.*, 1998; Chigorno *et al.*, 2000)

3. Hematopoiese

A hematopoiese corresponde a uma série de eventos de proliferação e diferenciação celular rigorosamente regulados, onde, células tronco totipotentes indiferenciadas originam todas as células sanguíneas (Figura 4). As células-tronco podem proliferar, formando novas células totipotentes (auto-renovação), ou seguir processos de diferenciação, originando células multipotentes, e posteriormente, células hematopoiéticas unipotentes, as quais ficam comprometidas com cada linhagem de células sanguíneas. O fenômeno hematopoiético compreende dois eventos distintos: a linfopoiese, responsável pela diferenciação e maturação das linhagens B e T; e a mielopoiese, a qual origina as demais células sanguíneas (Heyworth *et al.*, 1988).

Durante o período embrionário, a hematopoiese ocorre, inicialmente, na parede do saco vitelínico, deslocando-se, posteriormente, para a região para-aórtica, fígado e baço com o desenvolvimento fetal e, a partir do crescimento dos ossos longos e chatos, a medula óssea começa a produzir ativamente as células sanguíneas (Tavian *et al.*, 1999). Esta atividade continua no período pós-natal e durante a vida adulta, onde a hematopoiese é restrita à medula óssea situada no interior de ossos como esterno, ossos da pelve e do crânio (Zon, 1995). Porém, em algumas situações patológicas na vida adulta e, geralmente associadas a processos inflamatórios, a hematopoiese pode ocorrer em sítios extramedulares, especialmente no fígado e no baço (Borojevic *et al.*, 1993). Esse fato sugere que o estroma de tecidos conectivos possa substituir, pelo menos em parte, o estroma medular (Carvalho *et al.*, 2000).

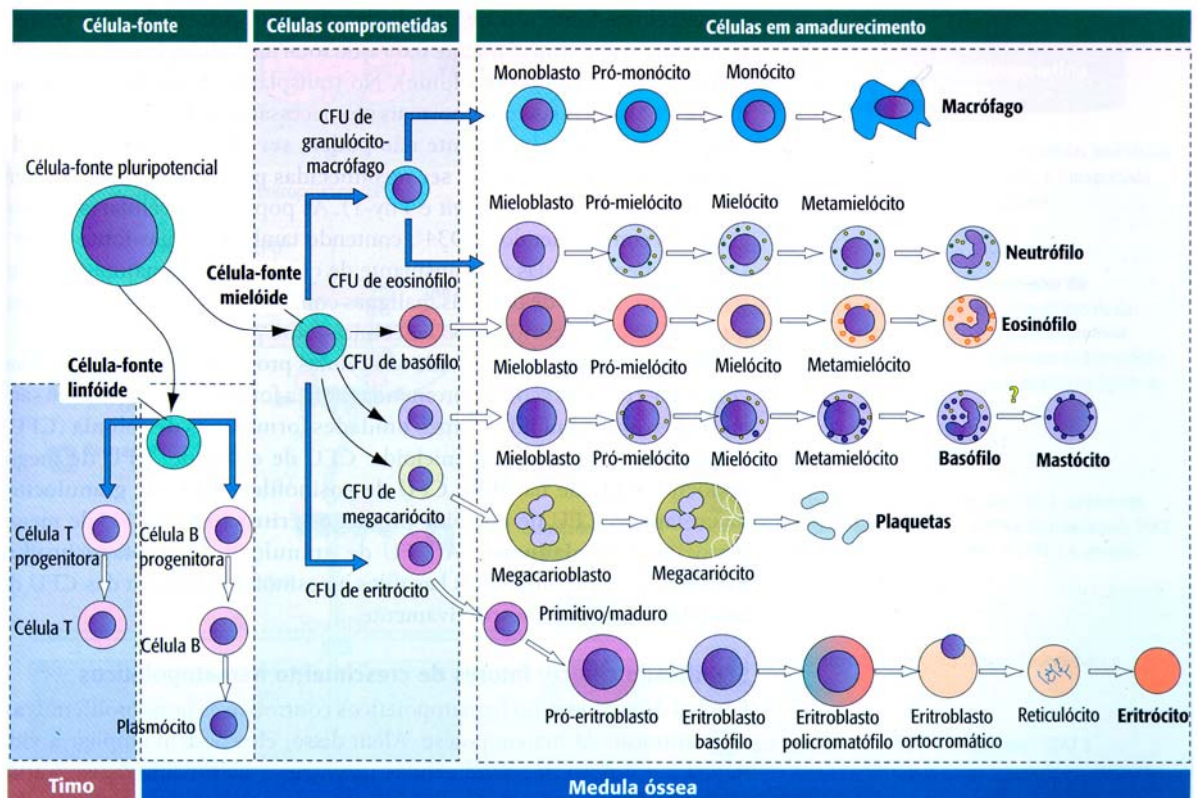


Figura 4. Esquema representativo da hematopoiese. Na medula óssea, encontramos as células pluripotentes capazes de auto-renovação (células-fonte), células progenitoras comprometidas com a linhagem linfóide ou mielóide (células progenitoras comprometidas) e células em diferenciação terminal (células em amadurecimento). As células precursoras de cada linhagem em diferenciação se originam das células formadoras de colônia (CFU). A célula-fonte mielóide origina as CFU responsáveis pela formação dos eritrócitos, das plaquetas, dos basófilos e dos eosinófilos. Os monócitos e os neutrófilos derivam de uma célula progenitora comprometida comum. A célula progenitora linfóide gera a progênie da célula B, na medula óssea e as progênies da célula T, no tímo (Kierszenbaum, 2004).

Para a manutenção da atividade hematopoiética é necessário um microambiente complexo na cavidade medular, formado por uma rede vascular especializada e por células estromais que sustentam a manutenção dos progenitores mielóides e linfóides (Zon, 1995). A regulação estrita da proliferação, do comprometimento e da diferenciação terminal dos precursores hematopoiéticos exige um matriz extracelular especializada e proteínas específicas, como fatores de crescimento e citocinas, as quais podem ser produzidas localmente ou atingir o sítio hematopoiético através da circulação sanguínea (Carvalho *et al.*, 2000). Cada estágio da proliferação e diferenciação das células sanguíneas depende da presença de um grupo apropriado de fatores de crescimento. O que torna um dado estroma capaz de sustentar ou não a produção de células sanguíneas é justamente a produção das citocinas requeridas (Metcalf,

1993) e a apresentação destes fatores às células-alvo em um contexto de ambiente intercelular apropriado (Allen *et al.*, 1990).

3.1. O GM-CSF

O GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos), a IL-3 (interleucina 3) e a IL-5 (interleucina 5) são hemopoiéticas centrais que controlam a proliferação, diferenciação e ativação das células mielóides na cascata hematopoiética. Além de suas funções na mielopoiese medular, GM-CSF e IL-5 também participam dos processos de reparo e regeneração tecidual (Holgate, 2000; Franzen *et al.*, 2004). O GM-CSF também está associado à regulação das células mielóides mais maduras das linhagens granulocítica e macrófágica, particularmente durante a defesa do hospedeiro e reações inflamatórias (Hamilton & Anderson, 2004).

A ativação crônica da produção de GM-CSF em tecidos lesados leva a reações exacerbadas, tais como proliferação e ativação de miofibroblastos e a formação de tecido granulomatoso e/ ou fibrótico (Desmoulière, *et al.*, 1995; Mann *et al.*, 2001). Trabalhos recentes apontam o GM-CSF como um participante-chave em doenças inflamatórias e auto-imunes (Fleetwood *et al.*, 2005). A expressão de GM-CSF também ocorre em muitas células tumorais, correlacionando-se à agressividade do tumor e à extensão da reação estromal peritumoral (Bretscher *et al.*, 2000). Sendo assim, o controle local da atividade de GM-CSF é relevante para a patofisiologia e evolução das reações teciduais em estados patológicos.

Apesar de não apresentar qualquer homologia significativa em seus genes, IL-3, IL-5 e GM-CSF exibem estruturas terciárias análogas, com um arranjo espacial formado por quatro alfa hélices (Lopez *et al.*, 1991). Estas hemopoiéticas atuam através de receptores tipo tirosina quinase que possuem cadeia α específica e cadeia β comum (Hamilton, 2002). Sendo assim, a

transdução de seus sinais possivelmente envolve a mesma cascata de sinalização, embora os componentes desta rota ainda não sejam totalmente compreendidos (Guthridge *et al.*, 2004).

Atualmente, propõe-se que a mielopoiese depende do estroma mielossuportivo tanto no que diz respeito à produção de fatores de crescimento e dos glicoconjugados pericelulares, quanto na geração de um microambiente entre estroma e progenitores mielóides. Sabe-se que para que a sinalização mediada por GM-CSF seja funcional é necessária a interação entre este fator e proteoglicanos de heparan-sulfato (HSPGs) e que estromas com diferentes capacidades de sustentação hematopoiética produzem diferentes proteoglicanos de heparan-sulfato (Alvarez Silva & Borojevic, 1996; Arcanjo *et al.*, 2002). Além disso, foi demonstrado que a interação entre as formas solúveis de GM-CSF e heparina depende das propriedades físico-químicas do ambiente, ocorrendo somente a valores de pH baixos, com níveis ótimos de interação observados entre valores de pH de 4,0 a 5,0 (Wettreich *et al.*, 1999).

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 a diminuição do pH local. Essas moléculas carregadas negativamente demonstraram suscetibilidade à ação de sialidase, sugerindo a participação de glicoproteínas sialiladas e/ ou gangliosídeos na formação de complexos macromoleculares que determinam as características físicas e químicas necessárias para a diminuição local de pH.

OBJETIVOS

Vários trabalhos têm demonstrado a influência de gangliosídeos sobre fatores de crescimento e sobre o sistema hematopoiético. Por outro lado, estudos anteriores propõem que a interação entre fatores de crescimento e os receptores correspondentes no sistema hematopoiético, especialmente entre GM-CSF e seu receptor, é controlada por complexos macromoleculares incluindo proteoglicanos contendo heparan sulfato e moléculas polares contendo ácido siálico. O conjunto desses dados evidencia a relevância da análise da composição de gangliosídeos dos estromas e de seu papel na capacidade de suporte mielopoiético de um determinado estroma.

Sendo assim, o objetivo geral deste estudo foi analisar a composição de gangliosídeos de diferentes estromas e verificar a participação destes no microambiente de contato entre células estromais e células progenitoras mielóides, assim como a possível participação destes glicolipídios sialilados sobre a capacidade de sustentação da mielopoiese de um dado estroma. O modelo experimental utilizado apresenta como sistema de resposta para o monitoramento da disponibilidade e atividade local de fatores de crescimento, especialmente de GM-CSF, a linhagem celular precursora mielóide FDC-P1, a qual é dependente de GM-CSF ou IL-3 para sua sobrevivência e proliferação. Foram utilizados dois sistemas de suporte para as células FDC-P1, cocultura sobre uma camada semiconfluyente de células estromais e cultivo em meio condicionado por esses mesmos estromas.

1. Objetivos específicos

1. Identificar o perfil de gangliosídeos de estromas secretores de GM-CSF de diferentes origens: linhagem celular AFT-024, derivada de fígado fetal; linhagem celular S17, derivada de medula óssea; linhagem celular GRX, representativa de células estreladas hepáticas murinas isoladas de reações fibro-granulomatosas, e cultura primária de fibroblastos de pele de camundongos C3H.

2. Analisar os gangliosídeos liberados para o meio de cultura pelos diferentes estromas.

3. Determinar a capacidade mielosuportiva dos meios condicionados e dos estromas em situações de depleção de um ou de todos os gangliosídeos do estroma.

4. Verificar a expressão dos gangliosídeos nas diferentes linhagens celulares estudadas e na região de contato entre células precursoras mielóides e células do estroma, utilizando microscopia de fluorescência nos sistemas de cocultivo.

5. Avaliar a colocalização dos gangliosídeos com o receptor de GM-CSF em um dos modelos *in vitro* de mielopoiese estudados, utilizando imunodeteção de fluorescência e microscopia confocal.

6. Detectar a presença de gangliosídeos em frações de membrana insolúveis a detergente em células do estroma e na linhagem precursora mielóide.

PARTE II

CAPÍTULO 1

Gangliosides of myelosupportive stroma cells are transferred to myeloid progenitors and are required for their survival and proliferation

(artigo publicado)

Referência: Biochemical Journal, v. 394, p. 1-9, 2006.

Gangliosides of myelosupportive stroma cells are transferred to myeloid progenitors and are required for their survival and proliferation

Ana L. ZIULKOSKI*†, Cláudia M. B. ANDRADE*, Pilar M. CRESPO‡, Elisa SISTI*†, Vera M. T. TRINDADE*, Jose L. DANIOTTI‡, Fátima C. R. GUMA* and Radovan BOROJEVIĆ§¹

*Laboratório de Bioquímica e Biologia Celular de Lipídios, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, †Instituto de Ciências da Saúde, Centro Universitário FEEVALE, Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul, Brazil, ‡Centro de Investigaciones in Química Biológica de Córdoba, CIQUIBIC (UNC-CONICET), Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina, and §Instituto de Ciências Biomédicas & Programa Avançado de Biologia Celular Aplicada à Medicina, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

In previous studies, we have shown that the myelopoiesis dependent upon myelosupportive stroma required production of growth factors and heparan-sulphate proteoglycans, as well as generation of a negatively charged sialidase-sensitive intercellular environment between the stroma and the myeloid progenitors. In the present study, we have investigated the production, distribution and role of gangliosides in an experimental model of *in vitro* myelopoiesis dependent upon AFT-024 murine liver-derived stroma. We used the FDC-P1 cell line, which is dependent upon GM-CSF (granulocyte/macrophage colony-stimulating factor) for both survival and proliferation, as a reporter system to monitor bioavailability and local activity of GM-CSF. G_{M3} was the major ganglioside produced by stroma, but not by myeloid cells, and it was required for optimal stroma myelosupportive function. It was released into the supernatant and selectively incorporated into the myeloid progenitor cells, where it segregated into rafts

in which it co-localized with the GM-CSF-receptor α chain. This ganglioside was also metabolized further by myeloid cells into gangliosides of the *a* and *b* series, similar to endogenous G_{M3} . In these cells, G_{M1} was the major ganglioside and it was segregated at the interface by stroma and myeloid cells, partially co-localizing with the GM-CSF-receptor α chain. We conclude that myelosupportive stroma cells produce and secrete the required growth factors, the cofactors such as heparan sulphate proteoglycans, and also supply gangliosides that are transferred from stroma to target cells, generating on the latter ones specific membrane domains with molecular complexes that include growth factor receptors.

Key words: ganglioside, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), intercellular environment, membrane raft, myelopoiesis.

INTRODUCTION

Cells of the myeloid lineage can either dwell inside solid tissues in close contact with adjacent cells and the intercellular matrix or circulate free in liquid tissues, such as blood and lymph. The former situation is required for proliferation and commitment of myeloid cell progenitors, which occur mainly in the bone marrow. Myeloid cell populations can be amplified further in peripheral tissues. Circulation of leucocytes and myeloid cells in blood is only transitory, as the final site of their migration and activity occurs inside normal or injured tissues [1–3]. In both bone marrow and peripheral tissues, myeloid cell proliferation and activation are dependent upon the local stroma cells, the extracellular matrix and the cytokines or inflammatory mediators that are locally produced or brought into the tissues by blood [4–6].

Intercellular mediators and cytokines usually attain only relatively low concentrations in circulating biological fluids and their activity is dependent upon binding to the available membrane receptors on the target cells. Inside solid tissues, the intercellular space is commonly narrow and the mediators can attain high concentrations and steep gradients, interacting with components of the extracellular matrix or the cell glycocalyx. Their bioavailability and activity are thus largely dependent upon macromolecular complexes that surround the membrane receptors [3,7,8]. Moreover, while settling or moving inside the tissues, myeloid cells

and their progenitors become polarized and redistribute the specialized membrane regions, which can fully segregate the cytokine receptors and the associated membrane components by capping. The cell can thus be highly responsive to a given cytokine on one of its sides and insensitive on the other. Under such conditions, the interaction of myeloid cells with the adjacent stroma can be highly specific and spatially ordered [9].

GM-CSF (granulocyte/macrophage colony-stimulating factor), IL (interleukin)-3 and IL-5 are central haemopoietins that act through a common β -receptor chain. They control proliferation, differentiation and activation of myeloid cells [10]. Besides their function in the bone marrow myelopoiesis, GM-CSF and IL-5 also participate in tissue repair and regeneration [11,12]. Chronic activation of GM-CSF production in injured tissues leads to exacerbated reactions, such as proliferation and activation of myofibroblasts and formation of granulation tissue and/or fibrosis [13,14]. GM-CSF expression also occurs in many cancer cells, correlating with the tumour aggressiveness and the extension of pericancerous stroma reaction [15]. Local controls of GM-CSF activities are thus relevant for pathobiology and evolution of tissue reactions in pathological states.

Experimental *in vitro* models of myelopoiesis have been well established [16]. One of the major findings is the fact that relatively high concentrations of haemopoietins are required to drive proliferation of myeloid progenitors in liquid cell cultures,

Abbreviations used: CMF-BSS, calcium- and magnesium-free balanced salt solution; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FBS, fetal bovine serum; GM-CSF, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor; GM-CSF-R α , GM-CSF-receptor α subunit; HPTLC, high-performance TLC; IL, interleukin; PDMP, D,L-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol.

¹ To whom correspondence should be addressed (email radovan@histo.ufrj.br).

whereas very low or barely detectable levels are sufficient in cultures provided with the myelosupportive stroma. Several studies have indicated that the mitogenic activity of GM-CSF can be modulated by the glycosaminoglycan moiety of heparan sulphate proteoglycans produced by stromal cells, which could either enhance or abrogate the biological availability or activity of the cytokine [17–19]. We have also shown [20] that the polarity of the intercellular micro-environment was determinant for optimal interaction between GM-CSF and glycosaminoglycans. This was sensitive to digestion with sialidase. In view of these findings, we proposed that clusters of negatively charged molecules, such as sialylated glycoproteins and glycosphingolipids (gangliosides), associated with membranes of stromal cells, haematopoietic progenitors or both cell types, could be determinants for the local physical and chemical properties leading to the decreased pH, which induces the conformational change in GM-CSF required for its optimal interaction with glycosaminoglycans [6,20,21]. In the present study, we have addressed the question of the production, distribution and role of gangliosides in the experimental model of *in vitro* myelopoiesis in the presence of a myelosupportive stroma. We have used the FDC-P1 cell line, which is dependent upon GM-CSF for both survival and proliferation, as a reporter system to monitor the bioavailability and the local activity of GM-CSF.

EXPERIMENTAL

Materials

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), RPMI 1640 medium, C₆-NBD-ceramide {*N*-[7-(4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole)]-6-aminohexanoyl-D-erythro-sphingosine}, FITC-conjugated cholera toxin, rabbit anti-(cholera toxin) antibody and standard lipids were from Sigma–Aldrich; FBS (fetal bovine serum) was from Cultilab; D-[U-¹⁴C]galactose (300 mCi/mmol) was from Amersham BioSciences; plastic tissue-culture dishes were Nunc; Fluorsave[®] and PDMP (D,L-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol) were from Calbiochem; silica-gel HPTLC (high-performance TLC) plates were from Merck; a rabbit polyclonal antibody to GM-CSF-R α (GM-CSF-receptor α subunit) was from Santa Cruz Biotechnology; FITC-conjugated goat anti-mouse serum, CY3-conjugated goat anti-mouse serum and TRITC-conjugated donkey anti-rabbit serum were from Jackson ImmunoResearch. DH2, a monoclonal anti-G_{M3} antibody, was generously supplied by Dr Sen-itiroh Hakomori (University of Washington, Seattle, WA, U.S.A.).

Cells and cell cultures

The murine AFT-024, FDC-P1 and WeHi-3B cell lines were obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (PABCAM, Federal University, Rio de Janeiro, Brazil). AFT-024 (established originally from fetal liver) and WeHi-3B cells were maintained in RPMI 1640 and DMEM respectively, supplemented with 10% (v/v) FBS. The FDC-P1 cell line was maintained in RPMI 1640 medium containing 10% (v/v) FBS and 10% (v/v) supernatant of WeHi-3B cells, which secrete IL-3 and GM-CSF constitutively. Cultures were maintained under a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C. For a typical co-culture experiment, FDC-P1 cells were washed with CMF-BSS (calcium- and magnesium-free balanced salt solution) in order to remove IL-3 and GM-CSF, inoculated on to the semi-confluent monolayers of AFT-024 cells in 24-well plates (1 × 10⁵ cells/well) and maintained in culture for 48 h. Cell proliferation was monitored under a phase-contrast-equipped inverted microscope. For co-cultures under PDMP treatment, the AFT-024 culture was maintained

with 10 μ M PDMP for 48 h, FDC-P1 cells were then inoculated on to the semi-confluent monolayers, as described above, and maintained in culture for 24, 48 and 72 h in the presence of 10 μ M PDMP. The PDMP-containing medium was renewed every 24 h. Controls were done using FDC-P1 cultures maintained in standard AFT-024 supernatant supplemented at the beginning of the culture with 10 μ M PDMP.

Determination of the FDC-P1 proliferation rate

FDC-P1 cells were inoculated on to 24-well culture plates at 1 × 10⁵ cells/well and maintained in three different medium preparations: (i) RPMI supplemented with 10% (v/v) FBS and 50% (v/v) medium conditioned by AFT-024 cells; (ii) RPMI supplemented with 10% (v/v) FBS and 50% (v/v) medium conditioned by AFT-024 cells treated with 10 μ M PDMP; (iii) RPMI supplemented with 10% (v/v) FBS and 50% (v/v) medium conditioned by AFT-024 cells and addition of 10 μ M PDMP; and (iv) RPMI supplemented with 10% (v/v) FBS and 50% (v/v) medium conditioned by AFT-024 cells and 20% (v/v) DH2 hybridoma supernatant (producing monoclonal anti-G_{M3} antibody). After 24 h, the viable cells were counted on a haemocytometer. RPMI supplemented with only 10% (v/v) FBS was used as the negative control and RPMI supplemented with 10% (v/v) FBS and 10% (v/v) WeHi-3B-cell-conditioned medium was used as the positive control. In order to monitor the potential non-specific effect of DH2 over FDC-P1 proliferation, cells were maintained in positive-control medium with 20% (v/v) DH2.

Metabolic labelling and lipid extraction

Cultures of stromal cells that reached confluence and cultures of FDC-P1 cells were incubated with 0.5 μ Ci/ml [¹⁴C]galactose for 12 h. Subsequently, cells were washed three times with ice-cold PBS, harvested from the plate and pelleted by a brief centrifugation [22]. Lipids were extracted from radiolabelled cell pellets with chloroform/methanol (2:1, v/v), and glycosphingolipids were purified using a Sep-Pack C₁₈ column [23]. Inhibition of PDMP was determined after incubation of stromal cells for 24 and 72 h with 10 μ M PDMP and incubation with 0.5 μ Ci/ml [¹⁴C]galactose for the last 12 h of incubation.

Chromatography and analysis of gangliosides

The purified lipid extracts were evaporated under N₂ and run on HPTLC silica gel 60 plates with two successive solvent systems: chloroform/methanol (4:1, v/v) and chloroform/methanol/0.25% aqueous CaCl₂ (15:9:2, by vol.). Lipids were developed in a tank as described by Nores et al. [24]. Radiolabelled sphingolipids were visualized by exposing to a radiographic film at –70°C, and their relative content was determined by densitometric scanning of the X-ray film in a CS 930 Shimadzu UV/vis densitometer. The standards were visualized by exposure to resorcinol/HCl [25]. Ganglioside designations are based on TLC co-migration with standards. The identity of labelled phosphatidylcholine was confirmed by alkaline hydrolysis and co-migration with purified phospholipid standard as described by Rosales-Fritz et al. [26].

Immunocytochemistry

Semi-confluent monolayers of AFT-024 and co-cultures (maintained for 12 h) grown on coverslips were fixed in 4% (v/v) paraformaldehyde for 30 min, washed in PBS and incubated in 3% (w/v) BSA-containing PBS for 1 h at 37°C to block non-specific binding sites. FDC-P1 cells were washed with PBS, and 5 × 10⁴ cells were suspended in 100 μ l of PBS. They were

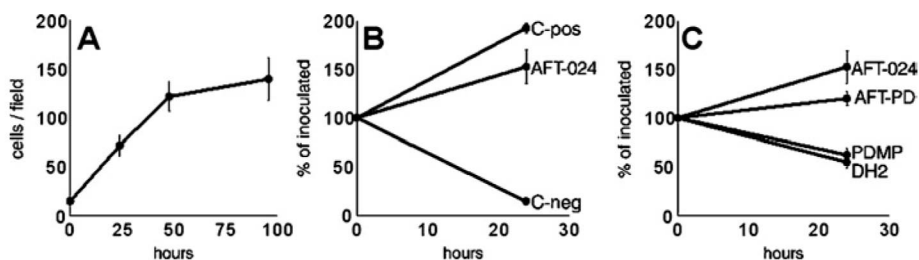


Figure 1 Myelosupportive activity of AFT-24 cells for survival and proliferation of FDC-P1 cells

(A) FDC-P1 cell proliferation in co-culture with AFT-24 cells. (B) FDC-P1 cell proliferation in the presence of the supernatant of AFT-24 cells, of the supernatant of WeHi-3B cells as the positive control (C-pos), and in the RPMI 1640 culture medium supplemented with 10% (v/v) FBS as the negative control (C-neg). (C) Inhibition of the FDC-P1 cell proliferation in the presence of AFT-24 cell supernatant harvested from cultures in which the synthesis of gangliosides was inhibited by PDMP, standard AFT-24 cell supernatant in the presence of 10 μ M PDMP added at the beginning of culture (AFT-PD) or AFT-24 cell supernatant in the presence of DH2 (a monoclonal antibody to G_{M3}) compared with the proliferation in the presence of the standard AFT-24 cell supernatants (AFT-024).

cytocentrifuged at 40 *g* on to coverslips, fixed in 4% (v/v) paraformaldehyde for 30 min and the non-specific binding sites were blocked as described above. The immunocytochemistry procedures were done as described by Crespo et al. [25]. The primary antibodies were: mouse monoclonal anti- G_{M3} (clone DH2) and rabbit polyclonal anti-(GM-CSF- $R\alpha$) (1:200) antibodies. The secondary antibodies were: CY3-conjugated goat anti-mouse Ig (1:1000), FITC-conjugated goat anti-mouse Ig (1:40) or TRITC-conjugated goat anti-(rabbit Ig) (1:500) antibodies. After a final washing with PBS, specimens were mounted with Fluor-save. Confocal images were obtained using a Carl Zeiss LSM5 Pascal laser scanning confocal microscope (Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) equipped with an argon/helium/neon laser and a 63 \times (1.4 numerical aperture) oil-immersion objective (Zeiss Plan-Apochromat). For G_{M1} immunostaining, two methods were used: (i) fixed cells were incubated with 4 μ g/ml non-toxic cholera toxin B subunit, followed by mouse monoclonal anti-(cholera toxin) antibody; and (ii) fixed cells were incubated with FITC-conjugated non-toxic cholera toxin B subunit. Other immunocytochemistry procedures were the same as described above.

Shedding of gangliosides

The AFT-024 and FDC-P1 cells were metabolically labelled with 0.5 μ Ci/ml [14 C]galactose for 12 h, washed and cultured in fresh medium for 48 h. Subsequently, the culture supernatant was collected, dialysed against distilled water for 24 h, lyophilized and the total lipids were extracted from the lyophilized powder with chloroform/methanol (1:1, v/v). The cells were harvested and lipids extracted with chloroform/methanol (2:1, v/v) as indicated above. The gangliosides present in the cells and in the supernatant were purified and analysed [27].

Uptake of radioactive lipids from AFT-024-conditioned medium by FDC-P1 cells

AFT-024 cells were metabolically labelled with 0.5 μ Ci/ml [14 C]galactose for 12 h, washed and cultured in fresh medium for 48 h. The culture supernatant was collected and centrifuged at 1200 *g* for 20 min to eliminate cells and debris. Subsequently, FDC-P1 cells were cultivated overnight in RPMI supplemented with 10% (v/v) FBS and 50% (v/v) AFT-024 cell-conditioned medium. The cells were pelleted by brief centrifugation and lipids were extracted, purified and analysed as described previously [25]. The same protocol was applied to AFT-024 cells treated previously with 10 μ M PDMP for 72 h and maintained in the presence of PDMP in order to obtain the conditioned medium.

Labelling of co-cultures

Co-cultures were submitted to different metabolic labelling protocols. (i) COC group: AFT-024 and FDC-P1 cells were incubated with 0.5 μ Ci/ml [14 C]galactose for the last 12 h of 48 h co-cultures. (ii) ST group: semi-confluent monolayers of AFT-024 cells were incubated with 0.5 μ Ci/ml [14 C]galactose for 12 h, washed three times with CMF-BSS and FDC-P1 cells were inoculated and co-cultured for the following 48 h. (iii) PDMP group: AFT-024 cells were incubated with 0.5 μ Ci/ml [14 C]galactose for 12 h, washed three times with CMF-BSS and FDC-P1 cells treated previously with 10 μ M PDMP for 6 h were inoculated on to the semi-confluent monolayers of AFT-024 cells and co-cultured for the following 48 h in the presence of PDMP. (iv) PREC group: FDC-P1 cells were incubated with 0.5 μ Ci/ml [14 C]galactose for 12 h, washed three times with CMF-BSS, inoculated on to the semi-confluent monolayers of AFT-024 cells and co-cultured for the following 48 h. For harvesting FDC-P1 cells from co-cultures, the medium was collected and the culture plates were washed three times with PBS at room temperature, under gentle stirring. FDC-P1 cells were harvested from washes. Under these conditions, a fraction of adherent FDC-P1 cells remained attached to the AFT-024 cell stroma.

Exosome preparations

Exosomes were collected from the medium of the ST and PDMP groups described above. Supernatants were centrifuged at 300 *g* for 5 min and at 1200 *g* for 20 min in order to eliminate cells and debris, followed by a centrifugation for 1.5 h at 70 000 *g*. Two fractions were obtained: a high-density (pellet) and a low-density (hypodense) fraction. The exosomes concentrated in the pellet were washed in a large volume of PBS and centrifuged at 70 000 *g* for 1.5 h [28]. The lipids were extracted, purified and analysed as described previously [28].

RESULTS

FDC-P1 cells proliferated both in co-culture with AFT-024 stroma (Figures 1A and 2) and in the presence of the AFT-024 cell-culture supernatant (Figure 1B). This is in accordance with our previous study [29] showing that AFT-024 cells, although lacking IL-3, produced and secreted high amounts GM-CSF, as well as heparan-sulphate-bearing proteoglycans that interacted with GM-CSF. These stroma cells could thus be used for studies on the GM-CSF-dependent myeloid cell proliferation. Inhibition of ganglioside synthesis in the stroma layer with PDMP significantly decreased the myelosupportive capacity in both experimental

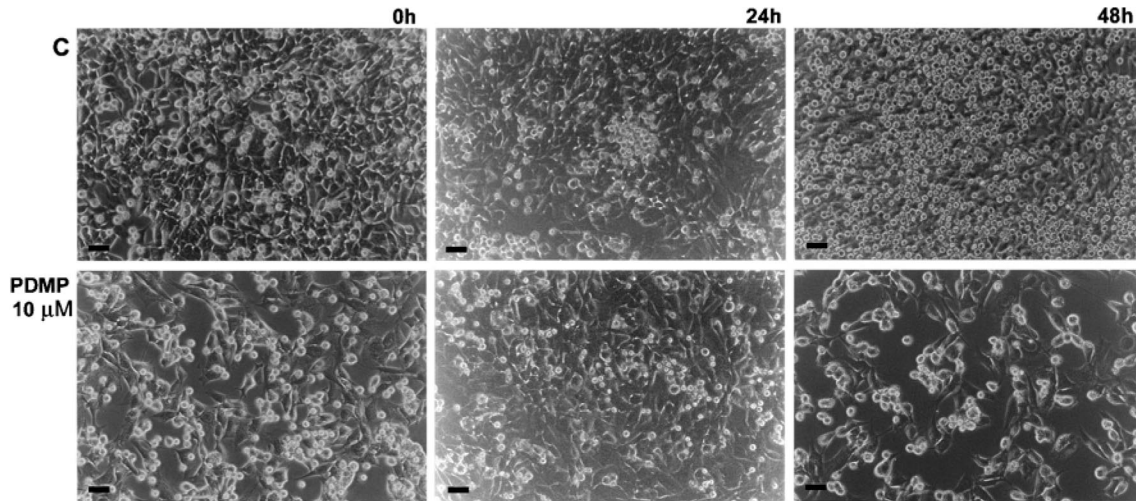


Figure 2 Inhibition of FDC-P1 cell survival and proliferation in co-culture with AFT-024 cells in which ganglioside synthesis was inhibited by PDMP

FDC-P1 cells washed previously with CMF-BSS were inoculated on to the semi-confluent monolayers of AFT-024 cells at 1×10^5 cells/well and maintained for 0, 24 and 48 h. C, co-cultures maintained in standard conditions. PDMP, co-cultures maintained with $10 \mu\text{M}$ PDMP after inoculation of FDC-P1 cells upon AFT-024 semi-confluent cell monolayer treated previously with the inhibitor for 48 h. Phase-contrast microscopy of the cells is shown. Scale bar, $20 \mu\text{m}$.

conditions (Figures 1C and 2), indicating that the synthesis and release of gangliosides into the supernatants were required for FDC-P1 cell proliferation. To exclude a direct toxic effect of PDMP on FDC-P1 cells, supernatant was collected from standard AFT-024 cell cultures and PDMP was added prior to its addition to FDC-P1 cells. Results indicated a small decrease in FDC-P1 proliferation, but this direct effect of PDMP was much lower than the inhibition observed when gangliosides shed by stroma cells was reduced due to PDMP treatment (Figure 1C).

We had suspected previously that sialic-acid-containing molecules played an important role in modulating the cross-talk between stromal and myeloid cells, since capping of negatively charged molecules, sensitive to sialidase digestion, occurred in both cells at the site of interaction [21]. For this reason, we next analysed ganglioside synthesis in AFT-024 and FDC-P1 cells (Figures 3A and 3B, and Table 1). AFT-024 accumulated essentially $\text{G}_{\text{M}3}$ and, to a lower extent, $\text{G}_{\text{D}1\text{a}}$ and $\text{G}_{\text{M}1}$. This is similar to other myelosupportive stromata that we have studied: the S17 cell line derived from the bone marrow (F. C. R. Guma, unpublished work) and the liver connective tissue cells involved in inflammatory fibro-granulomatous reactions that have a tissue origin similar to AFT-024 cells (C. M. B. Andrade, unpublished work). Conversely, FDC-P1 cells accumulated only a low amount of $\text{G}_{\text{M}3}$, which was metabolized further to several gangliosides of the *a* and *b* series. $\text{G}_{\text{M}1}$ was the major ganglioside accumulated by FDC-P1 cells. All major gangliosides ran as doublets, in accordance with the fact that sphingolipids have differences in ceramide structures [30,31].

The required presence of gangliosides in the stroma-mediated support of myelopoiesis was shown by PDMP-dependent inhibition of their synthesis. Exposure of AFT-024 cells to $10 \mu\text{M}$ PDMP for 3 days led to a noticeable decrease in ganglioside synthesis (57 and 82% in 24 and 72 h respectively) and in their precursors lactosylceramide [CDH (ceramide dihexoside)] and glucosylceramide [CMH (ceramide monohexoside)] (Figure 3A). We questioned whether the major ganglioside of the stroma, $\text{G}_{\text{M}3}$, was specifically involved in this interaction. In the presence of DH2 (a monoclonal antibody against $\text{G}_{\text{M}3}$), inhibition of FDC-P1 cell proliferation was equivalent to that elicited by

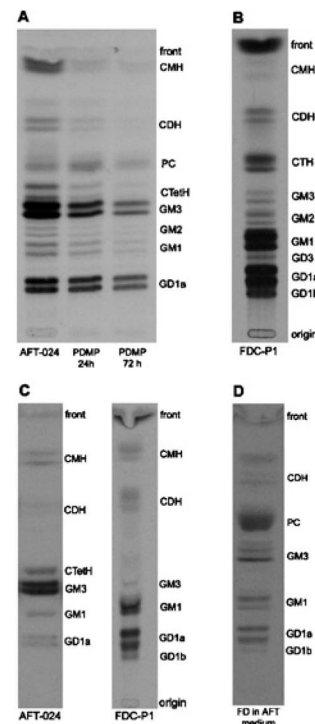


Figure 3 Analysis of glycosphingolipids in AFT-024 and FDC-P1 cells

(A) Synthesis of glycosphingolipids in AFT-024 cells. Cell cultures were incubated for 12 h with ^{14}C galactose and for the last 12 h of treatment with $10 \mu\text{M}$ PDMP for 24 or 72 h. (B) Synthesis of glycosphingolipids in FDC-P1 cells. (C) Glycosphingolipids shed by AFT-024 and FDC-P1 cells. Cell cultures were incubated 12 h with ^{14}C galactose and the lipids were shed into the medium for 48 h. (D) FDC-P1 uptake of glycosphingolipids from AFT-024 cell-conditioned medium. AFT-024 cultures were incubated for 12 h with ^{14}C galactose and the lipids were shed into the medium for 48 h. FDC-P1 cells washed previously with CMF-BSS were then inoculated in RPMI supplemented with 10% (v/v) FBS and 50% (v/v) of medium conditioned by AFT-024 cells. Lipids were extracted, purified, analysed by HPTLC and visualized by fluorography. The radioactive bands correspond to the lipids indicated. CTetH: ceramide tetrahexoside; CTH, ceramide trihexoside; CDH, ceramide dihexoside; CMH, ceramide monohexoside; PC, phosphatidylcholine. Gangliosides are named according to Svennerholm [47].

Table 1 Densitometric analysis of metabolically labelled lipids from AFT-024 and FDCP-1 cells

Cell cultures were incubated for 12 h with [14 C]galactose and lipids were extracted, purified, analysed by HPTLC and visualized by fluorography. Results are expressed as a percentage of the total radioactivity incorporated. G_{D1b}, G_{D1a}, G_{M1}, G_{M2}, G_{D3} and G_{M3} are gangliosides named according to Svennerholm [47]; CtetH, ceramide tetrahexoside; CTH, ceramide trihexoside; CDH, ceramide dihexoside; CMH, ceramide monohexoside; PC, phosphatidylcholine; n.d., not detected.

Lipids	Proportion of glycolipids (% of total radioactivity)	
	AFT-024	FDC-P1
G _{D1b}	n.d.	6.9
G _{D1a}	20.6	26.7
G _{D3}	n.d.	2.4
G _{M1}	3.6	24.2
G _{M2}	0.9	3.8
G _{M3}	52.8	2.6
CtetH	7.0	n.d.
PC	2.5	n.d.
CTH	n.d.	9.7
CDH	3.0	4.0
CMH	8.1	n.d.

the overall inhibition of ganglioside synthesis, indicating the crucial role of G_{M3} in the myelosupportive function of the stroma (Figure 1C). Additionally, we performed experiments to discard a direct inhibition of cell proliferation by DH2. FDC-P1 cells were incubated in the standard culture medium containing DH2 at the same concentration as used in the experiment in Figure 1(C). No effect of DH2 on FDC-P1 cell proliferation was found, clearly excluding a direct effect of DH2 (results not shown).

Since the response to GM-CSF stimulation requires its interaction with the FDC-P1 membrane through binding to the GM-CSF-R, we investigated the spatial distribution of gangliosides and GM-CSF-R α on FDC-P1 cells (Figure 4). In accordance with the TLC analysis of metabolic incorporation of [14 C]galactose (Figures 3A and 3B, and Table 1), AFT-024 cells displayed a strong labelling with DH2 (monoclonal anti-G_{M3} antibody) in the perinuclear region and a faint labelling of cell membranes (Figure 4A). Conversely, the G_{M3} labelling of FDC-P1 cells was barely detectable (Figure 4B). However, when co-cultures were studied, an intense labelling of G_{M3} was observed on the membranes of FDC-P1 cells, but not in the perinuclear region. Instead, labelling disclosed a full capping on one side of the cell only (Figure 4C). A similar labelling is shown in Figures 4(D) and 4(G) and it can be compared with the labelling of the GM-CSF-R α (Figures 4E and 4H). The merged images disclosed that GM-CSF-R α -stained areas co-distributed almost completely with G_{M3} staining, despite extensive areas of G_{M3} staining outside of areas of GM-CSF-R α staining (Figures 4F and 4I). In many cases, the capping was observed at the contact regions both between two FDC-P1 cells and between stroma and FDC-P1 cells (Figures 4Ia', 4Ib' and 4J–4M).

Taking into consideration that G_{M1} is the major ganglioside produced by FDC-P1 cells and to a lesser extent in AFT-024 cells (Figures 3A and 3B, and Table 1), the subcellular distribution of this lipid was analysed and compared with the distribution of G_{M3}. G_{M1} was present homogeneously on the membranes of both the stroma and myeloid cells (Figures 5A and 5B respectively). When co-cultures were studied, the pattern of G_{M1} distribution was similar to G_{M3}. A significant capping of G_{M1} was observed at the contact region between AFT-024 and FDC-P1 cells (Figures 5C and 5D). However, the analysis of GM-CSF-R α

distribution disclosed only a partial co-distribution of the receptor staining with G_{M1} staining, mainly at the contact region (Figures 5E–5G).

The increased presence of G_{M3} on FDC-P1 cells in co-culture with AFT-024 raised the question of the mechanism of this apparent contribution of the stroma to the ganglioside composition of the myeloid cell membrane. In order to provide direct evidence of the functional intercellular transfer of sphingolipids in the model of myelosupportive stroma, shedding of radiolabelled gangliosides from AFT-024 and FDC-P1 cells was monitored (Figure 3C). The major ganglioside shed by the stroma cells was G_{M3}, whereas FDC-P1 cells shed essentially G_{M1} and G_{D1a}. The gangliosides harvested from the culture medium represented essentially the pattern of their synthesis in the two cell types, with a relatively low presence of G_{D1a} in the supernatant compared with its presence in AFT-024 cells. When unlabelled FDC-P1 cells were incubated with the supernatant harvested from the AFT-024 cell culture treated with [14 C]galactose in which G_{M3} was the major component (Figure 3B), a number of labelled compounds were detected (Figure 3D). The pattern suggests that the G_{M3} captured from the medium was metabolized further in a similar manner to the metabolism of endogenous G_{M3} in FDC-P1 cells (Figure 3B). When the same experiment was done with conditioned medium obtained from AFT-024 cells metabolically labelled and treated with PDMP, the presence of the same ganglioside species in FDC-P1 cells was observed, although the incorporated radioactivity was lower than in control cells (results not shown).

Quantification of the densitometric analysis of G_{M3} and G_{D1a} (Figure 6) in FDC-P1 cells co-cultured with AFT-024 cells showed an increased quantity of labelled G_{M3} (COC group = 20%) when compared with FDC-P1 cells cultivated alone (2.6%). The increased amount of G_{M3} labelled in FDC-P1 cells isolated from co-cultures was clearly detectable when only stroma cells were labelled (ST group = 32%). These results indicate the transfer of G_{M3} from AFT-024 cells to FDC-P1 cells. To exclude the possibility of the G_{M3} synthesis by FDC-P1 cells from metabolically labelled ganglioside precursors captured from AFT-024 cells, the *de novo* synthesis of FDC-P1 glycosphingolipids was inhibited by PDMP before inoculation on to the AFT-024 cellular monolayer (PDMP group) labelled previously. Under this condition, an increased fraction of G_{M3} (22%) was found in FDC-P1 cells isolated from co-culture, indicating again the transfer of G_{M3}. Moreover, when only FDC-P1 cells were metabolically labelled before inoculation on to stroma cells (PREC group), G_{M3} was not detected in FDC-P1 cells isolated from co-cultures. The presence of G_{D1a} in ST and PDMP groups confirms the further metabolism of the captured G_{M3}. Taken together, our results stand in contrast with the data reported for fibroblasts, neurons and neuroblastoma cells that incorporated 1- 3 H]sphingosine and synthesized labelled sphingolipids [32]. In this study, the released sphingolipids were taken up by cells, but they segregated to lysosomes and were entirely catabolized, indicating that, in this case, trafficking of sphingolipids to and from the extracellular environment does not allow the modification of cell membrane composition [32].

The results shown in Figures 4 and 5 are in agreement with our previous observation of extensive capping of raft-like structures on membranes of the stroma in contact with FDC-P1 cells [21]. Taken together, these data suggest formation of specific regions of the membranes enriched in proteoglycans, glycosphingolipids and growth factor receptors at the interface between the stroma and target cells. This model is compatible with a non-random transfer of membrane compounds between the adjacent stroma and the myeloid cells that represents a new model of co-operation between the myelosupportive stromata and the target cells. We

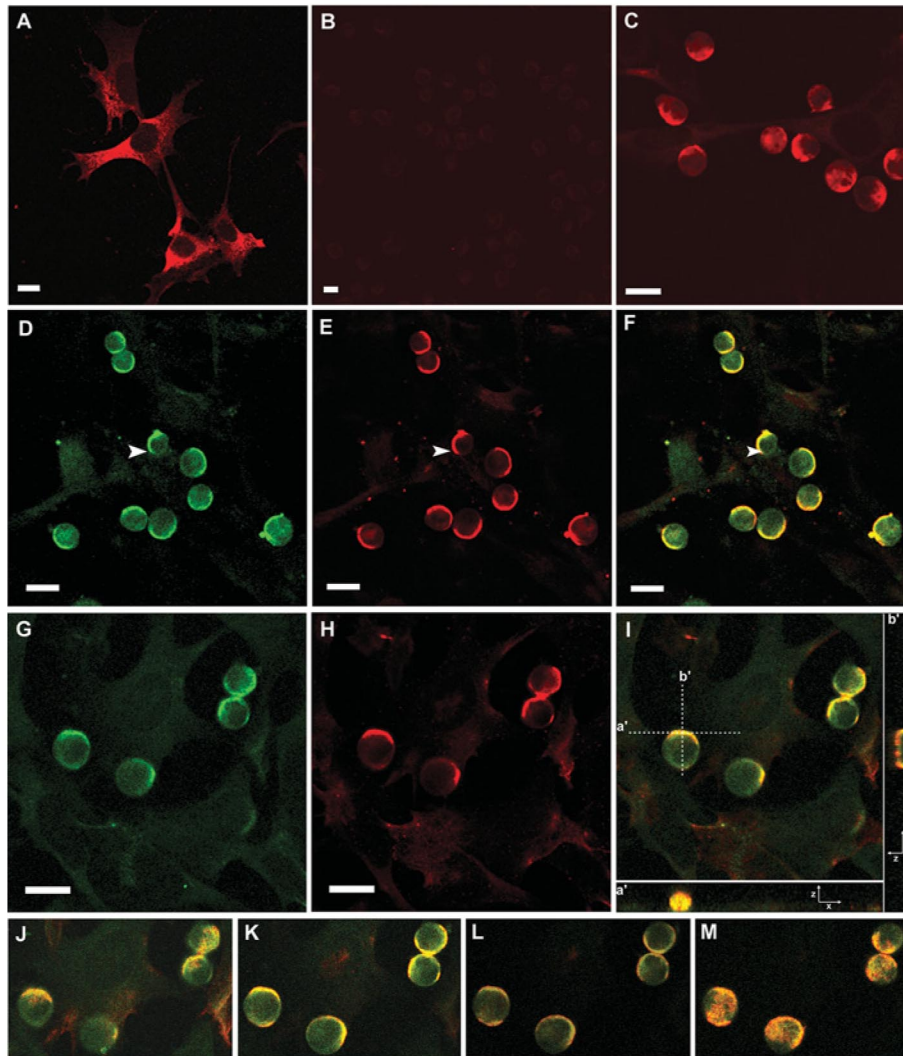


Figure 4 Subcellular location of G_{M3} and GM-CSF-R α in cell cultures and co-culture systems

Cells were immunostained for G_{M3} with DH2 and immunostained for GM-CSF-R α with a polyclonal anti-(GM-CSF-R α) antibody. (A) AFT-024 cells immunostained for G_{M3} . (B) FDC-P1 cells immunostained for G_{M3} . (C) Co-culture immunostained for G_{M3} . (D and G) Co-cultures immunostained for G_{M3} with monoclonal antibody DH2. (E and H) Co-cultures immunostained for GM-CSF-R α . (F) Merged image from (D) and (E). (I) Merged image of (G) and (H). Single confocal sections (x, y) of $0.7 \mu\text{m}$ were taken parallel to the coverslip, except for (I) in which a series of z sections were collected and displayed using the ortho-mode in LSM5 Pascal software provided with the microscope. A single x, y section of the stack is shown in (I). An x, z section (a') is shown at the bottom of (I) and a y, z section (b') at the right of (I). (J–M) are single x, y sections from the same z stack of (I) (from bottom to top). The arrows indicate capping of G_{M3} (D), GM-CSF-R α (E) and co-capping of G_{M3} and GM-CSF-R α (F). Scale bars, $10 \mu\text{m}$.

questioned further whether the intercellular transfer of membrane regions with sorted compounds, which potentially represent operational molecular units, could be achieved by the release and subsequent uptake of exosomes. The exosomal fraction was isolated by ultracentrifugation, as described previously by Skokos et al. [28]. We found that 40% of radiolabelled gangliosides released into the supernatant in a co-culture containing AFT-024 and FDC-P1 cells were found in the exosome fraction.

DISCUSSION

The concept of tissue stromata has gained increasing interest in view of the extending use of cell therapies, based upon introduction of exogenous stem or progenitor cells into the tissues that require repair or regeneration. It is expected that the introduced cells can receive sufficient information from the stroma in order to

proliferate within the physiological limits and to differentiate into the required cell types in the injured or degenerated tissues. Cells have also to re-establish appropriate spatial tissue organization. Tissue stromata have been studied extensively in the context of providing the required cytokines and chemokines, as well as mediators of homeostasis or inflammatory reactions and repair. They are also known to provide extracellular matrix that provides spatial tissue support. The present study indicates that, in addition, stroma cells may also supply membrane elements to the target cells, which can considerably modulate their ability to respond to given cytokines by segregating the receptors and enhancing or inhibiting intracellular signalling cascades.

We have demonstrated in the present and in parallel studies (C. M. B. Andrade and F. C. R. Guma, unpublished work) that G_{M3} is the major ganglioside in different myelosupportive stroma cells, such as AFT-024, S17 and GR cells, but it is only a minor ganglioside in the myeloid precursor FDC-P1 cells, although it

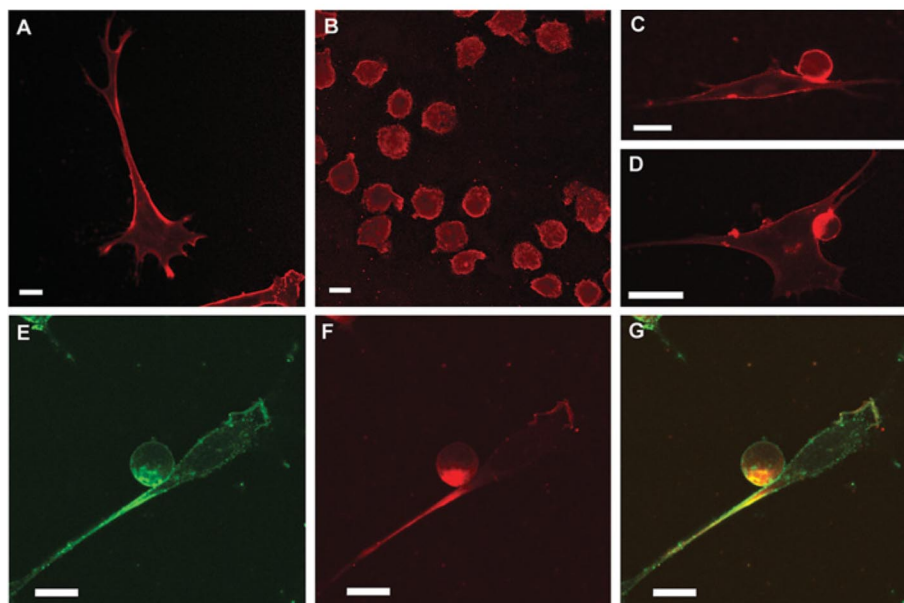


Figure 5 Subcellular location of G_{M1} and GM-CSF-R α in cell cultures and co-culture systems

G_{M1} was examined by incubation of cholera toxin, followed by a monoclonal anti-(cholera toxin) antibody or by the fluorescence of FITC-conjugated cholera toxin. Cells were immunostained for GM-CSF-R α with a polyclonal anti-(GM-CSF-R α) antibody. (A) AFT-024 cells immunostained for G_{M1} . (B) FDC-P1 cells immunostained for G_{M1} . (C–E) Co-cultures immunostained for G_{M1} . (F) Co-cultures immunostained for GM-CSF-R α . (G) Merged images from (E) and (F). Single confocal sections of 0.7 μm were taken parallel to the coverslip. Scale bars, 10 μm .

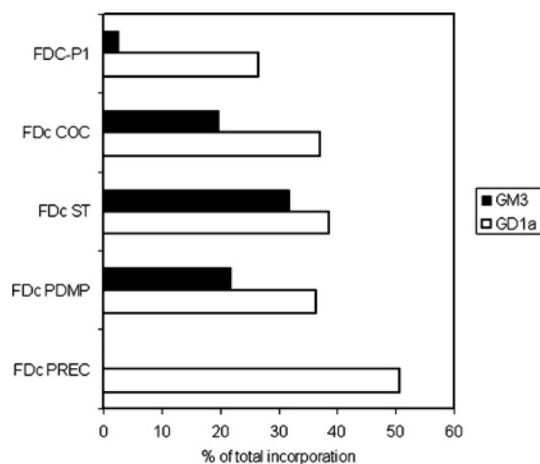


Figure 6 Analysis of FDC-P1 uptake of gangliosides G_{M3} and G_{D1a} from AFT-024-cell-conditioned medium

Results are expressed as the percentage of total radioactivity incorporated. FDC corresponds to myeloid progenitors isolated after co-culture submitted to different metabolic labelling protocols as described in the Experimental section. COC, metabolic labelling during the last 12 h of 48 h of co-culture; ST, metabolic labelling only of stromal cells prior to co-culture for 48 h; PDMP, metabolic labelling only of stromal cells and treatment of FDC-P1 cells with 10 μM PDMP prior to co-culture for 48 h in the presence of 10 μM PDMP; PREC, metabolic labelling only of myeloid precursor cells prior to co-culture for 48 h.

is required for their optimal response to GM-CSF. In the present study, we describe the transfer of G_{M3} from stroma to FDC-P1 cells, the capping of G_{M3} at the contact regions between the two cell types and the co-localization of GM-CSF-R α with G_{M3} on the myeloid cells. The GM-CSF-R α co-localizes only partially with ganglioside G_{M1} , a minor constituent of stroma cells, although the capping of G_{M1} by both cells at the contact regions was detectable, suggesting that G_{M3} and G_{M1} are located in different

membrane regions or in different rafts, as shown previously in other studies [33].

The biological significance of gangliosides shedding from normal and tumour cells and their effect on other cells has been well documented [27,34–36]. Gangliosides are shed from the cell plasma membrane as monomers, micelles or membrane vesicles enriched in caveolin-1 [37,38]. It has been also reported that exosomes, small vesicles formed from the fusion of multivesicular endosomes with the cell surface, could be transferred from professional to non-professional antigen-presenting cells for effective T-cell stimulation [39,40]. In this model, exosomes carry a number of immunoregulatory molecules and may be considered as immunologically sophisticated vectors for various antigens [41]. In the present study, we have shown that AFT-024 cells transfer G_{M3} to FDC-P1 cells. This transfer can be done by a direct contact between the cells or by uptake of G_{M3} shed to the extracellular environment. A random shedding and uptake of gangliosides is less probable, in view of their specific localization and metabolism on the target cells. The proliferation of FDC-P1 cells in the supernatant of AFT-024 cells was dependent on G_{M3} and we found that gangliosides were shed in the exosomal fractions. Therefore the exosomes might be an alternative way for secretion and cell uptake of G_{M3} now described in our experimental model.

Interaction of gangliosides with growth factor receptors has been studied extensively [42,43]. In many cases, glycosphingolipids were reported to have an inhibitory activity on signalling, decreasing the response to cytokines such as EGF (epidermal growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor) or FGF (fibroblast growth factor). In contrast, in our model of stroma-dependent myelopoiesis, gangliosides and, in particular, G_{M3} are required for optimal growth factor signalling. We have already proposed that this is due to generation of a particular negatively charged intercellular space in which the interaction among the growth factor, heparan sulphate proteoglycans and the corresponding receptor are most active [20,21]. We can now propose

the following scenario. The physical contact between stroma and myeloid progenitors elicits extensive capping on both cells and the concentration of selected sets of membrane molecules at the cell interfaces. Stroma cells provide growth factors, which are required for survival and proliferation of myeloid cells. They also supply gangliosides, which are transferred from stroma to target cells, generating on the latter specific membrane domains with molecular complexes that include growth factor receptors surrounded by the associated molecules. It is known that such a formation of lipid rafts containing membrane receptors is often required, particularly in cases where the functional receptor is composed of many interacting units as, for example, the T-lymphocyte cell receptor [44].

Three mechanistic models for modulation of growth factor and the corresponding receptor activity by gangliosides have been proposed: (i) ganglioside–ligand interaction, (ii) ganglioside regulation of receptor dimerization, and (iii) ganglioside modulation of receptor activity and its subcellular localization [43]. The modulation of receptor activity involves regulation of kinase activity, such as PKC (protein kinase C) [45] and Src kinases [46]. In this sense, our results suggest that modulation of GM-CSF-R interaction with the ligand, through formation of macromolecular complexes involving G_{M3} , may be determinant for signal transduction through phosphorylation cascades. Further studies will be required to determine whether G_{M3} directly activates the GM-CSF interaction with its receptor or indirectly involves the activity of co-activators or inhibitors segregated in the same membrane microdomains.

We are grateful to Tatiana Coelho-Sampaio for critical review of the manuscript prior to submission. We also thank C. Mas for excellent assistance with confocal microscopy and image analysis. This work was supported in part by grants from SECyT (Secretaría de Ciencia y Tecnología)-Universidad Nacional de Córdoba, International Society for Neurochemistry (Special ISN One-Time Fund), PEI (Proyecto de Estimulo a la Investigación) of CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas; grant no. 6462), Fundación Antorchas (grant no. 14116-112) and from Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (FONCYT; grant no. 01-13522) to J. L. D.; Programa de Centros Asociados de Posgrado Brasil/Argentina [CAPES-SPU (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–Secretaría de Políticas Universitarias); grant no. 001/02) to J. L. D. and F. C. R. G.; and CNPq (Conselho Nacional De Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FAPERJ (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro) grants to R. B.

REFERENCES

- Allen, T. D., Dexter, T. M. and Simmons, P. J. (1990) Marrow biology and stem cells. In *Colony Stimulating Factors* (Dexter, T. M., Garland, J. M. and Testa, N. G., eds.), pp. 1–38. Marcel Dekker, New York.
- Borojevic, R., El-Cheikh, M. C., Alvarez-Silva, M., Almeida, K. G. and Dutra, H. S. (1993) Hepatic myelopoiesis associated with inflammation: liver connective tissue cells form a myelopoietic stroma. In *Cells Hepatic Sinusoid*, vol. 4, pp. 130–133. Kupfer Cell Foundation, Leiden, The Netherlands.
- Zon, L. I. (1995) Developmental biology of hematopoiesis. *Blood* **86**, 2876–2891.
- Heyworth, C. M., Ponting, I. L. O. and Dexter, T. M. (1988) The response of hematopoietic cells to growth factors: developmental implications of synergic interactions. *J. Cell Sci.* **91**, 239–247.
- Dexter, T. M., Coutinho, L. H., Spooncer, E., Heyworth, C. M., Daniel, C. P., Schirot, R., Chang, J. and Allen, T. D. (1990) Molecular control of hematopoiesis. *Ciba Found. Symp.* **148**, 76–86.
- Carvalho, M. A., Arcanjo, K., Silva, L. C. F. and 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.
- Arai, K., Lee, F., Miyajima, A., Miyatake, S., Arai, N. and Yokota, T. (1990) Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Ann. Rev. Biochem.* **59**, 783–836.
- Taipale, J. and Keski-Oja, J. (1997) Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J.* **11**, 51–59.
- Giebel, B., Corbeil, D., Beckmann, J., Höhn, J., Giesen, K., Fischer, J., Kögler, G. and Wernet, P. (2004) Segregation of lipid raft markers including CD133 in polarized human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **104**, 2332–2338.
- Hamilton, J. A. (2002) GM-CSF in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol.* **23**, 403–408.
- Holgate, S. T. (2000) Epithelial damage and response. *Clin. Exp. Allergy* **30**, 37–41.
- Franzen, R., Bouhy, D. and Schoenen, J. (2004) Nervous system injury: focus on the inflammatory cytokine 'granulocyte-macrophage colony stimulating factor'. *Neurosci. Lett.* **361**, 76–78.
- Desmoulière, A., Tuchweber, B. and Gabbiani, G. (1995) Role of myofibroblast differentiation during liver fibrosis. *J. Hepatol.* **22**, 61–64.
- Mann, A., Breuhahn, K., Schirmacher, P. and Blessing, M. (2001) Keratinocyte-derived granulocyte-macrophage colony stimulating factor accelerates wound healing: Stimulation of keratinocyte proliferation, granulation tissue formation, and vascularization. *J. Invest. Dermatol.* **117**, 1382–1390.
- Bretscher, V., Andreutti, D., Neuville, P., Martin, M., Martin, F., Lefebvre, O., Gilles, C., Benzonana, G. and Gabbiani, G. (2000) GM-CSF expression by tumor cells correlates with aggressivity and with stroma reaction formation. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **32**, 525–533.
- Dexter, T. M. and Testa, N. G. (1976) Differentiation and proliferation of hemopoietic cells in culture. *Methods Cell Biol.* **14**, 387–405.
- Alvarez-Silva, M., Silva, L. C. and Borojevic, R. (1993) Cell membrane-associated proteoglycans mediate extramedullary myeloid proliferation in granulomatous inflammatory reactions to schistosome eggs. *J. Cell Sci.* **104**, 477–484.
- Alvarez-Silva, M. and 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.
- Modrowski, D., Basle, M., Lomri, A. and Marie, P. J. (2000) Syndecan-2 is involved in the mitogenic activity and signaling of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* **275**, 9178–9185.
- Wettrich, A., Sebollela, A., Carvalho, M. A., Azevedo, S. P., Borojevic, R., Ferreira, S. T. and Coelho-Sampaio, T. (1999) Acidic pH modulates the interaction between human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* **274**, 31468–31475.
- Borojevic, R., Carvalho, M. A., Corrêa-Junior, J. D., Arcanjo, K., Gomes, L., Joazeiro, P. P., Balduino, A., Wettrich, A. and 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.
- Zurita, A. R., Maccioni, H. J. and Daniotti, J. L. (2001) Modulation of epidermal growth factor receptor phosphorylation by endogenously expressed gangliosides. *Biochem. J.* **355**, 465–472.
- Williams, M. A. and McCluer, R. H. (1980) The use of Sep-Pak C₁₈ cartridges during the isolation of gangliosides. *J. Neurochem.* **35**, 266–269.
- Nores, G. A., Mizutani, R. and Kremer, M. (1994) Chromatographic tank designed to obtain highly reproducible high-performance thin-layer chromatograms of gangliosides and neutral glycosphingolipids. *J. Chromatogr. A* **686**, 155–157.
- Crespo, P. M., Zurita, A. R., Giraudo, C. G., Maccioni, H. J. F. and Daniotti, J. L. (2004) Ganglioside glycosyltransferases and newly synthesized gangliosides are excluded from detergent-insoluble complexes of Golgi membranes. *Biochem. J.* **377**, 561–568.
- Rosales-Fritz, V. M., Daniotti, J. L. and Maccioni, H. J. (1997) Chinese hamster ovary cells lacking GM1 and GD1a synthesize gangliosides upon transfection with human GM2 synthase. *Biochim. Biophys. Acta* **1354**, 153–158.
- Sietsma, H., Nijhof, W., Dontje, B., Vellenga, E., Kamps, W. A. and Kok, J. W. (1998) Inhibition of hemopoiesis *in vitro* by neuroblastoma-derived gangliosides. *Cancer Res.* **58**, 4840–4844.
- Skokos, D., Le Panse, S., Villa, I., Rousselle, J. C., Peronet, R., David, B., Namane, A. and Mécheri, S. (2001) Mast cell-dependent B and T lymphocyte activation is mediated by the secretion of immunologically active exosomes. *J. Immunol.* **166**, 868–876.
- Arcanjo, K., Belo, G., Folco, C., Werneck, C. C., Borojevic, R. and Silva, L. C. F. (2002) Biochemical characterization of heparan sulfate derived from murine hemopoietic stromal cell lines: a bone marrow-derived cell line S17 and a fetal liver-derived cell line AFT024. *J. Cell. Biochem.* **87**, 160–172.
- Ziulkoski, A. L., Zimmer, A. R., Zanettini, J. S., Trugo, L. C. and Guma, F. C. R. (2001) Synthesis and transport of different sphingomyelin species in rat Sertoli cells. *Mol. Cell. Biochem.* **219**, 57–64.
- Andrade, C. M. B., Trindade, V. M. T., Cardoso, C. C. A., Ziulkoski, A. L., Trugo, L. C., Guaragna, R. M., Borojevic, R. and Guma, F. C. R. (2003) Changes of sphingolipid species in the phenotype conversion from myofibroblasts to lipocytes in hepatic stellate cells. *J. Cell. Biochem.* **88**, 533–544.
- Chigorno, V., Giannotta, C., Ottico, E., Sciannambulo, M., Mikulak, J., Prinetti, A. and Sonnino, S. (2005) Sphingolipid uptake by cultured cells: complex aggregates of cell sphingolipids with serum proteins and lipoproteins are rapidly catabolized. *J. Biol. Chem.* **280**, 2668–2675.

- 33 Gómez-Moutón, C., Abad, J. L., Mira, E., Lacalle, R. A., Gallardo, E., Jiménez-Baranda, S., Illa, I., Bernad, A., Mañes, S. and Martínez-A, C. (2001) Segregation of leading-edge and uropod components into specific lipid rafts during T cell polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 9642–9647
- 34 Liu, Y., Li, R. and Ladisch, S. (2004) Exogenous ganglioside G_{D1a} enhances epidermal growth factor receptor binding and dimerization. *J. Biol. Chem.* **279**, 36481–36489
- 35 McKallip, R., Li, R. and Ladisch, S. (1999) Tumor gangliosides inhibit the tumor-specific immune response. *J. Immunol.* **163**, 3718–3726
- 36 Brodsky, V., Zvezdina, N., Nechaeva, N., Novikova, T., Gvasava, I., Fateeva, V. and Gracheva, H. (2003) Loss of hepatocyte co-operative activity after inhibition of ganglioside GM1 synthesis and shedding. *Cell Biol. Int.* **27**, 935–942
- 37 Kong, Y., Li, R. and Ladisch, S. (1998) Natural forms of shed tumor gangliosides. *Biochim. Biophys. Acta* **1394**, 43–56
- 38 Dolo, V., Li, R., Dillinger, M., Flati, S., Manela, J., Taylor, B. J., Pavan, A. and Ladisch, S. (2000) Enrichment and localization of ganglioside G_{D3} and caveolin-1 in shed tumor cell membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1486**, 265–274
- 39 de Gassart, A., Géminard, C., Février, B., Raposo, G. and Vidal, M. (2003) Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood* **102**, 4336–4344
- 40 Denzer, K., Kleijmeer, M. J., Heijnen, H. F., Stoorvogel, W. and Geuze, H. J. (2000) Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J. Cell Sci.* **113**, 3365–3374
- 41 Dimitris, S., Hany, G. B., Michèle, R. and Salah, M. (2001) Immunoregulatory properties of mast cell-derived exosomes. *Mol. Immunol.* **38**, 1359–1362
- 42 Hakomori, S. (2002) The glycosynapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 225–232
- 43 Miljan, E. A. and Bremer, E. G. (2002) Regulation of growth factor receptors by gangliosides. *SciSTKE* 2002, RE15
- 44 Razzaq, T. M., Ozegbe, P., Jury, E. C., Semb, P., Blackwell, N. M. and Kabouridis, P. S. (2004) Regulation of T-cell receptor signalling by membrane microdomains. *Immunology* **113**, 413–426
- 45 Sorice, M., Longo, A., Garofalo, T., Mattei, V., Misasi, R. and Pavan, A. (2004) Role of GM3-enriched microdomains in signal transduction regulation in T lymphocytes. *Glycoconj. J.* **20**, 63–70
- 46 Wang, X., Sun, P. and Paller, A. S. (2003) Ganglioside G_{M3} blocks the activation of epidermal growth factor receptor induced by integrin at specific tyrosine sites. *J. Biol. Chem.* **278**, 48770–48778
- 47 Svennerholm, L. (1963) Chromatographic separation of human brain gangliosides. *J. Neurochem.* **10**, 613–623

Received 21 July 2005/9 November 2005; accepted 11 November 2005

Published as BJ Immediate Publication 11 November 2005, doi:10.1042/BJ20051189

CAPÍTULO 2

Transferência de esfingolipídios de células estromais para células precursoras mielóides e determinação do perfil de gangliosídios de frações de membrana correspondentes a *rafts* em células AFT-024.

(Dados complementares)

INTRODUÇÃO

Um dos fatores de crescimento envolvidos no processo de diferenciação hematopoiética é o GM-CSF (fator de estimulação de colônias de granulócitos e macrófagos), cujo papel na regulação do crescimento e diferenciação de células mielopoiéticas parece estar associado à sua interação eletrostática com glicosaminoglicanos presentes nas membranas de células do estroma (Griffin *et al.*, 1990; Alvarez-Silva & Borojevic, 1996). Essa associação depende de uma diminuição no pH local, a qual promove mudanças conformacionais no GM-CSF, tornando-o capaz de interagir com os glicosaminoglicanos. A acidificação do microambiente pode estar relacionada com a presença de lipídios carregados negativamente na membrana celular tanto de células do estroma quanto de células hematopoiéticas (Wettreich *et al.*, 1999; Borojevic *et al.*, 2003).

Estudos de nosso grupo de pesquisa sobre a produção, a distribuição e a função dos gangliosídios em modelos experimentais de mielopoiese têm demonstrado que o GM3 é o principal gangliosídio em diferentes estromas mielossuportivos, como as linhagens celulares AFT-024, S17 e GR (Ziulkoski *et al.*, 2006a; Ziulkoski *et al.*, 2006b; Andrade *et al.*, 2006). Já a linhagem precursora mielóide FDC-P1 acumula apenas pequena quantidade de GM3. Sabe-se também que o gangliosídio GM3 liberado pelas células AFT-024 é incorporado seletivamente pelas células FDC-P1, com segregação em *rafts* e colocalização com a cadeia α do receptor de GM-CSF, indicando uma possível relação deste gangliosídio com a sinalização mielopoiética intermediada por GM-CSF (Ziulkoski *et al.*, 2006a).

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi determinar a composição em gangliosídios das frações de membrana insolúveis a detergente das linhagens FDCP-1, derivada de células precursoras mielóides e AFT-024, representativa do estroma mielossuportivo de fígado fetal murino. Além disso, este capítulo contém dados que complementam os resultados já publicados da transferência de GM3 das células AFT-024 para as células FDC-P1.

METODOLOGIA

Materiais

Os meios de cultivo celular DMEM e RPMI 1640, a C₆-N-(7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-il)-ceramida (C₆-NBD-ceramida) e os padrões lipídicos foram obtidos da Sigma-Aldrich; o soro fetal bovino (SFB) da Cultilab; D-[U-¹⁴C]galactose (300 mCi/mmol) e o ECL da Amersham; as garrafas e placas plásticas para cultura da Nunc; o Fluorsave[®] da Calbiochem; as placas cromatográficas de sílica-gel para cromatografia em camada delgada de alta performance (HPTLC) da Merck; os anticorpos secundários anti-*mouse* conjugado a CY3 e anti-*mouse* acoplado a peroxidase da Jackson ImmunoResearch; os filmes autorradiográficos da Kodak. O anticorpo monoclonal anti-GM3 secretado pelo hibridoma DH2 foi generosamente cedido pelo Dr. Sen-itiroh Hakomori, Universidade de Washington, Seattle, EUA, e o anticorpo policlonal anti-βintegrina foi generosamente cedido pela Dr.^a Carmem Gottfried, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Cultura de células

A linhagem precursora mielopoietica FDPC-1, dependente de IL-3 ou GM-CSF, foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro, foi mantida em meio RPMI 10% SFB, suplementado com 10% de meio condicionado de WeHi como fonte exógena de IL-3, mantida a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. A linhagem celular AFT-024, derivada de fígado fetal murino, obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro, foi cultivada em meio RPMI 10% SFB e mantida nas mesmas condições citadas acima. Para obter coculturas, células FDC-P1 foram lavadas com solução salina tamponada livre de cálcio e magnésio (CMF-BSS) para remover IL-3 e GM-CSF e inoculadas (1 x 10⁵ células por poço) sobre as camadas semi-confluentes de células AFT-024 cultivadas em placas de 24 poços.

Imunocitoquímica

Camadas semi-confluentes de células AFT-024 e coculturas (mantidas por 12 h) cultivadas sobre lamínulas foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 min, lavadas com PBS e incubadas em PBS contendo 3% de albumina de soro bovino por 1 h a 37°C para bloquear sítios de ligação inespecíficos. Os procedimentos imunocitoquímicos foram realizados como descrito por Crespo e colaboradores (2004). Como anticorpo primário foi utilizado anticorpo monoclonal anti-GM3 (clone DH2, *mouse*) e como anticorpo secundário anticorpo monoclonal anti-*mouse* conjugado a CY3 (1:1000). Após lavagem final com PBS, as preparações foram montadas com Fluorsave[®]. Imagens confocais foram obtidas usando microscópio confocal Carl Zeiss LSM5 Pascal (Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) equipado com um laser de argônio/hélio/neon e uma objetiva de imersão em óleo de 63 x (abertura de 1,4) (Zeiss Plan-Apochromat). Alternativamente, os esfingolipídios das culturas de AFT-024 coculturas foram visualizados pela fluorescência intrínseca da C₆-NBD-ceramida, 15 minutos após a adição de meio contendo 5 µM de C₆-NBD-ceramida e após 2 horas de incubação. A transferência de fluorescência derivada de C₆-NBD-ceramida de células AFT-024 para as células FDC-P1 foi visualizada em coculturas em que o estroma havia sido previamente incubado por 12 h com C₆-NBD-ceramida. As células FDC-P1 foram semeadas após a retirada do meio contendo a ceramida fluorescente e as coculturas visualizadas após incubação por 6 h.

Marcação metabólica e análise dos glicoesfingolipídios

As culturas foram incubadas em meio contendo [¹⁴C]-galactose 0,5 µCi/mL por 12 h, lavadas com PBS e raspadas. Os lipídios foram extraídos com clorofórmio/ metanol (2:1, v/v), purificados em coluna Sep Pack C18 (Williams & McCluer, 1980) e separados por HPTLC desenvolvida em cuba descrita por Nores e colaboradores (1994) no seguinte sistema: uma primeira eluição com clorofórmio: metanol (4:1, v/v) e uma segunda eluição com

clorofórmio/ metanol/ cloreto de cálcio 0,25% (60:36:8, v/v/v). As bandas radioativas foram visualizadas por fluorografia da placa cromatográfica, identificadas por comparação com padrão e quantificadas por densitometria do filme fluorográfico em densitômetro CS 930 Shimadzu UV/vis.

Solubilidade ao Triton X-100

Células marcadas metabolicamente com [¹⁴C]-galactose 0,5 µCi/mL por 12 h foram lavadas com PBS, coletadas e imediatamente tratadas com Triton X-100 1% por 1 h a 4°C, sob agitação periódica (a cada 10 min). Após, as amostras foram centrifugadas por 1 h, 4°C, a 100 000 x g e as frações solúvel (sobrenadante) e insolúvel (*pellet*) foram separadas (Crespo *et al.*, 2004). Os lipídios das duas frações foram extraídos por partição lipídica de Folch (1957). A fração clorofórmica foi purificada por coluna DEAE Sephadex A50 seguida de coluna Sep Pack C18 e os lipídios foram analisados por HPTLC como descrito acima.

Separação por gradiente de sacarose

As células foram lisadas em 0,5 mL de tampão de lise TNE (NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Na₂CO₃ 0,1 M, aprotinina 5 µg/mL, leupeptina 0,5 µg/mL, pepstatina 0,7 µg/mL e Tris/HCl 25 mM, pH 7.5) contendo Triton X-100 1% (m/v), a 4 °C por 1 h. Os lisados foram adicionados sobre gradiente de sacarose contínuo (5 – 35 %) em tampão TNE e centrifugados por 10 h, 150 000 x g a 4 °C (Zurita *et al.*, 2004). Doze frações foram coletadas a partir do fundo do tubo. Os lipídios de cada fração foram extraídos por partição lipídica de Folch, purificados em coluna DEAE Sephadex A50 e Sep Pack C18, e analisados por HPTLC como descrito acima. A fração protéica resultante da partição de Folch foi solubilizada em tampão Laemmli e submetida à eletroforese e Western blotting.

Eletoforese e *Western blotting*

Frações obtidas do gradiente de sacarose foram submetidas à eletroforese com SDS (12%, m/v) sob condições redutoras (2-mercaptoetanol 2%, m/v). As proteínas foram transferidas eletroforéticamente para membranas de nitrocelulose por 1 h a 300 mA (Towbin *et al.*, 1979) e as bandas foram reveladas por coloração com Ponceau S. Para *imunoblotting* (Zurita *et al.*, 2001), os sítios de ligação inespecífica foram bloqueados por incubação com solução salina Tris-tampoadada (NaCl 400 mM/ tampão Tris 100mM/ HCl tampão, pH 7,5) contendo polivinilpirrolidona 40 2,5 % (m/v) e albumina 2,5 % (m/v). As membranas foram incubadas com anticorpo anti- β integrina (1:200, *mouse*) e depois com anticorpo secundário anti-*mouse* acoplado a peroxidase (1:1000). As bandas imunoreativas foram reveladas com um sistema amplificador de quimioluminescência (ECL, Amershan Pharmacia Biotech) e detectadas em filme Kodak Biomax MS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tendo em vista nossos resultados prévios da transferência de GM3 das células estromais AFT-024 para as células mielóides FDC-P1 e no intuito de obter uma evidência direta da transferência de esfingolipídios no modelo de estroma mielossuportivo, realizamos experimentos de adição de C₆-NBD-ceramida, a qual é intrinsecamente fluorescente, ao meio de cultura. As imagens obtidas 15 minutos após a adição do fluoróforo às células AFT-024 demonstram uma marcação concentrada na região perinuclear (Figura 1A), com a marca fluorescente deslocando-se para a região citosólica e membrana plasmática após 2 horas de incubação (Figura 1B). Esses resultados sugerem que após captação e transporte intracelular, uma fração da C₆-NBD-ceramida pode, eventualmente, ser utilizada como substrato para a

síntese de esfingolipídios e seus metabólitos fluorescentes podem ser visualizados, conforme previamente relatado por Koval e Pagano, (1991) e van der Bijl e colaboradores (1996).

Quando células FDC-P1 foram inoculadas sobre as células estromais previamente incubadas com C₆-NBD-ceramida, uma fluorescência intensa pode ser observada nas células progenitoras mielóides (Figure 2 A e D). Uma distribuição subcelular similar pode ser observada quando o gangliosídeo GM3 foi imunodetectado com o anticorpo monoclonal DH2 (Figure 2 B e E). Em ambos os casos, as células estromais permaneciam marcadas na área perinuclear, correspondendo à área do complexo de Golgi onde a ceramida é metabolizada. A sobreposição das imagens indica que uma fração dos metabólitos derivados da ceramida fluorescente pode corresponder ao gangliosídeo GM3 (Figura 2 C e F, coloração amarelada). O *capping* de GM3, já observado em estudos anteriores (Ziulkoski *et al.*, 2006), também foi evidente nestes experimentos (Figura 2B). Estes resultados vão ao encontro das observações prévias de um *capping* extensivo de estruturas semelhantes à *rafts* na membrana dos estromas em contato com células FDC-P1 (Borojevic *et al.*, 2003). O conjunto desses resultados contribui para a confirmação da transferência de GM3 de células estromais para células precursoras mielóides e para a hipótese da formação de regiões de membrana enriquecidas em proteoglicanos, glicoesfingolipídios e fatores de crescimento na interface entre estromas e células-alvo.

Uma vez que nossos resultados indicam a presença de glicoesfingolipídios em *rafts*, resolvemos analisar a distribuição desses lipídios nas frações de membrana solúvel e insolúvel a detergente. O perfil de gangliosídios encontrado para as duas linhagens celulares está em conformidade com resultados anteriores (Ziulkoski *et al.*, 2006a), sendo os gangliosídios GM3 e GD1a encontrados em maior quantidade na linhagem AFT-024, enquanto a linhagem FDC-P1 acumula principalmente GM1 e GD1a (Figura 3 e Tabela 1). Todos os gangliosídios encontrados nas duas linhagens celulares estudadas se distribuem entre as frações solúvel e

insolúvel a Triton X-100. No entanto, proporções maiores de GM1 são encontradas na fração insolúvel das células FDC-P1, enquanto proporções maiores de GM3 são encontradas na mesma fração das células AFT-024 (Figura 3 e Tabela 1). Esses resultados sugerem para a presença de GM1 e de GM3 em *rafts* nas células FDC-P1 e AFT-024, respectivamente, e apontam para uma diferença na constituição dessas estruturas membranares nos dois tipos celulares quando cultivados isoladamente.

Com o objetivo de confirmar a presença de GM3 em *rafts* nas células AFT-024, submetemos a fração insolúvel a Triton X-100 de células AFT-024 a fracionamento em gradiente de sacarose e analisamos sua composição em glicosfingolipídios. Pode-se observar a presença de GD1a em praticamente todas as frações do gradiente (Figura 4A), enquanto bandas correspondentes ao gangliosídeo GM1 não foram detectadas, possivelmente por este ser um gangliosídeo presente em menor quantidade neste tipo celular. Por outro lado, o gangliosídeo GM3 somente foi detectado nas frações superiores do gradiente de sacarose, as quais constituem frações menos densas e nas quais ficam retidas as estruturas de membrana correspondentes a *rafts* ou GEMs (frações de membrana enriquecidas em glicosfingolipídios). Esses resultados sugerem a presença de *rafts* contendo tanto GM3 como GD1a nas células AFT-024, ou de dois tipos de *rafts* diferentes: *rafts* enriquecidos em GM3 e *rafts* enriquecidos em GD1a, podendo cada qual ter uma função celular distinta. Diferenças na distribuição celular de *rafts* enriquecidos em diferentes gangliosídeos já foram descritas para células polarizadas (Gómez-Moutón *et al.*, 2001; Giebel *et al.*, 2004), assim como *rafts* com composição distinta em gangliosídeos têm sido associados a diferentes moléculas de adesão e sinalização celular (Gómez-Moutón *et al.*, 2001; Chigorno *et al.*, 2000)

Vários trabalhos têm demonstrado a interferência do gangliosídeo GM3 sobre a ligação de moléculas de adesão a receptores de integrina. O GM3 exerce regulação positiva sobre o receptor de integrina $\alpha_5\beta_1$ (Zheng *et al.*, 1993) e promove a interação entre a integrina α_3 e a

tetraspanina CD9 (Kawakami *et al.*, 2002). Além disso, a adesão de células de melanoma a células endoteliais parece ser um fenômeno dependente de GM3 (Song *et al.*, 1998). Sendo assim, resolvemos analisar a distribuição de β integrina nas frações do gradiente de sacarose. Os resultados demonstram a presença da cadeia β de integrina nas frações mais densas do gradiente (Figura 4B). Além disso, a banda correspondente a β integrina também foi detectada nas frações menos densas do gradiente, indicando sua possível presença em *rafts*. No entanto, é impossível determinar o quanto a presença de β integrina se correlaciona com os gangliosídeos GM3 ou GD1a. Experimentos de co-localização e/ou co-imunoprecipitação são necessários para esclarecer essa questão.

REFERÊNCIAS

- Alvarez-Silva, M. Borojevic, R. (1996) GM-CSF and IL3 activities in schistosomal liver granulomas are controlled by stroma associated heparan sulfate proteoglycans. *J. Leuk. Biol.* **59**, 435-441.
- Andrade, C.M.B., Ziulkoski, A.L., dos Santos, A.X.S., Sisti, E., Trindade, V.M.T., Borojevic, R., Guma, F.C.R. (2006) Gangliosides regulate the capacity of stromal cells to support myelopoiesis. Manuscrito em preparação.
- Borojevic, R., Carvalho, M.A., Corrêa-Junior, J.D., Arcanjo, K., Gomes, L., Joazeiro, P.P., 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.
- Chigorno, V., Palestini, P., Sciannamblo, M., Dolo, V., Pavan, A., Tettamanti, G., Sonnino, S. (2000) Evidence that ganglioside enriched domains are distinct from caveolae in MDCK II and human fibroblast cells in culture. *Eur. J. Biochem.* **267**, 4187-4197.

- Crespo, P.M., Zurita, A.R., Giraudo, C.G., Maccioni, H.J.F., Daniotii, J.L. (2004) Ganglioside glycosyltransferases and newly synthesized gangliosides are excluded from detergent-insoluble complexes of Golgi membranes. *Biochem. J.* **377**, 561-568
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H. (1957) A simple method for isolation of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509.
- Giebel, B., Corbeil, D., Beckmann, J., Höhn, J., Freund, D., Giesen, K., Fischer, F., Kögler, G., Wernet, P. (2004) Segregation of lipid raft markers including CD133 in polarized human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **104**, 2332-2338.
- Gómez-Moutón, C., Abad, J.L. Mira, E., Lacalle, R.A., Gallardo, E., Jiménez-Baranda, S., Illa, I. Bernad, A., Mañes, S., Martínez-A, C. (2001) Segregation of leading-edge and uropod components into specific lipid rafts during T cell polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 9642-9647.
- Griffin, J.D., Cannistra, A.S., Sullivan, R, Demetri, G.D., Ernst, T.J., Kanakura, Y. (1990) The biology of GM-CSF: regulation of production and interaction with its receptor. *Int. J. Cell Cloning* **8** (S1), 35-44.
- Kawakami, Y., Kawakami, K., Steelant, W.F., Ono, M., Baek, R.C., Handa, K., Withers, D.A., Hakomori, S. (2002) Tetraspanin CD9 is a “proteolipid”, and its interaction with α_3 integrin in microdomain is promoted by GM3 ganglioside, leading to inhibition of laminin-5-dependent cell motility. *J. Biol. Chem.* **277**, 34349-34358.
- Koval, M. and Pagano, R.E. (1991) Intracellular transport and metabolism of sphingomyelin. *Biochim. Biophys. Acta* **1082**, 113-125.
- Nores, G.A., Mizutamari, R., Kremer, M. (1994) Chromatographic tank designed to obtain highly reproducible HPTLC-chromatograms of gangliosides and neutral glycosphingolipids. *J. Chromatography* **686**, 155-157.
- Song, Y., Withers, D.A., Hakomori, S. (1998) Globoside-dependent adhesion of human embryonal carcinoma cells, based on carbohydrate-carbohydrate interaction, initiates

- signal transduction and induces enhanced activity of transcription factors AP1 and CREB. *J. Cell. Bio.* **273**, 2517-2525.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- van der Bijl, P., Lopes-Cardozo, M., van Meer, G. (1996) Sorting of newly synthesized galactosphingolipids to the two surface domains of epithelial cells. *J. Cell. Biol.* **132**, 813-821.
- Wettrich, A., Sebollela, A., Carvalho, M.A., Azevedo, S.P., Borojevic, R., Ferreira, S.T. and Coelho-Sampaio, T. (1999) Acidic pH modulates the interaction between human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* **274**, 31468-31475.
- Williams, M.A., McCluer, R.H. (1980) The use of Sep-Pak C18 cartridges during the isolation of gangliosides. *J. Neurochem.* **35**, 266-269.
- Ziulkoski, A.L., Andrade, C.M., Crespo, P.M., Sisti, E., Trindade, V.M.T, Daniotti, J.L., Guma, F.C., Borojevic, R. (2006a) Gangliosides of myelosupportive stroma cells are transferred to myeloid progenitors and are required for their survival and proliferation. *Biochem J.* **394**, 1-9.
- Ziulkoski, A.L., Andrade, C.M., Sisti, E., Trindade, V.M.T, Guma, F.C., Borojevic, R. (2006b) Relationship between gangliosides and myelosupportive capacity of stromal cells. *Manuscrito em preparação.*
- Zheng, M., Fang, H., Tsuruoka, T., Tsuji, T., Tomikazu Sasaki, T., Hakomori, S. (1993) Regulatory role of GM3 ganglioside in $\alpha 5\beta 1$ integrin receptor for fibronectin-mediated adhesion of FUA169 cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 2217-2222.

Zurita, A.R., Maccioni, H.J., Daniotti, J.L. (2001) Modulation of epidermal growth factor receptor phosphorylation by endogenously expressed gangliosides. *Biochem. J.* **355**, 465-72.

Zurita, A.R., Crespo, P.M., Koritschner, N.P., Daniotti, J.L. (2004) Membrane distribution of epidermal growth factor receptors in cells expressing different gangliosides. *Eur. J. Biochem.* **271**, 2428-2737.

Tabela 1: Análise densitométrica das bandas autorradiográficas dos glicosíngolipídios das frações solúvel e insolúvel a Triton X-100 de células AFT-024 e FDC-P1. As culturas foram marcadas com [¹⁴C]-galactose e tratadas ou não com Triton X-100. Os lipídios foram extraídos, purificados, separados por HPTLC e visualizados por fluorografia. Os resultados estão expressos como percentual da incorporação total e são representativos de três experimentos com resultados similares. C, controle; FS, fração solúvel a detergente; FI, fração insolúvel a detergente.

	AFT-024			FDC-P1		
	C	FS	FI	C	FS	FI
GD1b	Nd	Nd	Nd	9,3	21,0	13,5
GD1a	24,3	66,1	48,7	26,5	43,1	43,1
GD3	Nd	Nd	Nd	4,5	4,0	4,6
GM1	7,1	8,1	9,4	25,7	29,0	35,9
GM2	3,4	3,2	3,1	3,5	1,3	0,4
GM3	32,4	22,7	38,8	3,2	1,5	2,4
CTetH	8,8	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
PC	8,2	Nd	Nd	7,5	Nd	Nd
CDH	3,3	Nd	Nd	2,5	Nd	Nd
CMH	12,4	Nd	Nd	17,2	Nd	Nd

GM3, GM2, GM1, GD3, GD1a, GD1b: gangliosídeos; CTetH: ceramida tetrahexose; CDH: ceramida dihexose; CMH, ceramida monohexose; PC: fosfatidilcolina; Nd: não detectado.

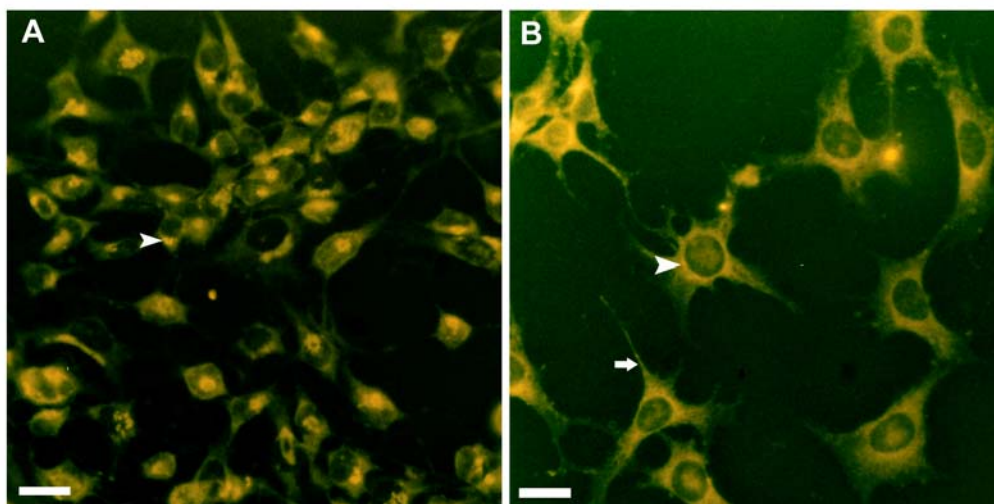


Figura 1 Imagens representativas de esfingolípídios marcados com ceramida fluorescente em células AFT-024. As células AFT-024 foram incubadas com C₆-NBD-ceramida 5 μ M for 15 min. Em seguida, as culturas foram lavadas com solução salina e incubadas por 2 horas em meio fresco. **A**, fluorescência observada após 15 minutos de incubação com C₆-NBD-ceramida. **B**, fluorescência observada após 2 horas de incubação das células estromais em meio fresco. Secções confocais simples de 0,6 μ m tomadas paralelamente às preparações. As pontas de setas indicam região perinuclear, enquanto a seta indica região de membrana plasmática. Barras: 10 μ m.

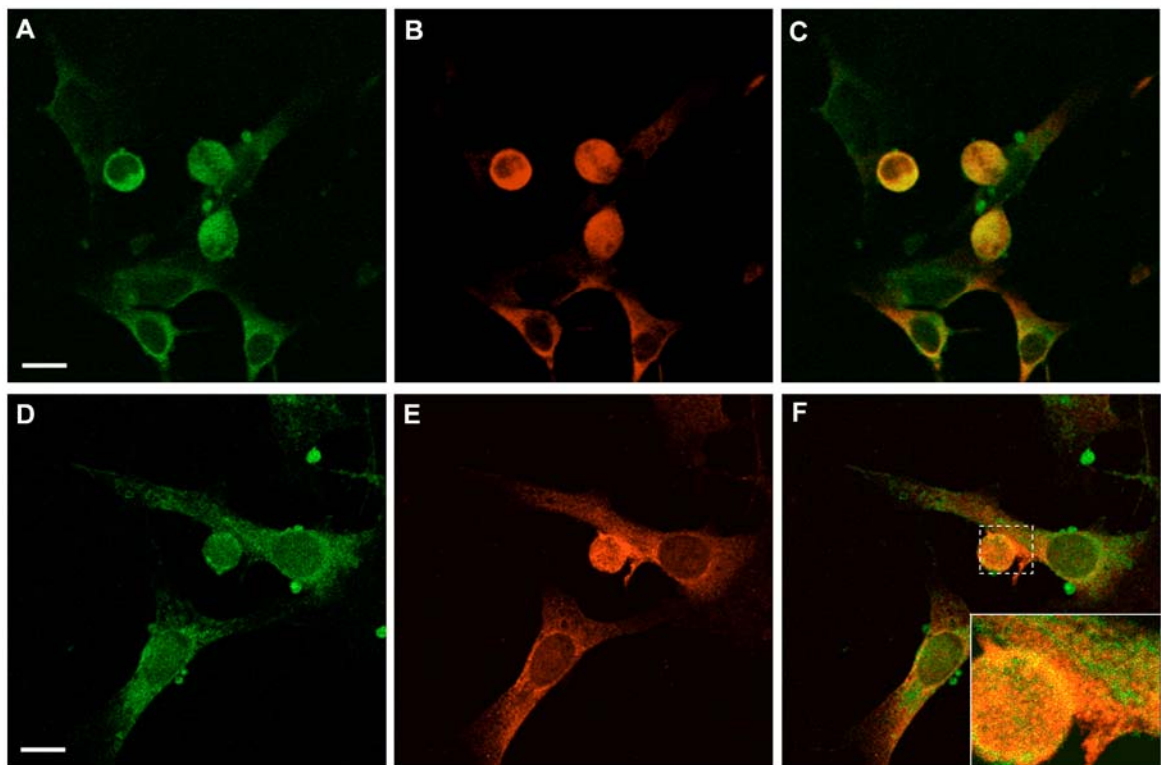


Figura 2 Imagens representativas da transferência de esfingolípídios das células AFT-024 para as células FDC-P1 em sistemas de cocultivo. As células AFT-024 foram incubadas com C₆-NBD-ceramida 5 μM por 12 h. O meio de cultura foi retirado, os estromas foram lavados, as células FDC-P1 previamente lavadas foram inoculadas e cultivadas por 6 h. Após fixação, as células foram imunomarcadas para GM3 com anticorpo monoclonal DH2. **A e D**, esfingolípídios de coculturas examinadas pela fluorescência intrínseca da C₆-NBD-ceramida incorporada pelas células AFT-024. **B e E**, cocultura imunomarcada para GM3 com anticorpo monoclonal DH2. **C e F** correspondem às imagens sobrepostas de **A e B**, **C e D**, respectivamente. Secções confocais simples de 0,6 μm tomadas paralelamente às preparações. **Inset**: representa a região de contato entre as células AFT-024 e FDC-P1. Barras: 10 μm.

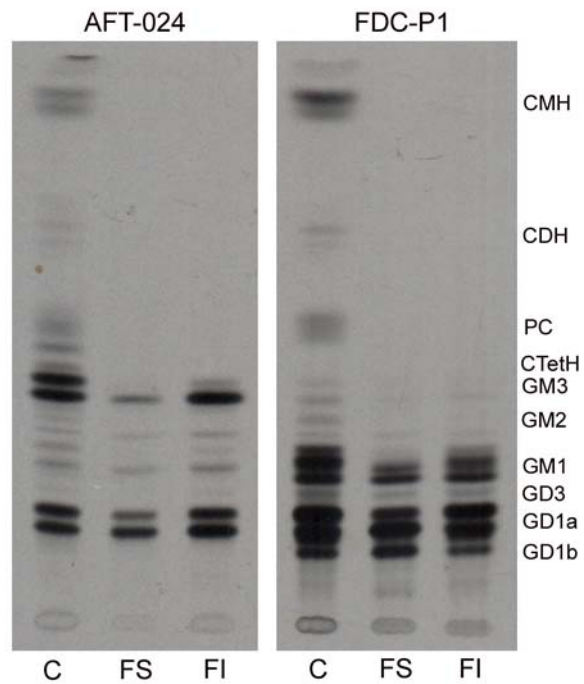


Figura 3 Solubilidade de glicosfingolípídios das linhagens AFT-024 e FDCP-1 a Triton X-100. As culturas foram marcadas com [^{14}C]-galactose 0,5 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ e tratadas ou não com Triton X-100. Os lípidios foram extraídos, purificados, separados por HPTLC e visualizados por fluorografia. C, controle; FS, fração solúvel a detergente, ou sobrenadante; FI, fração insolúvel a detergente, ou *pellet*. GM3, GM2, GM1, GD3, GD1a, GD1b: gangliosídios; CTetH: ceramida tetrahexose; CDH: ceramida dihexose; CMH, ceramida monohexose; PC: fosfatidilcolina.

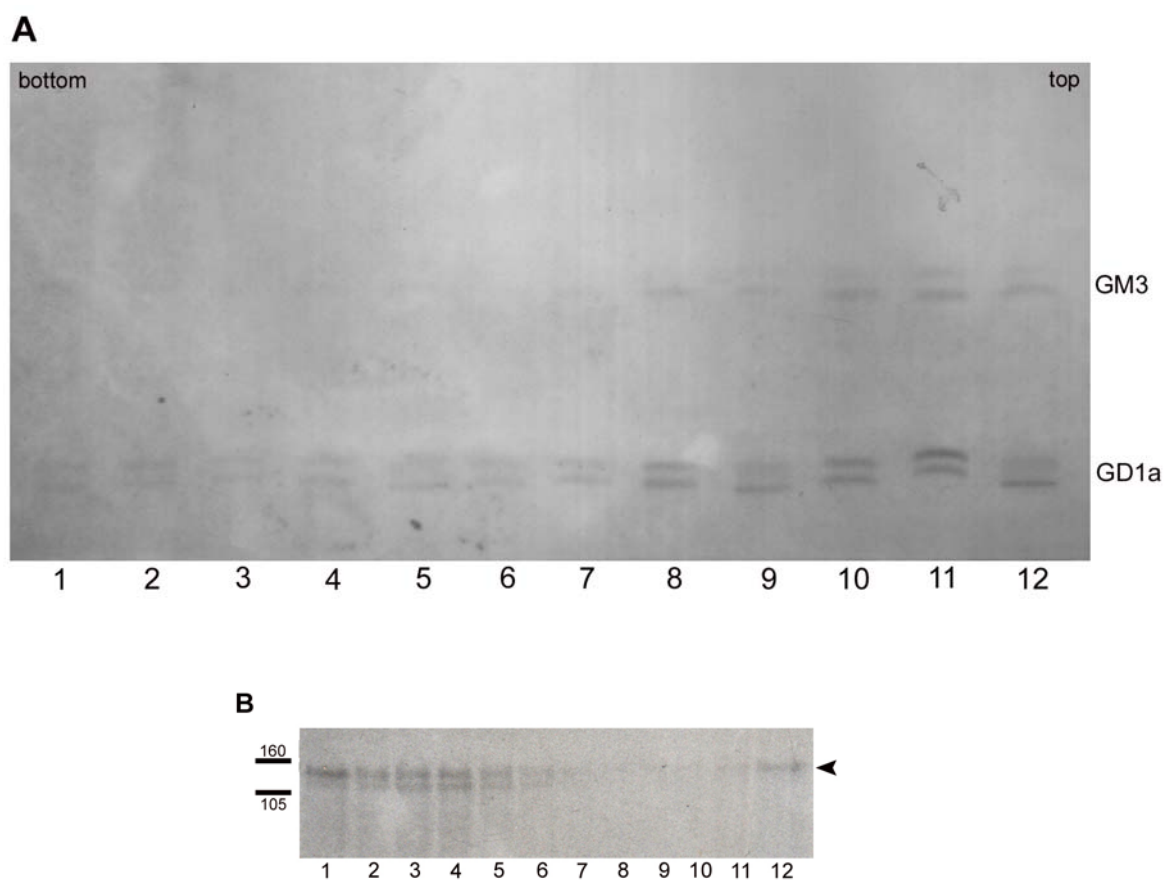


Figura 4 Distribuição de gangliosídios (A) e imunodeteccção de β integrina (B) nas frações obtidas do gradiente de sacarose contínuo (5 - 35%) após lise das células AFT-024 com Triton X-100 a 4°C. As células foram lisadas a 4 °C por 1 h contendo Triton X-100 1%, os lisados foram adicionados sobre gradiente de sacarose contínuo (5 – 35 %) em tampão TNE e centrifugados por 10 h, 150 000 x g a 4 °C. Os lipídios de cada uma das 12 frações coletadas foram extraídos, purificados e analisados por HPTLC, enquanto as proteínas foram precipitadas, solubilizadas e submetidas à Western blotting.

CAPÍTULO 3

Relationship between gangliosides and myelosupportive capacity of stromal cells

(Manuscrito)

Será submetido ao periódico Journal of Cellular Biochemistry

Relationship between gangliosides and myelosupportive capacity of stromal cells.

Ana L. Ziulkoski^{1,2}, Cláudia M.B. Andrade¹, Elisa Sisti^{1,2}, Aline X.S. dos Santos¹, Vera M.T. Trindade¹, Fátima C.R. Guma¹, Radovan Borojevic^{3*}

1, Laboratório de Bioquímica e Biologia Celular de Lipídios, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil.

2, Instituto de Ciências da Saúde, Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul, Brasil.

3, Departamento de Histologia e Embriologia e Programa Avançado de Biologia Celular Aplicada à Medicina, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

Correspondence to: Radovan Borojevic, Caixa Postal 68021, Cidade Universitária, 1941-970 Rio de Janeiro, Brazil. Tel. 55 21 2590 8736; Fax 55 21 2562 6483; E-Mail: radovan@histo.ufrj.br

Running head: Gangliosides and myelopoiesis support

This manuscript contains two tables and three figures.

ABSTRACT

Stroma-mediated myelopoiesis depends upon growth-factors and an appropriate intercellular microenvironment, whose polarity is relevant for granulocyte-macrophage colony stimulating factor mediated myeloid cell proliferation. In previous studies we have shown that gangliosides produced by fetal liver-derived stromal cells and liver inflammatory granuloma-derived stromal cells were required for the optimal stroma myelosupportive function. Here, we analyzed the pattern cell production and shedding of gangliosides in a bone marrow stroma, a murine hepatic stellate cell line derived from inflammatory fibro-granulomatous reactions that sustain myelopoiesis and primary skin fibroblasts, and compared the ability of these stromata to sustain the survival and proliferation of the myelopoietic progenitor cells. The concentration of sialic acid reflects the myelosupportive capacity of the studied cell stromas. Although the three stromal cells synthesize the same gangliosides their relative content were quite different and GM3 being apparently the major ganglioside species involved for optimal activity of the growth factors. The shedding was similar to the ganglioside synthesis pattern, but the net myelosupportive activity was quite different. FDC-P1 proliferation decreased in stroma cells supernatants obtained from cultures in which ganglioside synthesis was inhibited, as well as in presence of supernatants in which GM3 was neutralized by the anti-GM3 monoclonal antibody. Then, the differences in the capacity of sustain myeloid cell proliferation by presented or soluble growth factor could be related to differences in the concentration of gangliosides present in membrane or shed to supernatants.

INTRODUCTION

Hematopoiesis occurs in liver and spleen during the fetal life and within bone marrow in the adults [Muller et al., 1994; Zon, 1995]. The tightly regulated proliferation, commitment, terminal differentiation and release of hematopoietic precursors occurs normally within the bone marrow microenvironment composed of stroma cells, associated growth factors or cytokines and extracellular matrix. Myeloid cells can further proliferate in peripheral tissues, usually associated with inflammatory reactions, in which local expansion of myeloid cells may contribute to reaction to injury, repair and regeneration. This proliferation has to be tightly controlled in order to avoid adverse effects of chronic inflammation. It is dependent upon locally produced cytokines, or factors brought into the tissue by biological fluids. Carvalho and col. [Carvalho et al., 2000] proposed that the activity of these hemopoietins is dependent upon the quality of the tissue stroma, and in particular of the pericellular glycoconjugates.

Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) is one of the major hemopoietins involved in the control of proliferation and differentiation of myeloid lineages both in bone marrow and in extramedullary sites [Griffin et al., 1994]. Its biological activity has been shown to depend upon the molecular composition and the physicochemical conditions of the microenvironment provided by the supporting stroma. This microenvironment has acid properties, and contains glycoconjugates containing sialic acid and proteoglycans, including heparan-sulfate [Alvarez-Silva and Borojevic, 19996; Borojevic et al., 2003]. In vitro studies demonstrated that GM-CSF and heparin interacted only at low pH, with optimal levels observed between pH 4 and 5. This decrease in pH induces a conformational change in GM-CSF, which would then become able to interact with glycosaminoglycans [Wettreich et al., 1999].

Therefore, negatively charged glycolipids present on the plasma membrane of haematopoietic or/and stromal cells may be required for functional signaling of GM-CSF.

Gangliosides, sialic acid-containing glycosphingolipids, have been associated with cell growth and differentiation in the hematopoietic system. Leukemic cells and normal hematopoietic stem cells are influenced by gangliosides [Nakamura et al. 1991, 1992; Kaucic et al, 1994; Barthi and Singh 2000, 2001], while gangliosides shed by neuroblastoma inhibit haematopoiesis [Sietsma et al., 1998]. Moreover, adhesion, spreading, and motility of cells based on glycolipid-glycolipid interaction [Kojima and Hakomori, 1991] and interactions of gangliosides with integrin $\alpha 5\beta 1$ receptor [Zheng et al, 1993; Wang et al., 2001], EGF receptor [Zhou et al., 1994; Wang et al., 2003], FGF receptor [Rusnati et al., 2002] and insulin receptor [Tagami et al., 2002; Yamashita et al., 2003] have been described. The ability of ganglioside GM3 to activate Src phosphorylation and MAPK was described for Neuro2a cells [Prinetti et al., 1999] and for fibroblast cells [Li et al., 2001], leading to neuritogenesis and to enhanced cell proliferation, respectively.

In a previous study we have shown that GM3 was the major ganglioside produced by fetal liver-derived stromal cells and was required for the optimal stroma myelosupportive function. This ganglioside was released into the supernatant and selectively incorporated into the myeloid progenitor cells, where it segregated into rafts in which it co-localized with the GM-CSF receptor α chain [Ziulkoski et al., 2006]. Moreover, two liver inflammatory granuloma-derived stromal cells (GRWT and GR-IFN γ -R[%]) with a distinct quantitative pattern of gangliosides showed a different myelopoiesis supportive capacity, and the inhibition of ganglioside synthesis decreased the myelopoietic proliferation in both stromal cells. The stroma with higher myelopoietic capacity synthesized more GM3 than GD1a, while the stroma with lower capacity synthesized more GD1a than GM3 [Andrade et al., 2006]. The purpose of the present study was to further evaluate the role of gangliosides in myelopoiesis, monitoring the pattern cell production and shedding of gangliosides in a bone marrow stroma (S17 cell line), a murine hepatic stellate cell line derived from inflammatory fibro-granulomatous reactions that sustain myelopoiesis (GRX cell line) and primary skin

fibroblasts. We compared the ability of these stromata to sustain the survival and proliferation of the myelopoietic progenitor cell line FDC-P1.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), RPMI 1640 medium, and lipid standards were purchased from Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA. Fetal bovine serum (FBS) was obtained from Cultilab, Campinas, SP, Brazil. D-[U-¹⁴C] galactose (300 mCi/mmol) was obtained from Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK. Plastic tissue culture dishes were purchased from Nunc, Roskilde, Denmark. DL-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol (PDMP), the glucosyl ceramide synthase inhibitor, from Calbiochem San Diego, CA, USA. Silica-gel high performance thin layer chromatography (HPTLC) plates were from Merck, Darmstadt, Germany. DH2 monoclonal antibody anti-GM3 was generously supplied by Sen-itiroh Hakomori, University of Washington, Seattle, USA.

Cells and cell cultures

Permanent cell lines were obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (PABCAM, Federal University, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). The murine hematopoietic bone marrow stroma cell line S17 sustains both murine and human hematopoietic cells in vitro [Sczikowski et al., 1992]. The S17 cells were maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS. The GRX and WeHi-3B cells were maintained in DMEM supplemented with 5% and 10% FBS, respectively. The FDC-P1 cell line was maintained in RPMI 1640 medium containing 10% FBS and 10% supernatant of WeHi-3B cells that secrete IL-3 and GM-CSF constitutively. The cultures were maintained under a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C. Primary

cultures of skin fibroblasts that do not sustain myelopoiesis [Carvalho et al., 2000] were obtained from newborn C3H/HeN mice. Mice were killed, their skin harvested and digested by collagenase (1 mg/ mL in DMEM) for 1 h, at 37°C, under stirring. This treatment was followed by trypsin (0.125% in calcium- and magnesium- free balanced salt solution (CMF BSS)) supplemented with 0.05% EDTA, for 30 min at 37°C. The cells were seeded into 25 cm² tissue culture flask in RPMI 1640 10% FBS and subcultured by trypsinization that eliminated the trypsin-resistant macrophages. The obtained skin fibroblasts, referred to as “SF-C3H”, were maintained in culture as described for S17 cells. After the third passage, the cultures were discarded. For a typical coculture experiment, FDC-P1 cells were washed with CMF-BSS in order to remove IL-3. They were inoculated on to the semi-confluent monolayers of S17 or SF cells in 24-well plates (1 x 10⁵ cells per well), and maintained in culture for 24 or 48 h. Cell proliferation was monitored under a phase-contrast-equipped inverted microscope.

Thiobarbituric acid assay for sialic acid

Cells were washed three times with cold phosphate buffered saline (PBS), harvested from the plate with rubber policeman and pelleted by brief centrifugation. Lipids were extracted from cell pellets with chloroform / methanol (2:1, v/v) [Andrade et al., 2006], dried under N₂ atmosphere and hydrolyzed in 0.05 M H₂SO₄ at 80°C for 60 min. Then, the samples were oxidized by addition of 25 μM periodic acid/ 62.5 mM H₂SO₄ at 37°C for 30 min. Oxidation was interrupted by addition of 2% sodium arsenite/ 0.5 M HCl (w/v). This was followed by the addition 6% thiobarbituric acid (w/v), adjusted to pH 9.0 with NaOH, to give a final concentration of at least 1%. The chromophore was developed by heating the reaction mixture in a boiling-water bath for 7.5 min. The color was intensified by the addition of an equal volume of dimethyl sulfoxide [Skoza and Nohos, 1976]. The test mixture was read at the absorption maximum for sialic acid (549 nm). The same test was performed with lipid

extract without hydrolysis. The sialic acid amount was determined by the difference between the absorbance obtained for hydrolyzed and not hydrolyzed samples.

Metabolic labeling and lipid extraction

Cultures of stromal cells that reached confluence and cultures of FDC-P1 cells were incubated with 0.5 $\mu\text{Ci/mL}$ [^{14}C]galactose for 12 h. Subsequently, cells were washed three times with cold PBS, harvested from the plate and pelleted by brief centrifugation. Lipids were extracted from radiolabeled cell pellets with chloroform / methanol (2:1, v/v) [Andrade et al, 2006], and glycosphingolipids were purified by Sep-Pack C18 column [Williams and McCluer, 1980]. The inhibition of PDMP was determined after incubation of stromal cells for 72 h with 10 μM PDMP and incubation with 0.5 $\mu\text{Ci/ mL}$ [^{14}C]galactose for the last 12 h of incubation [Zurita et al., 2001].

Chromatography and analysis of the gangliosides

The purified lipid extract was evaporated under N_2 and run on HPTLC silica gel 60 plates with two successive solvent systems: first chloroform/ methanol (4:1, v/v) and second chloroform/ methanol/ 0.25% aqueous CaCl_2 (60:36:8, v/v). The last migration was developed in a tank described by Nores and col. [1994]. Radioactive sphingolipids were visualized by exposition of a radio-film at -70°C and their relative contribution was determined by densitometric scanning of the X-ray film in a CS 930 Shimadzu UV/ vis densitometer. The standards were visualized by exposure to resorcinol-HCl [Svennerholm, 1963].

Shedding of gangliosides

The S17 cells and SF-C3H cells were metabolically labeled with 0.5 $\mu\text{Ci/ mL}$ [^{14}C]galactose for 12 h, the cells were washed and cultured in fresh medium for 48 h. Subsequently, the culture supernatant was collected, dialyzed against distilled water,

lyophilized and the total lipids were extracted from lyophilized powder with chloroform/methanol (1:1, v/v). The cells were harvested and lipids extracted with chloroform/ methanol (2:1, v/v). The gangliosides present in the cells and in the supernatant were purified and analyzed as previously described [Sietsma et al., 1998].

Determination of FDC-P1 proliferation rate

FDC-P1 cells were inoculated onto 24 culture plates, at 1×10^5 cells per well and maintained in four different medium preparations: (a) RPMI supplemented with 10% FBS and 50% medium conditioned by S17 or GRX cells; (b) RPMI supplemented with 10% FBS and 50% medium conditioned by S17 or GRX cells pre-treated with 10 μ M PDMP; (c) RPMI supplemented with 10% FBS and 50% of medium conditioned by S17 or GRX cells with addition of 10% DH2 hybridoma supernatant (producing monoclonal antibody anti-G_{M3}); (d) RPMI supplemented with 10% FBS, 50% of medium conditioned by S17 cells and 2 μ g/ mL of murine recombinant GM-CSF. After 24 h, the viable cells were counted in a hemocytometer. RPMI supplemented only with 10% FBS was the negative control. RPMI supplemented with 10% FBS and 10% WeHi-3B cell-conditioned medium or with 2 μ g/ mL of murine recombinant GM-CSF were the positive controls. In order to monitor the potential non specific effect of DH2 over FDC-P1 proliferation, cells were maintained in RPMI supplemented with 10% FBS and 20% of DH2. No effect of DH2 antibody was found (data not shown).

Protein quantification

The protein sediments obtained after lipid extractions were dissolved in 1.0 N NaOH and measured as described by Peterson [1977] using bovine serum albumin as standard.

Statistical analysis

Differences among the experimental groups were analyzed by one-way analysis of variance and means were compared by the Duncan test.

RESULTS

Stroma-induced myelopoiesis was monitored using the FDC-P1 myeloid progenitor cell line, which is dependent upon GM-CSF or IL-3. In accordance with previous results on co-cultures of stroma and FDC-P1 cells [Carvalho et al., 2000; Borojevic et al., 2003] the bone marrow stroma-derived S17 cells induced a rapid and intense proliferation of FDC-P1 cells, while SF cells could sustain neither the proliferation nor the survival of the myelopoietic progenitors cells (Figure 1). Co-cultures of GRX and myeloid cells showed that GRX cells were able to sustain the survival and a low proliferation of FDC-P1 cells for 24 hours (Figure 1).

In view of the described role of negatively-charged sialic-acid-containing molecules at the membrane interface between the supporting stroma and the hematopoietic cells [Borojevic et al., 2003], we questioned whether there are differences in the total sialic (*N*-acetylneuramin) acid amount in the three studied stroma cells. The results indicated a high concentration of sialic acid in the bone marrow stroma S17 cells, and smaller amounts in the GRX cells, and a very low level in skin fibroblasts, corresponding to the myelosupportive capacity of the studied cell stromata (Table 1).

We had previously demonstrated that the presence of gangliosides on myeloid FDC-P1 cells was required both for their survival and proliferation in response to growth factors, and that their ganglioside pool could be provided, at least in part, by the myelosupportive stroma [Ziulkoski et al., 2006; Andrade et al., 2006]. Therefore, we analyzed the ganglioside synthesis and shedding from S17, SF and GRX cells (Figure 2). The studied stromata presented gangliosides of the series *a* (GM3, GM2, GM1 and GD1a), similar to the previously

studied AFT-024 and GR cells [Andrade et al., 2006; Ziulkoski et al., 2006]. All the major gangliosides run as doublets, in agreement with the fact of sphingolipids have differences in ceramide structures [Ziulkoski et al., 2001, Andrade et al., 2003]. S17 cells accumulated essentially GM3, to a lower extent a neutral ceramide trihexoside, and a minor amount of GD1a. The SF cells synthesized GM3 and GD1a in similar quantities, while GRX cells synthesized more GD1a than GM3 (Figure 2A, Table 2). These results are similar to those obtained for AFT-024 [Ziulkoski et al., 2006], GRWT and GR-IFN γ -R⁰ cells [Andrade et al., 2006] (Table 3), suggesting that myelosupportive stromata accumulated the ganglioside GM3. Interestingly, the amount of GD1a increased with the reduction of the myelosupportive capacity.

The GM3 ganglioside can be transferred from fetal liver-derived stroma to FDC-P1 cells, on which it co-localizes with the GM-CSF receptor α -chain at the contact region [Ziulkoski et al., 2006]. Therefore, we monitored the shedding of radiolabeled gangliosides from S17, SF and GRX cells. The shedding was similar to the ganglioside synthesis pattern. The only ganglioside shed by S17 was the GM3. SF cells shed GM3, GD1a and GM1 in a lower extent, while GRX conditioned medium contained GD1a, GM1, GM3 and a low amount of GM2 gangliosides (Figure 2B and Table 2).

Taken in consideration the fact that the ganglioside GM3 was present in the conditioned medium of cells that sustained or not the myelopoiesis by contact, as well as the previous reports that the FDC-P1 cell proliferation may be sustained by conditioned medium of stroma cells [Borojevic et al., 2003, Ziulkoski et al., 2006], we questioned whether the capacity of stroma supernatants to support myelopoiesis reflected the presence of gangliosides, and in particular of the ganglioside GM3, when withdrawn from the intercellular microenvironment. The FDC-P1 proliferation was monitored in the standard medium conditioned by S17, SF or GRX cells, as well as in conditioned medium obtained from cells treated with PDMP that inhibited synthesis of all the ganglioside, and in conditioned medium

with addition of neutralizing monoclonal antibody anti-GM3. We found that S17-conditioned medium had a very low capacity to sustain the FDC-P1 cell survival and/ or proliferation (Figure 3A) in accordance with previous results [Borojevic et al., 2003]. Nevertheless, the survival of FDC-P1 cells was even minor in S17-conditioned medium in which the GM3 was depleted (Figure 3A). Notably, the supplementation of S17 supernatant with GM-CSF restored its myelosupportive capacity (Figure 3B), suggesting that S17 cells released soluble GM-CSF in a very low and limiting quantity. This activity could be dependent upon GM3.

On the other hand, the GRX-conditioned medium was able to sustain both survival and proliferation of FDC-P1 cells, having thus a stronger myelosupportive capacity than the S17-condition medium, despite the lower capacity of the former cell line to sustain myelopoiesis in co-culture. This result is similar to the one described for SF cells, which are unable to maintain myelopoiesis in co-cultures through a cell-cell contact with target cells, but whose supernatant sustained the FDC-P1 proliferation [Carvalho et al., 2000]. Moreover, the inhibition of the total ganglioside synthesis in GRX and SF cells, as well as neutralization of GM3 by monoclonal antibody in the conditioned medium, decreased both the FDC-P1 proliferation and survival (Figure 3A).

DISCUSSION

In agreement with previously reported observations, the present study indicated that gangliosides are required for optimal activity of the growth factors that sustain survival and proliferation of myeloid cells in coculture with stroma, the GM3 being apparently the major ganglioside species involved. However, the comparative study of cell-cell versus cell supernatant-dependent myelosupportive activity disclosed an apparent paradox. Supernatants of the stromata that sustained well myelopoiesis had only a low stimulatory activity, while

those from stromata that do not sustain myelopoiesis in co-culture sustained it in suspension. Hence, GM-CSF and GM3 are required and sufficient to promote the signal reception and transduction on FDC-P1 cells. This corroborates our finding that stroma supplies to FDC-P1 cells both the growth factor and the GM3 that is not accumulated in FDC-P1 cells (Ziulkoski et al, 2006), and when both are present in appropriate quantities, the myelosupportive activity is high. Conversely, in cell-cell interactions other components of the myelosupportive stroma activity contribute to the controls. High quantities of GM3 apparently generate optimal conditions for sequestering GM-CSF on the cell membranes, putatively on heparan sulfate proteoglycans as indicated by our previous studies [Alvarez-Silva and Borojevic, 1996; Borojevic et al, 2003]. GM3 can be shed, but heparan sulfate-bound GM-CSF can be only released by high-salt solutions [Carvalho et al. 2000]. Hence, the supernatant of S17 cells contains sufficient GM3 but suboptimal quantity of GM-CSF, having a poor myelosupportive capacity that can be enhanced by supplementation with GM-CSF. The other stromas, which have not a primary myelosupportive function such as the bone marrow stroma, have apparently suboptimal interaction among gangliosides and GM-CSF-binding molecules. In these cells, the growth factor and the gangliosides can be spontaneously released into the supernatant.

The profile of gangliosides released into the supernatant corresponded to that of the synthesized ones in the stroma, with only a few exceptions (such as GD1a in S17 cells). Hence, besides the quantity of the involved compounds, the spatial organization of gangliosides in the cell membranes and/or their association with other membrane components may be required in high cell-cell myelosupportive activity of S17 cells. Conversely, in case of SF, and to lower degree in GRX stromata, the membrane context of molecular complexes required for myelosupportive activity is not optimal or it is even inhibitory. Their shedding into the supernatant releases them from the molecular context of cell membranes, and under a soluble form they display their intrinsic capacity to sustain survival and/or proliferation of

FDC-P1 myeloid progenitors. It should be noted that even in this context, the presence of gangliosides, the major one being apparently the GM3, is still required, and their absence or neutralization in the supernatant is adverse for optimal myelopoiesis. Table 3 summarizes the different results obtained to all stromal cells studied by our group. In mirror experiments to those of the S17 supernatant supplementation with GM-CSF reported in the present study, the conditioned medium of GR IFN γ -R[%] treated with PDMP and supplemented with GM3 recovered the ability to sustain the FDC-P1 proliferation. Similar results were obtained when the GRWT supernatant was supplemented with GM3 (Table 3).

The stroma-dependent growth stimulatory activity has been related to the non-covalent binding of growth factors with cell membrane-associated molecules or with the adjacent extracellular matrix components, suggesting that growth factors might be retained on the stroma layer and presented to the target cells [Gallagher and Dexter, 1988]. Our previous studies have indicated that the biological activity of GM-CSF heavily depended upon tissue cofactors, including both heparan-sulfate proteoglycans and gangliosides [Alvarez-Silva and Borojevic, 1996; Carvalho et al., 2000; Andrade et al., 2006; Ziulkoski et al., 2006]. These results showed the capping of proteoglycans and gangliosides to interface between haemopoietic and stromal cells, suggesting that GM-CSF receptors are sequestered in lipid rafts and modulated by macromolecular complexes, placing the growth factor message in the appropriate required context [Metcalf, 1993]. The local concentration of gangliosides in the intercellular space within the myelopoietic microenvironment is difficult to estimate, but we found that cells with a higher content of sialic acid in lipids showed higher myelosupportive ability. The increased amount of sialic acid could be related to local decreased of pH necessary to interaction of heparan-sulfate and GM-CSF [Wettreich et al., 1999].

The quality of gangliosides can be determinant for the inclusion of receptors into glycolipid-enriched membrane regions (GEM) like rafts, which control the activation, the turnover and the subcellular localization of the signaling compounds [Miljan and Bremer,

2002]. GM3-enriched rafts have been related with FAK, Src kinases and Rho GTPases [Yamamura et al., 1997; Iwabuchi et al., 1998; Chigorno et al., 2000] and this ganglioside has been related with enhanced c-Src phosphorylation and MAPK activation induced by EGF [Prinetti et al., 1999; Li et al., 2001]. The accumulation of GM3 at the cellular monolayer, such as S17 cells, could represent its presence in rafts. Skin fibroblasts have a relatively high amount of GM3, but either the GM3 is not segregated in rafts, or it is associated with molecules that reduce its capacity to interact with the myelopoietic signaling. On the other hand, the ganglioside GD1a has been also involved with EGF signaling, increasing the effective number of EGFRs and stimulating EGFR dimerization [Liu et al., 2004]. Curiously, the amount of GD1a in cells that do not sustain the myeloid cells is higher than in S17 cells and the conditioned medium showed the same result. The role of GD1a in the myelosupportive capacity needs future studies.

Differences in the effects of gangliosides may be dependent upon its concentration and/or location. Gangliosides added to the culture medium can insert into the cell plasma membrane and modify the biological responses of cells to various growth factors [Li et al., 2000]. High concentration of gangliosides inhibited cell growth when continuously present in culture medium during incubation of cells with growth factors but low concentrations caused an increase in phosphorylation of transducers and enzymes such as MAPK [Li et al., 2001]. Moreover, it has been suggested that the exogenous ganglioside effect depends on the state of cell confluence in culture, and that gangliosides have a bimodal effect on DNA synthesis [Saqr et al., 1995]. Conversely, clustered glycosphingolipids themselves may also initiate signal transduction through the interaction of aliphatic chains of the transducer molecules with the lipid portion of glycosphingolipids in the microdomains [Iwabuchi et al., 1998]. The differences in the capacity of sustain myeloid cell proliferation by presented or soluble growth factor could be related to differences in the concentration of gangliosides present in rafts or shed to supernatant and their uptake by myeloid cells. Further studies are needed to determine

whether gangliosides are transferred to myeloid cells from the studied stromal cells like to fetal liver derived stroma and how gangliosides interact with the growth factor receptor.

REFERENCES

- Alvarez-Silva M, Borojevic R. 1996. GM-CSF and IL3 activities in schistosomal liver granulomas are controlled by stroma associated heparan sulfate proteoglycans. *J Leuk Biol* 59: 435-441.
- Andrade CMB, Trindade VMT, Cardoso CCA, Ziulkoski AL, Trugo LC, Guaragna RM, Borojevic R, Guma FCR. 2003. Changes of sphingolipid species in the phenotype conversion from myofibroblasts to lipocytes in hepatic stellate cells. *J Cel Biochem* 88: 533-544.
- Andrade CMB, Ziulkoski AL, dos Santos AXS, Sisti E, Trindade, VMT, Borojevic R, Guma FCR. 2006. Gangliosides regulate the capacity of stromal cells to support myelopoiesis. Manuscript in preparation.
- Barthi AC, Singh SM. 2001. Gangliosides derived from a T cell lymphoma inhibit bone marrow cell proliferation and differentiation. *Int Immunopharm* 1: 155-165.
- Bharti AC, Singh SM 2000. Induction of apoptosis in bone marrow cells by gangliosides produced by a T cell lymphoma. *Immunol Let* 72: 39-48.
- Borojevic R, Carvalho MA, Corrêa-Junior JD, Arcanjo K, Gomes L, Juazeiro PP, Wetthreich A, Coelho-Sampaio T. 2003. Stroma-mediated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) stimulation of myelopoiesis: spatial organisation of intercellular interactions. *Cell Tissue Res* 313: 55-62.
- 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.

- Chigorno V, Palestini P, Sciannamblo M, Dolo V, Pavan A, Tettamanti G, Sonnino S. 2000. Evidence that ganglioside enriched domains are distinct from caveolae in MDCK II and human fibroblast cells in culture. *Eur J Biochem* 267: 4187–4197.
- Gallager JT, Dexter TM. 1988. Binding of growth factors to heparan sulphate: implications for the regulation of haemopoiesis by bone marrow stromal cells. In: Baum SJ, Dicke K, Lotzova E, Plyznik DH, editors. *Experimental haematology today*. Springer: New York. p 36-43.
- Griffin JD, Cannistra AS, Sullivan R, Demetri GD, Ernst TJ, Kanakura Y. 1990. The biology of GM-CSF: regulation of production and interaction with its receptor. *Int J Cell Cloning* 8 (S1): 35-44.
- Iwabuchi K, Handa K, Hakomori S. 1998. Separation of "glycosphingolipid signaling domain" from caveolin-containing membrane fraction in mouse melanoma B16 cells and its role in cell adhesion coupled with signaling. *J Biol Chem* 273: 33766–33773.
- Kaucic K, Grovas A, Li R, Quinones R, Ladisch S. 1994. Modulation of human myelopoiesis by human gangliosides. *Exp Hematol* 22: 52-59.
- Kojima N, Hakomori S. 1991. Cell adhesion, spreading, and motility of GM3-expressing cells based on glycolipid-glycolipid interaction. *J Biol Chem* 266 (26): 17552-17558.
- Li R, Manela J, Ladisch S. 2000. Cellular gangliosides promote growth factor-induced proliferation of fibroblasts. *J Biol Chem* 275: 34213-34223.
- Li R, Liu Y, Ladisch S. 2001. Enhancement of epidermal growth factor signaling and activation of Src kinase by gangliosides. *J Biol Chem* 276: 42782-42792.
- Liu Y, Li R, Ladisch S. 2004. Exogenous ganglioside GD1a enhances epidermal growth factor receptor binding and dimerization. *J Biol Chem* 279: 36481-36489.
- Metcalf D. 1993. Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety? *Blood* 82: 3515-3523.
- Miljan EA, Bremer EG. 2002. Regulation of growth factor receptors by gangliosides. *SciSTKE* 2002 (160): RE15.

- Muller AM, Medvinsky A, Stroubolius J, Grosveld F, Dzierzak E. 1994. *Immunity* 1: 291-301.
- Nakamura M, Tsunoda A, Sakoe K, Gu J, Nishikawa A, Taniguchi N, Satio M. 1992. Total metabolic flow of glycosphingolipid biosynthesis is regulated by UDP-GlcNAc:lactosylceramide beta 1→3 N-acetylglucosaminyltransferase and CMP-NeuAc:lactosylceramide alpha2→3 sialyltransferase in human hematopoietic cell line HL-60 during differentiation. *J Biol Chem* 267 (33): 23507-23514.
- Nakamura O, 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; 1940-1945.
- Nores GA, Mizutamari R, Kremer M. 1994. Chromatographic tank designed to obtain highly reproducible HPTLC-chromatograms of gangliosides and neutral glycosphingolipids. *J Chromatography* 686: 155-157.
- Peterson GL. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al which is more generally applicable. *An Biochem* 83: 346-356.
- Prinetti A, Iwabuchi K, Hakomori S. (1999). Glycosphingolipid-enriched signaling domain in mouse neuroblastoma Neuro2a cells. *J Biol Chem* 274: 20916-20924.
- 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 USA* 99: 4367-4372.
- Sagr H, Lee MC, Burkman AM, Yates AJ. 1995. Gangliosides have a bimodal effect on DNA synthesis in U-1242 MG human glioma cells. *J Neurosci Res* 41: 491-500.
- Szikowski M, Robertson D, Gordon MY. 1992. Synthesis and deposition of glycosaminoglycans in the murine hematopoietic stromal cell line S17 – modulators of hematopoietic microenvironment. *Exp Hematol* 20: 1285-1290.

- Sietsma H, Nijhof W, Dontje B, Vellenga E, Kamps WA, Kok JW. 1998. Inhibition of hemopoiesis *in vitro* by neuroblastoma-derived gangliosides. *Cancer Res* 58: 4840-4844.
- Skoza L, Mohos S. 1976. Stable thiobarbituric acid chromophore with dimethylsulphoxide. *Biochem J* 159: 457-462.
- Svennerholm L. 1963. Chromatographic separation of human brain gangliosides. *J Neurochem* 10: 613-623.
- Tagami S, Inokuchi J, Kabayama K, Yoshimura H, Kitamura F, Uemura S, Ogawa C, Ishii A, Saito M, Ohtsuka Y, Sakaue S, Igarashi Y. 2002. Ganglioside GM3 participates in the pathological conditions of insulin resistance. *J Biol Chem* 277 (5): 3085-3092.
- Wang X, Sun P, Al-Qamari A, Tai T, Kawashima I, Paller AS. 2001. Carbohydrate-carbohydrate binding of ganglioside to integrin $\alpha 5$ modulates $\alpha 5\beta 1$ function. *J Biol Chem* 276 (11): 8436-8444.
- Wang X, Sun P, Paller AS. 2003. Ganglioside GM3 blocks the activation of epidermal growth factor receptor induced by integrin at specific tyrosine sites. *J Biol Chem* 278 (49): 48770-48778.
- 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.
- Williams MA, McCluer RH. 1980. The use of Sep-Pak C18 cartridges during the isolation of gangliosides. *J Neurochem* 35: 266-269.
- Yamamura S, Handa K, Hakomori S. 1997. A close association of GM3 with c-Src and Rho in GM3-enriched microdomains at the B16 melanoma cell surface membrane: a preliminary note. *Biochem Biophys Res Commun* 236: 218-222.

- Zheng M, Fang H, Tsuruoka T, Tsuji T, Sasaki T, Hakomori S. 1993. Regulatory role of GM3 ganglioside in $\alpha 5\beta 1$ integrin receptor for fibronectin-mediated adhesion of FUA169 cells. *J Biol Chem* 268 (3): 2217-2222.
- Zhou Q, Hakomori S, Kitamuras K, Igarashi Y. 1994. GM3 directly inhibits tyrosine phosphorylation and de-*N*-acetyl-GM3 directly enhances serine phosphorylation of epidermal growth factor receptor, independently of receptor-receptor interaction. *J Biol Chem* 269 (3): 1959-1965.
- Ziulkoski AL, Andrade CM, Crespo PM, Sisti E, Trindade VMT, Daniotti JL, Guma FCR, Borojevic R. 2006. Gangliosides of myelosupportive stroma cells are transferred to myeloid progenitors and are required for their survival and proliferation. *Biochem J* 394: 1-9.
- Ziulkoski AL, Zimmer AR, Zanettini JS, Trugo LC, Guma FCR. 2001. Synthesis and transport of different sphingomyelin species in rat Sertoli cells. *Mol Cel Biochem* 219: 57-64.
- Zon LI. 1995. Developmental biology of hematopoiesis. *Blood* 86: 2876-2891.
- Zurita AR, Maccioni HJ, Daniotti JL. 2001. Modulation of epidermal growth factor receptor phosphorylation by endogenously expressed gangliosides. *Biochem J* 355: 465-72.

Table 1. Sialic acid determination in lipids of the S17, SF and GRX cells.

	Sialic acid (nmol/ mg protein)
S17 cell line	10.0 ± 0.23
SF cells	0.95 ± 0.16
GRX cell line	5.2 ± 1.82

Lipids were extracted with chloroform/ methanol and the sialic acid was determined by thiobarbituric acid assay. The protein correspondent to lipid extract was quantified by Lowry method modified by Peterson. Results represent mean ± SEM of three experiments done in duplicate.

Table 2. Densitometric analysis of lipids synthesized and shed from S17, SF and GRX cells.

	% of total incorporation					
	S17 cells		SF cells		GRX cells	
	cells	shedding	cells	shedding	cells	shedding
GD1a	5.3	Nd	40.7	33.1	27.8	25.8
GM1	1.3	Nd	6.7	10.2	14.0	18.9
GM2	1.4	Nd	Nd	Nd	13.1	2.3
GM3	64.3	80.0	52.6	35.9	10.9	13.1
PC	1.3	Nd	Nd	12.9	23.7	33.6
CTH	24.5	13.2	Nd	3.1	5.7	Nd
CDH	0.7	6.9	Nd	4.7	1.4	Nd
CMH	1.1	Nd	Nd	Nd	3.3	6.3

Cell cultures were incubated 12 h with 0.5 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ [^{14}C]-galactose and the lipids were shed to medium for 48 h. Lipids were extracted, purified, analyzed by HPTLC and visualized by fluorography. Results are expressed as % of total radioactivity incorporated. GD1a, GM1, GM2, GD3 and GM3: gangliosides; CTH: ceramide trihexoside; CDH: ceramide dihexoside; CMH: ceramide monohexoside; PC: phosphatidylcholine; Nd: non detected.

Table 3. FDC-P1 proliferation in presence of cytokines, stromas conditioned mediums and gangliosides.

Medium supplementation	Effect	Reference
IL3* or GM-CSF	↑P	Carvalho et al., 2000
GM3	↓S	Andrade et al., 2006
GM-CSF + GM3	↑↑P	Andrade et al., 2006
IL3 + PDMP*	↑P	Ziulkoski et al., 2006
IL3 + DH2*	↑P	Ziulkoski et al., 2006
CM of stromas		
AFT-024	↑P	Ziulkoski et al., 2006
S17	↓S	Present work
GR-IFN γ -R [%]	↑P	Andrade et al., 2006
GRWT	S	Andrade et al., 2006
GRX	S	Present work
SF	S	Carvalho et al., 2000
CM of stromas treated with PDMP		
AFT-024	↓S	Ziulkoski et al., 2006
GRWT and GR-IFN γ -R [%]	↓S	Andrade et al., 2006
S17, GRX and SF	↓S	Present work
CM of stromas with 10% DH2 antibody		
AFT-024	↓S	Ziulkoski et al., 2006
GRWT and GR-IFN γ -R [%]	↓S	Andrade et al., 2006
S17, GRX and SF	↓S	Present work
CM of GR-IFN γ -R [%] stroma treated with PDMP and supplemented with GM3	↑P	Andrade et al., 2006
CM of GRWT stroma supplemented with GM3	↑S	Andrade et al., 2006
CM of S17 stroma supplemented with GM-CSF	↑S	Present work

Proliferation of FDC-P1 cells in basal culture medium plus cytokines or gangliosides. (*) medium conditioned by WeHi cells that contained IL3, with the addition of 10 μ M PDMP, a glycosyltransferase inhibitor, or 10% of DH2 monoclonal antibody anti-GM3. ↑P, proliferation induction; S, maintain the survival; ↓S, survival reduction or cell death.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 FDC-P1 cell survival and proliferation in coculture with different stroma cells. FDC-P1 cells previously washed with CMF BSS were inoculated on to the semi-confluent monolayers of S17, SF or GRX cells at 1×10^5 cells per well (above) and maintained by 24 h (below). Phase contrast microscopy, scale bars: 20 μm .

Figure 2 Ganglioside synthesis and shedding by S17, SF and GRX cells. (A) synthesis of glycosphingolipids in S17, SF and GRX cells. Cell cultures were incubated 12 h with 0,5 $\mu\text{Ci/mL}$ [^{14}C]-galactose. (B) glycosphingolipids shed by S17, SF and GRX cells. Cell cultures were incubated 12 h with [^{14}C]-galactose and the lipids were shed to medium for 48 h. Lipids were extracted, purified, analyzed by HPTLC and visualized by fluorography. The radioactive bands correspond to lipids indicated. GD1a, GD3, GM1, GM2, GM3: gangliosides; CTH, ceramide trihexoside; CDH, ceramide dihexoside; CMH, ceramide monohexoside; PC, phosphatidylcholine.

Figure 3 Inhibition of proliferation of FDC-P1 cells in conditioned medium of S17 and GRX cells. (A) FDC-P1 cell proliferation in the presence of the supernatant of S17, GRX or SF cells (white bars), of the supernatant of S17, GRX or SF cells treated with 10 μM PDMP (gray bars) and supernatant of S17, GRX or SF cells in the presence of DH2 (a monoclonal antibody to GM3) (black bars). FDC-P1 cells cultivated in medium with supernatant of WeHi cells were the positive control. (B) FDC-P1 cell proliferation in the presence of supernatant of S17 or in the presence of this supernatant supplemented with 2 $\mu\text{g/mL}$ GM-CSF. The positive control was RPMI 1640 with 2 $\mu\text{g/mL}$ GM-CSF. Data are from two separated experiments, each done in triplicate. Values are mean \pm SEM. (a), (b) and (c), significant difference to $P < 0.05$.

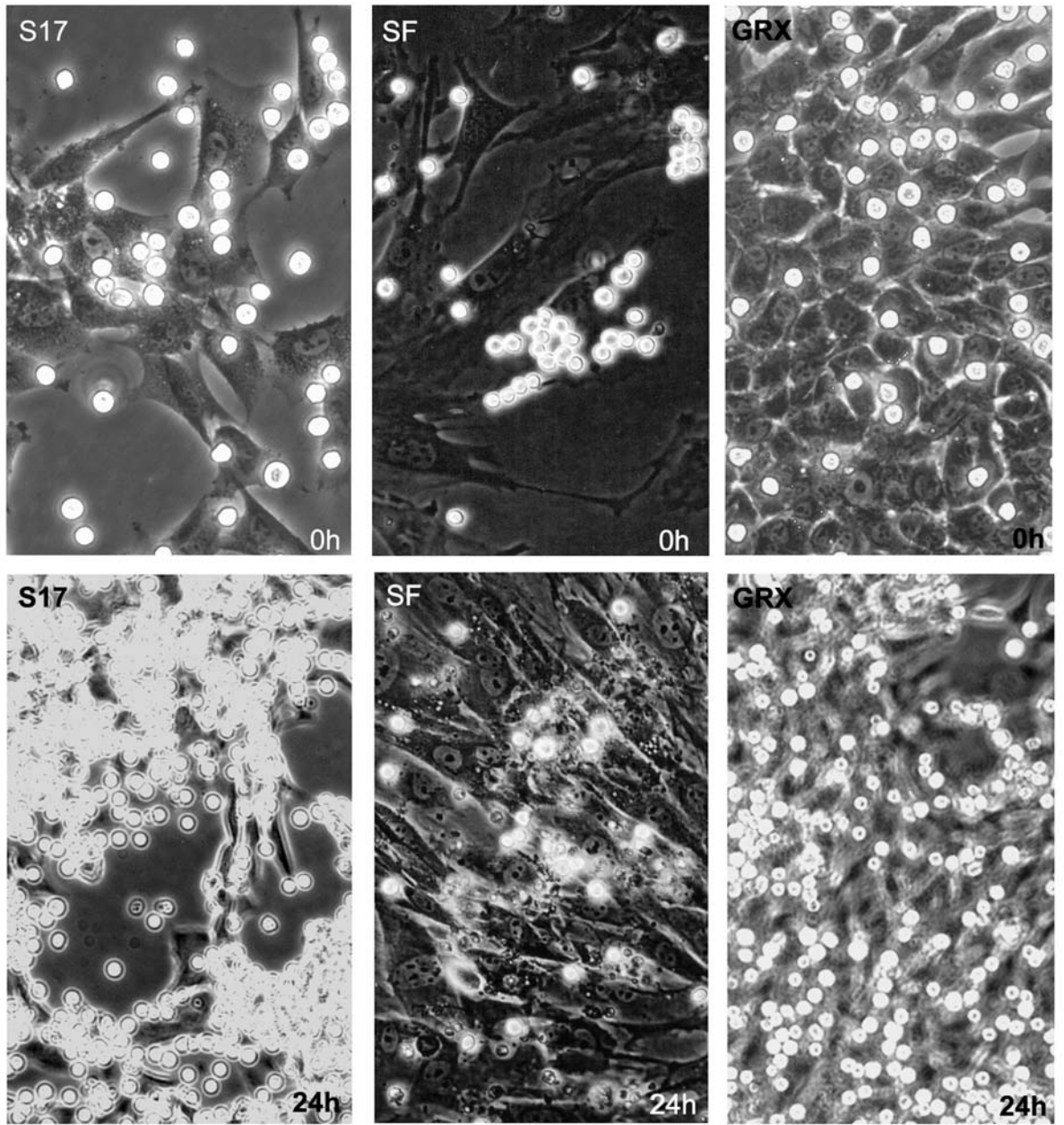


FIGURE 1

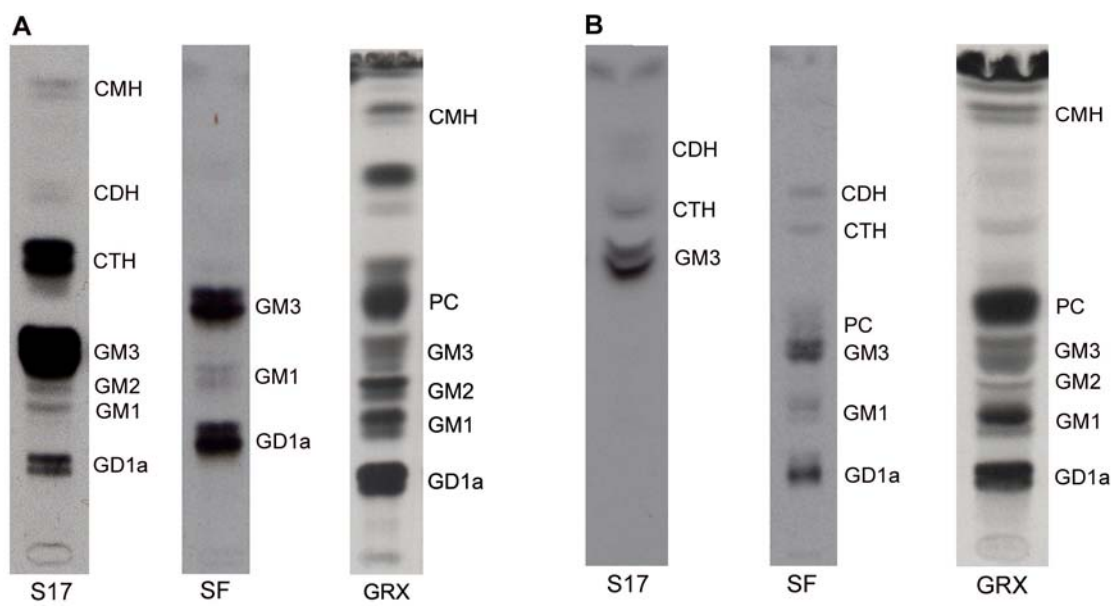
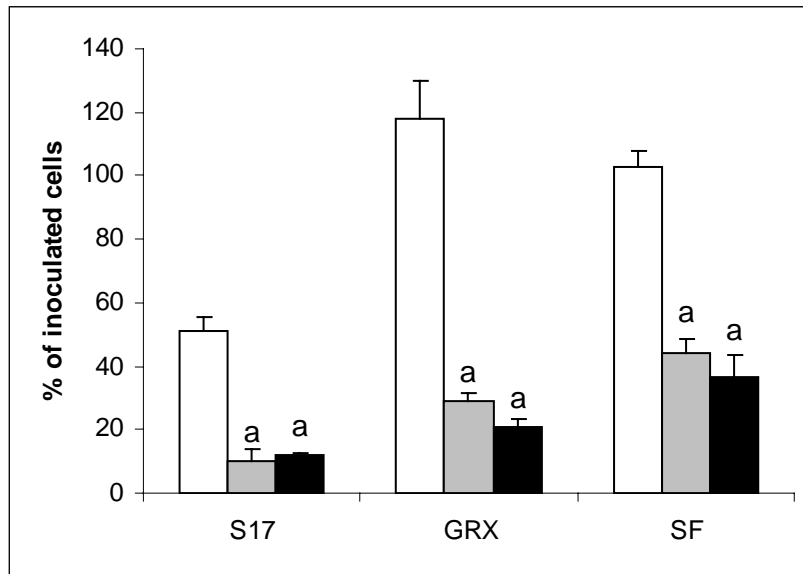


FIGURE 2

A



B

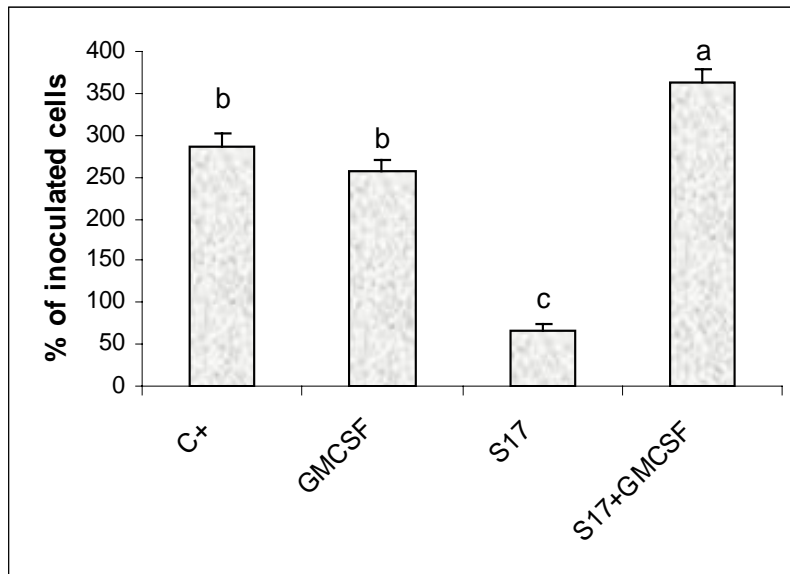


FIGURE 3

CAPÍTULO 4

**Investigação imunocitoquímica do gangliosídeo GM1 no estroma de medula óssea S17,
em fibroblastos de pele e em coculturas de células estromais AFT-024 com células
precursoras mielopoiéticas FDC-P1**

(Dados preliminares)

INTRODUÇÃO

O sistema hematopoiético é altamente hierarquizado e todas as suas células derivam de células-tronco, as quais devem estabelecer relações adesivas com o estroma medular, cujos elementos compõem os microambientes específicos necessários para a progressão da cascata hematopoiética (Heyworth *et al.*, 1988). A regulação da proliferação, do comprometimento e da diferenciação terminal das células precursoras hematopoiéticas ocorre normalmente no microambiente da medula óssea. Durante o período fetal, este processo ocorre no fígado, baço e região para-aórtica deslocando-se para os ossos longos e chatos durante o desenvolvimento (Tavian *et al.*, 1999). Em estados patológicos, nos quais o ambiente da medula óssea sofre alterações, a hematopoiese pode ser deslocada para tecidos periféricos como o fígado e o baço (Borojevic *et al.*, 1993). A presença de células precursoras totipotentes e comprometidas em tecidos periféricos indica a necessidade da regulação local da atividade dos fatores de crescimento e citocinas envolvidos no controle da homeostasia da mielopoiese extramedular.

Supõe-se que a interação entre os fatores de crescimento produzidos pelo estroma e os receptores correspondentes é controlada por complexos macromoleculares, que constituem frações de membrana insolúveis em detergente e ricas em glicoesfingolipídios (GEMs), entre eles os gangliosídios. Estudos anteriores demonstraram que a atividade biológica do GM-CSF depende da sua associação com heparam sulfato, e essa interação molecular depende de cargas polares negativas providenciadas por moléculas sialiladas presentes na membrana, cuja distribuição espacial evoca a estrutura de *rafts* (Wettreich *et al.*, 1999; Borojevic *et al.*, 2003). Também demonstramos que os gangliosídios contribuem para a determinação da capacidade mielossuportiva de diferentes estromas (Ziulkoski *et al.*, 2006; Andrade *et al.*, 2006), sendo o gangliosídio GM3 acumulado na maioria dos estromas. No entanto, os gangliosídios GM1 e GD1a também são encontrados em várias das células estromais estudadas. Análises imunocitoquímicas realizadas com células derivadas de estroma de fígado fetal murino

demonstraram a ocorrência de *capping* de GM3 e de GM1 para a região de contato entre as células estromais e células precursoras mielóides (Ziulkoski *et al.*, 2006)

Sendo assim, os objetivos deste estudo foram: (a) analisar a possível colocalização do gangliosídeo GM1 com moléculas envolvidas com a sinalização de GM-CSF ou com adesão celular em células AFT-024; (b) determinar a distribuição subcelular deste gangliosídeo na linhagem celular mielossuportiva S17 (derivada de medula óssea murina) e em fibroblastos de pele, os quais não sustentam a hematopoiese.

METODOLOGIA

Materiais

Os meios de cultivo celular DMEM e RPMI 1640, a colagenase, a tripsina, os padrões lipídicos, a toxina colérica acoplada a fluoresceína, a subunidade B da toxina colérica e o anticorpo anti-toxina colérica foram obtidos da Sigma-Aldrich; o soro fetal bovino (SFB) da Cultilab; D-[U-¹⁴C]galactose (300 mCi/mmol) da Amersham Life Science; as garrafas e placas plásticas para cultura da Nunc; o Fluorsave[®] da Calbiochem; o anticorpo policlonal anti-GM-CSF-R β (*rabbit*) da Santa Cruz Biotechnology; e os anticorpos secundários anti-*mouse* conjugado a CY3 e anti-*rabbit* acoplado a rodamina da Jackson Immuno Research. O anticorpo anti-CD44 foi gentilmente cedido pela Dr^a Márcia Cury El-Cheikh, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

Cultura de células

A linhagem precursora mielopoética FDCP-1, dependente de IL-3 ou GM-CSF, foi mantida em meio RPMI 10% SFB, suplementado com 10% de meio condicionado de WeHi como fonte exógena de IL-3, a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. As linhagens celulares S17

(derivada de medula óssea murina), e AFT-024 (derivada de fíguda fetal murino) foram cultivada em meio RPMI suplementado com 10% SFB e mantidas nas mesmas condições citadas acima. Para obtenção de coculturas, células FDC-P1 foram lavadas com CMF-BSS para remover IL-3 e GM-CSF e inoculadas (1×10^5 células por poço) sobre as camadas semi-confluentes de células S17 ou AFT-024 cultivadas em placas de 24 poços. Culturas primárias de fibroblastos de pele, os quais não sustentam a hematopoiese (Carvalho *et al.*, 2000) foram obtidas a partir de camundongos neonatos C3H/HeN. Os animais foram sacrificados e sua pele dissecada e digerida com colagenase (1 mg/ mL em DMEM) por 1 h, a 37°C, sob agitação). Este tratamento foi seguido por digestão com tripsina (0,125% em CMF BSS) suplementada com EDTA 0,05%, por 30 min a 37°C. As células obtidas foram semeadas em garrafas de cultura de 25 cm² em RPMI 1640 suplementado com 10% SFB e subcultivadas por tripsinização, a qual elimina macrófagos resistentes à tripsina. Os fibroblastos de pele assim obtidos, referidos como SF, foram mantidos em cultura como descrito para as linhagens celulares S17 e AFT-024.

Imunocitoquímica

Camadas semi-confluentes de células SF, S17 e coculturas (mantidas por 12 h) cultivadas sobre lamínulas foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 min, lavadas com PBS e incubadas em PBS contendo 3% de albumina de soro bovino por 1 h a 37°C para bloquear sítios de ligação inespecíficos. Os procedimentos imunocitoquímicos foram realizados como descrito por Crespo e colaboradores (2004). Como anticorpos primários foram utilizados: anticorpo monoclonal anti-GM3 (clone DH2, *mouse*), anticorpo policlonal anti-GM-CSFR β (1:200, *rabbit*) e anticorpo monoclonal anti-CD44 (1:100, *mouse*). Os anticorpos secundários utilizados foram: anticorpo monoclonal anti-*mouse* conjugado a CY3 (1:1000) e anticorpo monoclonal anti-*rabbit* conjugado a rodamina (1:500). Após lavagem final com PBS, as preparações foram montadas com Fluorsave[®]. Imagens confocais foram

obtidas usando microscópio confocal Carl Zeiss LSM5 Pascal (Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) equipado com um laser de argônio/hélio/neon e uma objetiva de imersão em óleo de 63 x (abertura de 1,4) (Zeiss Plan-Apochromat). Para a imunodeteção de GM1 dois métodos foram utilizados: (a) células fixadas foram incubadas com toxina colérica 4 µg/ mL (subunidade B, atóxica), seguida de incubação com anticorpo monoclonal anti-toxina colérica (1:100, *rabbit*) e anticorpo secundário anti-*rabbit* conjugado a rodamina (1:500); (b) células fixadas foram diretamente incubadas com toxina colérica conjugada a fluoresceína (subunidade B, atóxica). Os demais procedimentos imunocitoquímicos foram os mesmos descritos acima.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em estudo anterior demonstramos que o gangliosídeo GM3 colocaliza-se extensivamente com a cadeia α do receptor de GM-CSF, enquanto o gangliosídeo GM1 apresenta apenas uma colocalização parcial, apesar de ambos apresentarem *capping* para a região de contato entre as células AFT-024 e FDC-P1 (Ziulkoski *et al.*, 2006). Trabalhos recentes têm relatado que rafts enriquecidos em diferentes gangliosídios podem desempenhar diferentes funções em um mesmo tipo celular (Gómez-Moutón *et al.*, 2001; Chigorno *et al.*, 2000). Sendo assim, resolvemos analisar a possível colocalização de GM1 e GM3 em nosso modelo de mielopoiese extramedular. Os resultados demonstraram a presença do gangliosídeo GM1 na membrana plasmática das células precursoras mielóides (Figura 1 A, D e G), em conformidade com os resultados obtidos anteriormente (Ziulkoski *et al.*, 2006). No entanto, a sobreposição das imagens obtidas para GM1 e GM3 (Figura 1C) demonstrou pouca colocalização entre estes dois gangliosídios, levando-nos a supor que esses gangliosídios

estejam em rafts diferentes e desempenhem papéis diferentes na interação entre células estromais e células progenitoras mielóides.

Tendo em vista os indícios de uma função diferenciada para o gangliosídeo GM1, analisamos a possível colocalização deste gangliosídeo com a cadeia β do receptor de GM-CSF, a qual é compartilhada com os receptores para IL-3 e IL-5 (Hamilton, 2002). As imagens obtidas nas coculturas também demonstram marcação típica de membrana plasmática nas células FDC-P1 (Figura 1E), sendo possível visualizar o *capping* do receptor para a região de contato com as células estromais. No entanto, a sobreposição das imagens evidencia a ausência de colocalização significativa do gangliosídeo GM1 com GM-CSF-R β (Figura 1F), sugerindo que o GM1 não está envolvido com a transdução de sinal desencadeada por esta subunidade.

Uma vez que o gangliosídeo GM1 tem sido relacionado com moléculas de adesão como o CD44 (Gómez-Moutón *et al.*, 2001) e os resultados anteriores que demonstraram o *capping* deste gangliosídeo nas células estromais para a região de contato com as células precursoras mielóides (Ziulkoski *et al.*, 2006), resolvemos analisar a possível colocalização de GM1 e CD44. Os resultados indicam a presença desta molécula de adesão na membrana das células FDC-P1 (Figura 1H). No entanto, não observamos colocalização entre GM1 e CD44 (Figura 1I), indicando que o GM1 não está relacionado com a adesão celular mediada pelo CD44. Todavia, são necessários novos estudos para determinar se este gangliosídeo está envolvido ou não com as interações adesivas existentes entre células estromais e células precursoras mielóides.

Como os resultados obtidos na análise do perfil de gangliosídeos por marcação metabólica e HPTLC para fibroblastos de pele e para a linhagem S17 mostraram a presença de GM1 (capítulo 3, Figura 2 e Tabela 2), ainda que em quantidades pequenas (6,7 e 1,3 %, respectivamente), investigamos a distribuição subcelular deste gangliosídeo nessas células através de imunocitoquímica. Pode se observar uma marcação típica de membrana plasmática

em ambos os tipos celulares (Figura 2 A e B), ocorrendo *capping* de GM1 nas células progenitoras mielóides quando estas são cocultivadas com as células estromais de medula óssea S17 (Figura 2 C e D). Estes resultados contribuem para a hipótese de que o gangliosídeo GM1 participe do microambiente formado na região de contato entre as células mielóides e as células estromais; entretanto, a elucidação de seu papel necessita de estudos adicionais.

REFERÊNCIAS

- Andrade, C.M.B., Ziulkoski, A.L., dos Santos, A.X.S., Sisti, E., Trindade, V.M.T., Borojevic, R., Guma, F.C.R. (2006) Gangliosides regulate the capacity of stromal cells to support myelopoiesis. Manuscrito em preparação.
- Borojevic, R., Carvalho, M.A., Corrêa-Junior, J.D., Arcanjo, K., Gomes, L., Joazeiro, P.P., 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.
- Borojevic, R., El-Cheikh, M.C., Alvarez-Silva, M., Almeida, K.G., Dutra, H.S. (1993) Hepatic myelopoiesis associated with inflammation: liver connective tissue cells form a myelopoietic stroma. In: **Cells hepatic sinusoid**. Kupfer Cell Foundation, Leiden, The Netherlands, vol. 4, 130-133.
- Carvalho, M.A., Arcanjo, K., Silva, L.C.F., Borojevic, R. (2000) The capacity of connective tissue stromas to sustain myelopoiesis depend both upon the growth factors and the local intercellular environment. *Biol. Cell* **92**, 605-614.
- Crespo, P.M., Zurita, A.R., Giraudo, C.G., Maccioni, H.J.F., Daniotii, J.L. (2004) Ganglioside glycosyltransferases and newly synthesized gangliosides are excluded from detergent-insoluble complexes of Golgi membranes. *Biochem. J.* **377**, 561-568

- Chigorno, V., Palestini, P., Sciannamblo, M., Dolo, V., Pavan, A., Tettamanti, G., Sonnino, S. (2000) Evidence that ganglioside enriched domains are distinct from caveolae in MDCK II and human fibroblast cells in culture. *Eur. J. Biochem.* **267**, 4187–4197.
- Gómez-Moutón, C., Abad, J.L. Mira, E., Lacalle, R.A., Gallardo, E., Jiménez-Baranda, S., Illa, I. Bernad, A., Mañes, S., Martínez-A, C. (2001) Segregation of leading-edge and uropod components into specific lipid rafts during T cell polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 9642-9647.
- Hamilton, J.A. (2002) GM-CSF in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol.* **23**, 403-408.
- Heyworth, C.M., Ponting, I.L.O., Dexter, T.M. (1988) The response of hematopoietic cells to growth factors: developmental implications of synergic interactions. *J. Cell Sci.* **91**, 239-247.
- Tavian, M., Cortes, F., Charbord, P., Labastie, M.C., Peault, B. (1999) Emergence of the haemopoietic system in the human embryo and foetus. *Haematologica* **84**, 1-3.
- Wettrich, A., Sebollela, A., Carvalho, M.A., Azevedo, S.P., Borojevic, R., Ferreira, S.T., Coelho-Sampaio, T. (1999) Acidic pH modulates the interaction between human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* **274**, 31468-31475.
- Ziulkoski, A.L., Andrade, C.M., Crespo, P.M., Sisti, E., Trindade, V.M., Daniotti, J.L., Guma, F.C., Borojevic, R. (2006) Gangliosides of myelosupportive stroma cells are transferred to myeloid progenitors and are required for their survival and proliferation. *Biochem J.* **394**, 1-9.

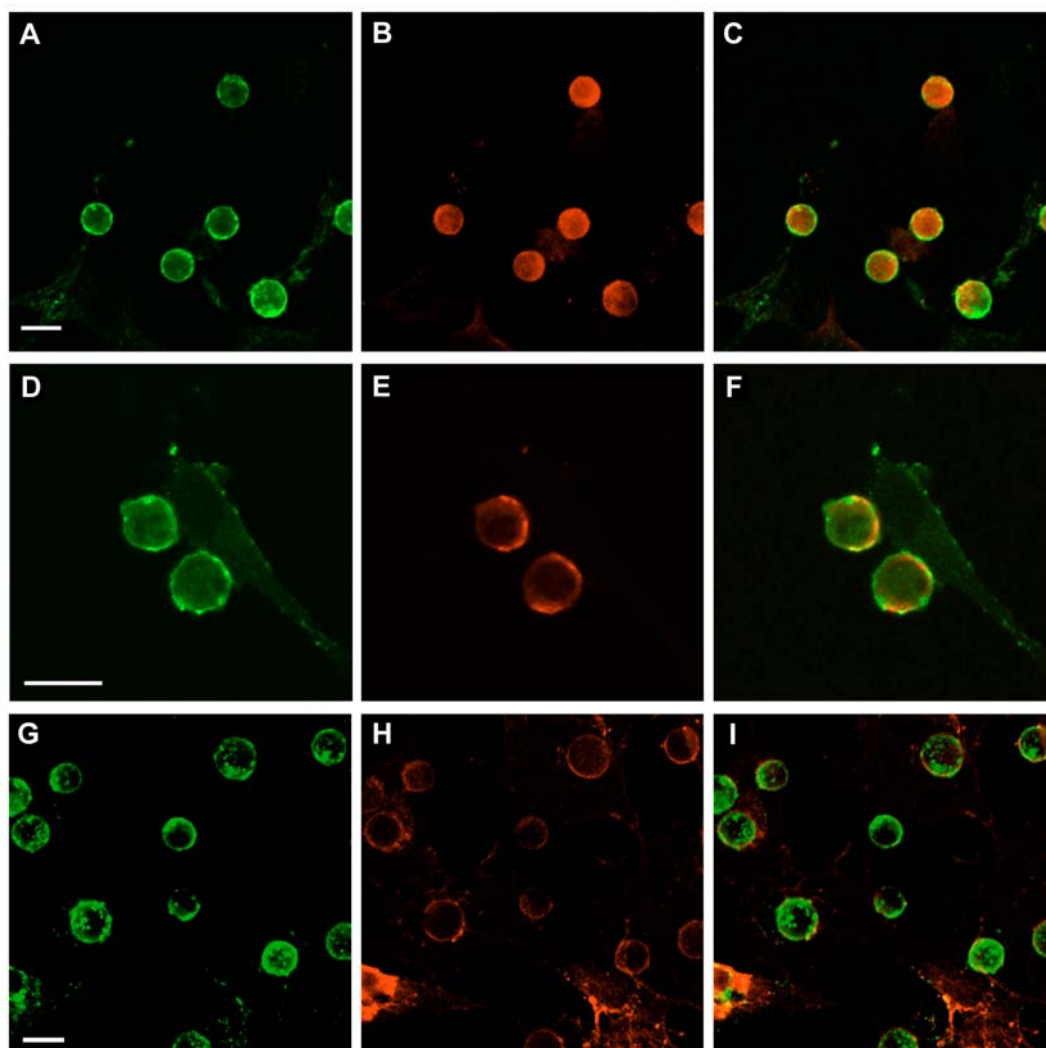


Figura 1 Imagens representativas da localização subcelular dos gangliosídios GM1 e GM3, GMCSFR β e CD44 em coculturas de células AFT-024 e FDC-P1. O GM1 foi imunodetectado nas células AFT-024 com toxina colérica acoplada a fluoresceína, a detecção do GM3 foi realizada com anticorpo monoclonal DH2, a da cadeia β do receptor de GM-CSF com anticorpo policlonal anti-GMCSFR β e a de CD44 com anticorpo monoclonal anti-CD44. **A, D e G**, imunodeteção de GM1. **B**, imunodeteção de GM3. **C**, sobreposição das imagens mostradas em A e B. **E**, imunodeteção da cadeia β do receptor de GM-CSF. **F**, sobreposição das imagens mostradas em D e E. **H**, imunodeteção de CD44. **I**, sobreposição das imagens mostradas em G e H. Secções confocais simples de 0,6 μm tomadas paralelamente às preparações. Barras: 10 μm .

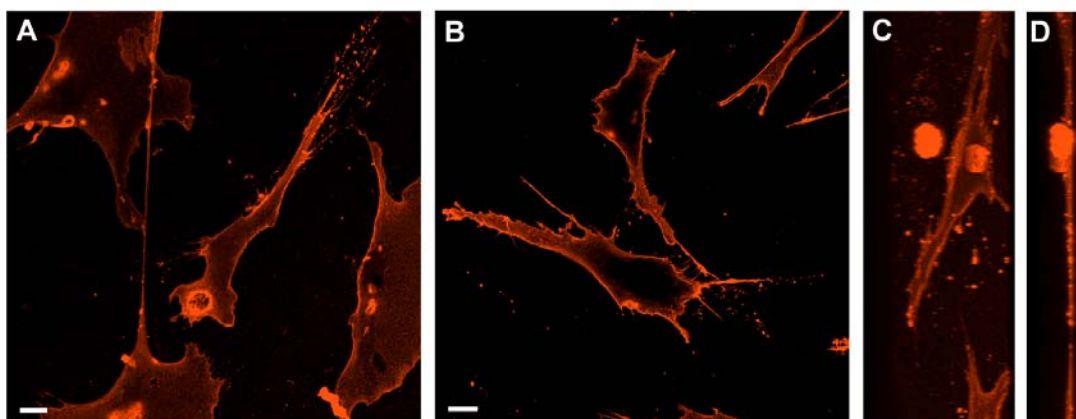


Figura 2 Imagens representativas da localização subcelular do gangliosídeo GM1 em fibroblastos de pele e na linhagem celular S17. As células foram imunodetectadas para GM1 com toxina colérica e anticorpo monoclonal anti-toxina colérica. **A**, imunodeteção do gangliosídeo GM1 em fibroblastos de pele. **B**, imunodeteção do gangliosídeo GM1 em células S17. **C** e **D**, imunodeteção do gangliosídeo GM1 em cocultura de células S17 e células FDC-P1. Secções confocais simples xy de 0,6 μm foram tomadas paralelamente às preparações nas figuras A e B. As imagens contidas em C e D correspondem a secções yz. Barras: 10 μm .

PARTE III

DISCUSSÃO

O conjunto de resultados aqui apresentados demonstra que os gangliosídeos sintetizados e liberados pelas células estromais estão relacionados com a capacidade de sustentação da proliferação e sobrevivência das células FDC-P1, utilizadas como sistema de resposta para o monitoramento da disponibilidade e atividade local de GM-CSF. Todos os estromas estudados sintetizam gangliosídeos da série *a* e acumulam o gangliosídeo GM3, existindo uma tendência de maior quantidade deste gangliosídeo nos estromas que apresentam maior capacidade de sustentação mielopoética nos sistemas de cocultivo. O único estroma que não se enquadra nesta tendência são os fibroblastos de pele; porém, como a concentração de ácido siálico nestas células foi a mais baixa, o acúmulo de GM3 pode não refletir a quantidade absoluta real de GM3 e sim a velocidade de síntese dos gangliosídeos neste tipo celular. Interessantemente, a quantidade de GD1a é maior nos estromas que apresentam menor capacidade mielossuportiva. Por outro lado, o perfil obtido para a linhagem de células precursoras mielóides demonstra gangliosídeos das séries *a* e *b*, mas com uma quantidade relativa bastante pequena de GM3.

A transferência de GM3 das células de estroma de fígado fetal murino (linhagem AFT-024) para as células precursoras mielóides foi evidenciada através de experimentos imunocitoquímicos e com precursores radioativos e fluorescentes. Uma vez que este gangliosídeo sempre esteve presente nos meios condicionados de todos os estromas estudados, é possível supor que este seja um fenômeno cooperativo comum entre os demais estromas e as células precursoras mielóides. De fato, os ensaios de proliferação realizados com os

sobrenadantes obtidos dos estromas depletados em gangliosídeos ou em que o GM3 foi neutralizado pela adição de anticorpo monoclonal anti-GM3 apresentaram redução na capacidade de sustentação da proliferação e sobrevivência das células FDC-P1. Além disso, quando os sobrenadantes obtidos de estromas depletados em gangliosídeos foram suplementados com GM3 exógeno, verificou-se a recuperação da capacidade de sustentação mielopoética (Andrade *et al.*, 2006). Os mesmos experimentos citados demonstraram que a capacidade de sustentação das células FDC-P1 pelos meios condicionados dos diferentes estromas pode diferir daquela obtida nos modelos de cocultivo, sugerindo diferenças no ambiente de ligação ao receptor entre as formas solúvel e apresentada do fator de crescimento, conforme previamente proposto por Borojevic e colaboradores (2003).

Os estudos imunocitoquímicos também revelaram o *capping* dos gangliosídeos GM3, GM1 e do receptor de GM-CSF para apenas um dos lados das células FDC-P1, resultado condizente com a polarização e redistribuição de regiões de membrana especializadas que ocorre durante o processo de diferenciação das células mielóides e seus progenitores (Giebel *et al.*, 2004). Essas imagens ainda evidenciam a colocalização da cadeia α do receptor de GM-CSF com o gangliosídeo GM3, sugerindo a participação deste gangliosídeo no microambiente necessário para que ocorra a ligação de GM-CSF ao seu receptor e/ ou na sinalização celular mediada pelo mesmo. Já o gangliosídeo GM1 apresenta apenas uma co-distribuição parcial com a cadeia α de GM-CSF-R, e não foi detectada colocalização significativa deste gangliosídeo com a cadeia β deste receptor, com o próprio gangliosídeo GM3 ou com CD44. Esses dados indicam que os gangliosídeos GM3 e GM1 estão localizados em diferentes regiões da membrana plasmática ou em diferentes *rafts*, possivelmente exercendo papéis diferentes na interação entre células estromais e células progenitoras mielóides, como já proposto para células T polarizadas (Gómes-Mountón *et al.*, 2001).

Finalmente, as análises dos glicosfingolipídios das células AFT-024 e FDC-P1 após tratamento dos lisados celulares com Triton X-100 demonstram a presença dos gangliosídeo

GM3, GM1 e GD1a nas frações correspondentes a *rafts*. O fracionamento em gradiente de sacarose confirma a presença de GM3 nas frações menos densas obtidas das células AFT-024, demonstrando também a presença de GD1a em todas as frações coletadas. Esses resultados sugerem a presença de *rafts* contendo tanto GM3 como GD1a nas células AFT-024, ou de dois tipos de *rafts* diferentes: *rafts* enriquecidos em GM3 e *rafts* enriquecidos em GD1a. Um desses gangliosídeos pode estar interagindo com a β integrina detectada nas frações mais densas e menos densa do gradiente, como previamente reportado em outros estudos (Zheng *et al.*, 1993, Kawakami *et al.*, 2002).

Estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa (Alvarez-Silva & Borojevic, 1993; Carvalho *et al.*, 2000; Borojevic *et al.*, 2003) e os resultados relatados acima permitem propor que a interação entre fatores de crescimento e os receptores correspondentes no sistema hematopoiético é controlada por complexos macromoleculares, incluindo proteoglicanos contendo heparan sulfato e gangliosídeos. Esses conjuntos macromoleculares estariam organizados na forma de *rafts*, os quais possuem a capacidade de migração no plano da membrana celular (*capping*), gerando regiões com alta densidade de carga e de receptores transmembranares na interface entre células do estroma e células hematopoiéticas. Sendo assim, a organização espacial dos gangliosídeos nas membranas celulares e/ ou sua associação com outros componentes da membrana pode ser requerida para que um determinado estroma estabeleça uma capacidade mielossuportiva elevada, como para a linhagem estromal derivada de medula óssea S17 e, em menor grau, para o estroma derivado de fígado fetal murino AFT-024. Por outro lado, o conjunto macromolecular formado na interface entre estroma e células progenitoras mielóides pode não ser ideal ou até mesmo ser inibitório, fazendo com que a sustentação mielopoiética, no contexto de uma sinalização justácrina, seja reduzida ou até mesmo nula, como para a linhagem celular GRX e as culturas primárias de fibroblastos de pele, respectivamente.

O extenso espectro de efeitos biológicos exercidos pelos gangliosídios pode ser explicado pela interação direta destes com moléculas de sinalização ou por sua influência sobre a formação de *rafts* (Simons *et al.*, 1999). Ainda não se conhece exatamente como os *rafts* participam da transdução de sinal, embora seja tema comum a teoria de que *rafts* isolados agregam-se para conectar as proteínas residentes e promover a interação destas em um complexo de sinalização. Três modelos são propostos: 1, subunidades dos receptores já associadas com *rafts* no estado de equilíbrio seriam dimerizadas através da união ao ligante; 2, receptores isolados que possuem fraca afinidade por *rafts* sofreriam oligomerização após a união ao ligante, o que levaria a um aumento do tempo de residência destes receptores em *rafts*; 3, receptores ativados poderiam recrutar proteínas, as quais se ligariam a proteínas residentes em outros *rafts* (*crosslinking*), resultando em um fenômeno de coalescência destes microdomínios de membrana (Simons & Toomre, 2000). A formação de agregados de *rafts* permite a organização espacial e temporal dos complexos de sinalização, facilitando as interações entre proteínas adaptadoras, proteínas de ancoragem e *scaffolds*, levando à amplificação do sinal através da concentração ou exclusão de moléculas sinalizadoras.

As diferenças encontradas na atividade mielopoietica dos diferentes estromas podem estar relacionadas, entre outros fatores, com as diferenças no perfil e localização sub-celular dos gangliosídios nestas células. Dessa forma, em nosso modelo experimental, os gangliosídios poderiam estar contribuindo não só para a geração do ambiente ácido necessário para a interação entre HSPGs e GM-CSF, como para a inclusão de receptores em GEMs ou *rafts*, e para o controle da ativação, do *turnover* e da localização sub-celular dos componentes envolvidos na sinalização celular mediada por fatores de crescimento (Miljan & Bremer 2002). Uma hipótese para tal é que o gangliosídio GM3, o qual se mostrou essencial para a atividade mielopoietica dos estromas estudados, esteja envolvido na inclusão do receptor de GM-CSF em *rafts* nas células progenitoras mielóides, ou de componentes da transdução de sinal mediada por este fator. A associação de proteínas transdutoras com GM3 em GEMs já

foi demonstrada para linfócitos T (Sorice *et al.*, 2004). Outra possibilidade é que o GM3 participe da exclusão de outros receptores dos *rafts*, ou ainda que exerça efeitos inibitórios sobre esses receptores. Efeitos inibitórios do gangliosídeo GM3 já foram descritos para PDGF (Hynds *et al.*, 1995) e para EGF (Rebbaa *et al.*, 1996, Wang *et al.*, 2001a), sendo proposto que GEMs enriquecidas em GM3 retém o receptor de EGF em *rafts* e promovem sua inativação (Miljan & Bremer, 2002).

Nesse sentido, a transferência de GM3 das células estromais para as células precursoras mielopoéticas seria fundamental, pois as últimas acumulam uma quantidade bastante baixa de GM3. De fato, existem relatos de que a adição de gangliosídios exógenos pode levar a sua incorporação em *rafts* e, como resultado, causar também a dissociação de proteínas desses *rafts*, tais como proteínas ancoradas a GPI (Simons *et al.*, 1999; Simons & Toomre, 2000), além de modificar a resposta biológica das células a vários fatores de crescimento (Li *et al.*, 2000). A transferência de gangliosídios de uma célula para outra é um processo altamente eficiente (Olshefski & Ladisch, 1996) e classicamente pode ocorrer de três formas: como monômeros, como micelas e através de vesículas enriquecidas em caveolina-1 (Kong *et al.*, 1998; Dolo *et al.*, 2000). Além disso, lipídios incorporados na face externa da membrana plasmática são eficientemente distribuídos e secretados em associação com exossomas, podendo inclusive estar arranjados na forma de *rafts* (de Gassart *et al.*, 2003). Os exossomas correspondem a endossomas formados por corpos multivesiculares e são liberados para o meio extracelular após fusão com a membrana plasmática (Denzer *et al.*, 2000). Visto que encontramos um percentual importante de gangliosídios na fração exossomal isolada do meio condicionados das células estromais AFT-024, é possível que esse tipo especializado de transporte intercelular contribua para a transferência de GM3 detectada em nosso modelo de mielopoiese extramedular. Skokos e colaboradores (2001) demonstraram que mastócitos utilizam a secreção de exossomas como um vetor de comunicação intercelular para

desempenhar suas funções imunoregulatórias e inflamatórias, em adição ao contato célula-célula e à liberação de citocinas.

A presença de gangliosídeos, especialmente de GM3, nos meios condicionados se mostrou importante não apenas para a inserção deste lipídio na membrana das células FDC-PI como também para a habilidade de suporte mielopoietico dos próprios sobrenadantes mediada por fatores de crescimento solúveis. Esse resultado contribui para a hipótese de que o gangliosídeo GM3 esteja envolvido com a segregação dos receptores de fator de crescimento em *rafts* e/ ou com a transdução de sinal mediada pelos mesmos. Além disso, os próprios agregados de glicosfingolipídios podem iniciar a transdução de sinal através da interação entre as porções lipídicas dos GSLs e as cadeias alifáticas das moléculas transdutoras presentes nos microdomínios de membrana (Iwabuchi *et al.*, 1998). Todavia, tem sido sugerido que os efeitos de gangliosídeos exógenos dependem do estado de confluência das células em cultivo (Saqr *et al.*, 1995) e que seus efeitos sobre a fosforilação das moléculas envolvidas na sinalização celular se correlacionam com a concentração e o tempo de permanência no meio de incubação (Li *et al.*, 2001). A participação de gangliosídeos do meio extracelular sobre a regulação da cooperatividade entre células já foi demonstrada para culturas de hepatócitos sincronizadas, onde a inibição do *shedding* de GM1 causou alterações na síntese protéica (Brodsky *et al.*, 2003). Finalmente, a ação de gangliosídeos exógenos sobre a diferenciação e sobrevivência de células hematopoiéticas já foi descrita para gangliosídeos liberados por células leucêmicas (Nakamura *et al.*, 1991; McKallip *et al.*, 1999), linfomas (Barthi & Singh, 2000) e neuroblastomas (Sietsma *et al.*, 1998).

Também existem relatos de que a adição de GD1a ao meio de cultura de fibroblastos de pele humana aumenta a ligação de EGF ao seu receptor, a disponibilidade de receptores na membrana plasmática, a sua dimerização (Liu *et al.*, 2004) e a ativação de Src quinase (Li *et al.*, 2001). Tem sido proposto que a interação dos gangliosídeos inseridos na membrana com uma Src quinase pode ocorrer de duas formas: interação direta com uma Src quinase

localizada na face interna da membrana através de modificação lipídica N-terminal (palmitoilação e miristilação), ou interação com moduladores negativos de Src quinase, ocasionando a remoção dos mesmos e, conseqüentemente, a ativação da Src quinase (Simons & Ikonem, 1997). *Rafts* enriquecidos em GM3 também tem sido relacionados com Src quinases, além de com FAK e com Rho GTPases (Yamamura *et al.*, 1997; Iwabuchi *et al.*, 1998; Chigorno *et al.*, 2000). O GM3 também parece causar aumento da fosforilação de c-Src e MAPK em neuroblastomas (Prinetti *et al.*, 1999) e em fibroblastos de pele humana (Li *et al.*, 2001). Sendo assim, torna-se relevante o estudo futuro das ações dos gangliosídios sobre a rota de sinalização mediada por GM-CSF, especialmente sobre o grau de fosforilação do próprio receptor, de Src quinases e MAP quinases, uma vez que nossos resultados demonstram um aumento na quantidade de GM3, paralelamente a uma diminuição na quantidade de GD1a, a medida que aumenta a habilidade dos estromas em sustentar a mielopoiese nos sistemas de cocultivo.

Comparando nossos resultados com os três modelos mecanísticos propostos por Milján e Bremer (2002) para a ação de gangliosídios sobre receptores podemos encontrar algumas semelhanças com o modelo de interação gangliosídio-ligante. Essa proposta de interação entre gangliosídios e fatores de crescimento baseia-se nos resultados encontrados para FGF, onde HSPGs são requeridos para a ligação de FGF a seu receptor. Células que não produzem esses proteoglicanos se mostraram não-responsivas a FGF. No entanto, a adição de GM1 exógeno restabeleceu a capacidade de resposta ao FGF dessas células, sugerindo que o GM1 possa apresentar o FGF ao seu receptor de forma análoga ao descrito para os HSPGs (Rusnati *et al.*, 2002). Em nosso modelo de estudo, os HSPGs também se mostram necessários para a apresentação do GM-CSF ao seu receptor (Alvarez-Silva & Borojevic, 1993; 1996), e os gangliosídios parecem contribuir para que essa interação ocorra. Todavia, novos estudos são necessários para determinar se os próprios gangliosídios podem apresentar esse fator de crescimento ao receptor.

Além dos possíveis efeitos sobre a ligação de GM-CSF ao seu receptor e a rota de sinalização celular subsequente, os gangliosídios também podem estar envolvidos nas interações adesivas existentes entre células do estroma e células progenitoras mielóides. A influência de gangliosídios sobre a ligação de moléculas de adesão aos receptores de integrina tem sido extensivamente estudada, sendo encontrados resultados de promoção (Zheng *et al.*, 1993; Kawakami *et al.* 2002) e de inibição dessas interações (Wang *et al.*, 2001b). Além disso, a adesão de células de melanoma a células endoteliais parece ser um fenômeno dependente de GM3 (Song *et al.*, 1998), e este gangliosídio também têm sido associado ao microdomínio de interação entre FGFR e integrina (Toledo *et al.*, 2005). Uma vez que encontramos gangliosídios e integrina nas mesmas frações obtidas de gradiente de sacarose, torna-se interessante a realização de novos estudos em nosso modelo experimental para elucidar essa questão.

O gangliosídio GM1, cujo *capping* para a região de contato entre células do estroma e células FDC-P1 foi evidenciado em nosso estudo, também tem sido relacionado a interações adesivas. Em linfócitos T, *rafts* contendo CD44 e outras moléculas de adesão são enriquecidos em GM1 e perdem GM3 (Gómez-Mountón *et al.*, 2001). Além disso, o *capping* de GM1 em linfócitos murinos é acompanhado pelo *capping* de α -actina, indicando uma possível participação deste gangliosídio na reorganização do citoesqueleto imediatamente abaixo da membrana plasmática (Kellie *et al.*, 1983). As interações adesivas entre células também podem ocorrer no contexto de um sistema de reconhecimento, independente do bem conhecido sistema mediado por integrinas, onde carboidratos atuariam como moléculas de reconhecimento (Kojima & Hakomori, 1991) e se organizariam em arranjos estruturais que lembram as sinapses imunorregulatórias, sendo definidos por Hakomori (2002) como glicosinapses. Esses arranjos exerceriam um papel central na definição de mudanças fenotípicas após a adesão celular (Hakomori, 2003).

Concluindo, propomos que o estroma fornece os fatores de crescimento requeridos para a sobrevivência e proliferação das células mielóides, assim como os proteoglicanos necessários para a otimização da sinalização destes fatores. Providencia também gangliosídios, os quais são transferidos do estroma para as células-alvo, gerando domínios de membrana específicos contendo complexos macromoleculares que incluem os receptores para fatores de crescimento envolvidos por moléculas associadas. Esse conjunto seria essencial para colocar as células mielopoieticas em um contexto adequado de sinalização celular capaz de conduzi-las à proliferação e/ ou diferenciação celular.

PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste estudo culminaram em uma proposta de participação dos gangliosídeos na determinação da capacidade de suporte mielopoiético de diferentes estromas, especialmente no que diz respeito à sinalização mediada por GM-CSF. No entanto, muitas questões ainda necessitam ser esclarecidas, as quais geram as seguintes perspectivas de trabalho:

1. Estudar a influência do gangliosídeo GM3 sobre a sinalização celular mediada por GM-CSF, analisando tanto alterações da fosforilação do receptor de GM-CSF como a possível interação molecular entre GM3 e GM-CSF.

2. Investigar o mecanismo de transferência de GM3 das células AFT-024 para as células FDC-P1, verificando também se esse fenômeno se repete nos demais modelos de mielopoiese *in vitro* estudados.

3. Verificar o papel do gangliosídeo GM1 no microambiente estabelecido na região de contato entre células do estroma e células progenitoras mielóides.

4. Avaliar a participação do gangliosídeo GD1a na determinação da capacidade de sustentação mielopoiética.

5. Isolar *rafts* de coculturas nos modelos de mielopoiese estudados e determinar sua composição em glicosfingolipídios e proteínas.

REFERÊNCIAS

- Allen, T.D., Dexter, T.M., Simmons, P.J. (1990) Marrow biology and stem cells. In: Dexter, T.M., Garland, J.M., Testa, N.G. (Eds) **Colony Stimulating Factors**. Marcel Dekker, New York, 1-38.
- Alvarez-Silva, M., Silva, L.C., Borojevic, R. (1993) Cell membrane-associated proteoglycans mediate extramedullar myeloid proliferation in granulomatous inflammatory reactions to schistosome eggs. *J. Cell. Sci.* **104**, 477-484.
- 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. Leuk. Biol.* **59**, 435-441.
- Andrade, C.M.B., Ziulkoski, A.L., dos Santos, A.X.S., Sisti, E., Trindade, V.M.T., Borojevic, R., Guma, F.C.R. Gangliosides regulate the capacity of stromal cells to support myelopoiesis. *Manuscrito*.
- Arcanjo, K., Belo, G., Folco, C., Werneck, C.C., Borojevic, R., Silva, L.C. (2002) Biochemical characterization of heparan sulfate derived from murine hematopoietic stromal cell lines: a bone-marrow derived cell line S17 and a fetal liver-derived cell line AFT024. *J. Cell. Biochem.* **87**, 160-172.
- Bharti, A.C., Singh, S.M. (2000) Induction of apoptosis in bone marrow cells by gangliosides produced by a T cell lymphoma. *Immunology Letters* **72**, 39-48.
- Barthi, A.C.; Singh, S.M. (2001) Gangliosides derived from a T cell lymphoma inhibit bone marrow cell proliferation and differentiation. *Int. Immunopharm.* **1**, 155-165.

- Borojevic, R., Carvalho, M.A., Corrêa-Junior, J.D., Arcanjo, K., Gomes, L., Joazeiro, P.P., 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.
- Borojevic, R., El-Cheikh, M.C., Alvarez-Silva, M., Almeida, K.G., Dutra, H.S. (1993) Hepatic myelopoiesis associated with inflammation: liver connective tissue cells form a myelopoietic stroma. In: **Cells hepatic sinusoid**. Kupfer Cell Foundation, Leiden, The Netherlands, vol. 4, 130-133.
- Bretscher, V., Andreutti, D., Neuville, P., Martin, M., Martin, F., Lefebvre, O., Gilles, C., Benzonana, G., Gabbiani, G. (2000) GM-CSF expression by tumor cells correlates with aggressivity and with stroma reaction formation. *J. Submicroscop. Cytol. Pathol.* **32**, 525-533.
- Brodsky, V., Zvezdina, N., Nechaeva, N., Novikova, T., Gvasava, I., Fateeva, V., Gracheva, H. (2003) Loss of hepatocyte co-operative activity after inhibition of ganglioside GM1 synthesis and shedding. *Cell Biol. Int.* **27**, 935-942.
- Carvalho, M.A., Arcanjo, K., Silva, L.C.F., 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.
- Chigorno, V., Palestini, P., Sciannamblo, M., Dolo, V., Pavan, A., Tettamanti, G., Sonnino, S. (2000) Evidence that ganglioside enriched domains are distinct from caveolae in MDCK II and human fibroblast cells in culture. *Eur. J. Biochem.* **267**, 4187-4197.
- de Gassart, A., Géminard, C., Février, B., Raposo, G., Vidal, M. (2003) Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood* **102**, 4336-4344.
- Denzer, K., Kleijmeer, M.J., Heijnen, H.F., Stoorvogel, W., Geuze, H.J. (2000) Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J. Cell Sci.* **113**, 3365-3374.

- Desmoulière, A., Tuchweber, B., Gabbiani, G. (1995) Role of myofibroblast differentiation during liver fibrosis. *J. Hepatol.* **22**, 61-64.
- Dolo, V., Li, R., Dillinger, M., Flati, S., Manela, J., Taylor, B.J., Pavan, A., Ladisch, S. (2000) Enrichment and localization of ganglioside G_{D3} and caveolin-1 in shed tumor cell membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1486**, 265-274.
- Fleetwood, A.J., Cook, A.D., Hamilton, J.A. (2005) Functions of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Crit. Rev. Immunol.* **25**, 405-428.
- Franzen, R., Bouhy, D., Schoenen, J. (2004) Nervous system injury: focus on the inflammatory cytokine “granulocyte-macrophage colony stimulating factor.” *Neurosci. Lett.* **361**, 76-78.
- Giebel, B., Corbeil, D., Beckmann, J., Höhn, J., Freund, D., Giesen, K., Fischer, F., Kögler, G., Wernet, P. (2004) Segregation of lipid raft markers including CD133 in polarized human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **104**, 2332-2338.
- Gillard, B.K., Clement, R.G., Marcus, D.M. (1998) Variations among cell lines in the synthesis of sphingolipids in de novo and recycling pathways. *Glycobiology* **8**, 885-890.
- Gómez-Moutón, C., Abad, J.L. Mira, E., Lacalle, R.A., Gallardo, E., Jiménez-Baranda, S., Illa, I. Bernad, A., Mañes, S., Martínez-A, C. (2001) Segregation of leading-edge and uropod components into specific lipid rafts during T cell polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 9642-9647.
- Guthridge, M.A., Barry, E.F., Felquer, F.A., McClure, B.J., Stomski, F.C., Ramshaw, H., Lopez, A.F. (2004) The phosphoserine-585-dependent pathway of the GM-CSF/IL-3/IL-5 receptors mediates hematopoietic cell survival through activation of NF-κB and induction of bcl-2. *Blood* **103**, 820-827.
- Hakomori, S. (1981) Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation and oncogenesis. *An. Rev. Biochem.* **50**, 733-764.

- Hakomori, S. (2002) Inaugural Article: The glycosynapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 225-232.
- Hakomori, S. (2003) Structure, organization, and function of glycosphingolipids in membrane. *Curr. Opin. Hematol.* **10**, 16-24.
- Hamilton, J.A. (2002) GM-CSF in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol.* **23**, 403-408.
- Hamilton, J.A., Anderson, G.P. (2004) GM-CSF biology. *Growth Factors.* **22**, 225-31.
- Hanai, N., Nores, G.A., MacLeod, C., Torres-Mendez, C., Hakomori, S. (1988) Ganglioside-mediated modulation of cell growth. *J. Biol. Chem.* **263**, 10915-10921.
- Hansen, G.H., Niels-Christiansen, L., Thorsen, E., Immerdal, L., Danielsen, E.M. (2000) Cholesterol depletion of enterocytes: effect on the Golgi complex and apical membrane trafficking. *J. Biol. Chem.* **275**, 5136-5142.
- Heyworth, C.M., Ponting, I.L.O., Dexter, T.M. (1988) The response of hematopoietic cells to growth factors: developmental implications of synergic interactions. *J. Cell Sci.* **91**, 239-247.
- Holgate, S.T. (2000) Epithelial damage and response. *Clin. Exp. Allergy* **30**, 37-41.
- Hynds, D.L., Summers, M., Van Brocklyn, O'Dorisio, M.S., E.G., Yates, A.J. (1995) Gangliosides inhibit platelet-derived growth factor-stimulated growth, receptor phosphorylation, and dimerization in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J. Neurochem.* **65**, 2251-2258.
- Iwabuchi, K., Handa, K.; Hakomori, S. (1998) Separation of "glycosphingolipid signaling domain" from caveolin-containing membrane fraction in mouse melanoma B16 cells and its role in cell adhesion coupled with signaling. *J. Biol. Chem.* **273**, 33766–33773.
- Kaucic, K., Grovas, A., Li, R., Quinones, R., Ladisch, S. (1994) Modulation of human myelopoiesis by human gangliosides. *Exp. Hematol.* **22**, 52-59.

- Kawakami, Y., Kawakami, K., Steelant, W.F., Ono, m., Baek, R.C., Handa, K., Withers, D.A., Hakomori, S. (2002) Tetraspanin CD9 is a “proteolipid”, and its interaction with α_3 integrin in microdomain is promoted by GM3 ganglioside, leading to inhibition of laminin-5-dependent cell motility. *J. Biol. Chem.* **277**, 34349-34358.
- Kawishima, I., Ozawa, H., Kotani, M., Suzuki, M., Kawano, T., Gomibuchi, M., Tai, T. (1993) Characterization of ganglioside expression in human melanoma cell: immunological and biochemical analysis. *J. Biochem.* **114**, 186-193.
- Kierszenbaum, A.L. (2004) *Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia*. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 173.
- Klenk, E. (1942) Gangliosides, new group of sugar-containing cerebral lipids. *Physiol. Chem.* **273**, 76.
- Kojima, N., Hakomori, S. (1991) Cell adhesion, spreading, and motility of GM3-expressing cells based on glycolipid-glycolipid interaction. *J. Biol. Chem.* **266**, 17552-17558.
- Kong, Y., Li, R., Ladisch, S. (1998) Natural forms of shed tumor gangliosides. *Biochim. Biophys. Acta* **1394**, 43-56.
- Li, R., Liu, Y., Ladisch, S. (2001) Enhancement of epidermal growth factor signaling and activation of Src kinase by gangliosides. *J. Biol. Chem.* **276**, 42782-42792.
- Li, R., Manela, J., Ladisch, S. (2000) Cellular gangliosides promote growth factor-induced proliferation of fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **275**, 34213-34223.
- Liu, Y., Li, R., Ladisch, S. (2004) Exogenous ganglioside G_{D1a} enhances epidermal growth factor receptor binding and dimerization. *J. Biol. Chem.* **279**, 36481-36489.
- Lopez, A.F., Vads, M.A., Woodcock, J.M., Milton, S.E., Lewis, A., Elliot, M.J., Gillis, D., Ireland, R., Owell, E., Park, L.S. (1991) Interleukin-5 interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor cross-compete for binding to cell surface receptors on human eosinophils. *J. Biol. Chem.* **266**, 24741-24747.

- Lucero, H.A., Robbins, P.W. (2004) Lipid rafts-protein association and the regulation of protein activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **426**, 208-224.
- Maccioni, H.J.F., Daniotti, J.L., Martina, J.A. (1999) Organization of ganglioside synthesis in the Golgi apparatus. *Biochim. Biophys Acta* **1437**, 101-118.
- McKallip, R., Li, R., Ladisch, S. (1999) Tumor gangliosides inhibit the tumor-specific immune response. *J. Immunol.* **163**, 3718-3726.
- Mann, A., Breuhahn, K., Schirmacher, P., Blessing, M. (2001) Keratinocyte-derived granulocyte-macrophage colony stimulating factor accelerates wound healing: Stimulation of keratinocyte proliferation, granulation tissue formation, and vascularization. *J. Invest. Dermatol.* **117**, 1382-1390
- Metcalfe, D. (1993) Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety? *Blood* **82**, 3515-3523.
- Miljan, E.A., Bremer, E.G. (2002) Regulation of growth factor receptors by gangliosides. *SciSTKE*, 2002 (160), RE15.
- Millán, J. Qaidi, M., Alonso, M.A. (2001) Segregation of co-stimulatory components into specific T cell surface lipid rafts. *Eur. J. Immunol.* **31**, 467-473.
- Nakamura, O., 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**, 1940-1945.
- Nakamura, M., Tsunoda, A., Sakoe, K., Gu, J., Nishikawa, A., Taniguchi, N., Satio, M. (1992) Total metabolic flow of glycosphingolipid biosynthesis is regulated by UDP-GlcNAc:lactosylceramide beta 1→3 N-acetylglucosaminyltransferase and CMP-NeuAc:lactosylceramide alpha 2→3 sialyltransferase in human hematopoietic cell line HL-60 during differentiation. *J. Biol.Chem.* **267**, 23507-23514.
- Olshefski, R. Ladisch, S. (1996) Intercellular transfer of shed tumor cell gangliosides. *FEBS Letters* **386**, 11-14.

- Rebbaa, A., Hurh, J., Yamamoto, K., Kersey, D.S., Bremer, E.G. (1996) Ganglioside GM3 inhibition of EGF receptor mediated signal transduction. *Glycobiology* **6**, 399-406.
- 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. USA* **99**, 4367-4372.
- Saito, M., Frielle, T., Benovic, J.L., Ledeen, R.W. (1995) Modulation by GM1 ganglioside of β 1-adrenergic receptor-induced cyclic AMP formation in Sf9 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1267**, 1-5.
- Santos, A.N., Roentsch, J., Danielsen, E.M., Langner, J., Riemann, D. (2000) Aminopeptidase N/CD13 is associated with raft membrane microdomains in monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**, 143-148.
- Saqr, H., Lee, M.C., Burkman, A.M., Yates, A.J. (1995) Gangliosides have a bimodal effect on DNA synthesis in U-1242 MG human glioma cells. *J. Neurosci. Res.* **41**, 491-500.
- Sietsma, H., Nijhof, W., Dontje, B., Vellenga, E., Kamps, W.A., Kok, J.W. (1998) Inhibition of hemopoiesis *in vitro* by neuroblastoma-derived gangliosides. *Cancer Res.* **58**, 4840-4844.
- Sietsma, H., Kamps, W.A., Dontje, B., Hendriks, D., Kok, J.W., Vellenga, E., Nijhof, W. (1999) Leukemia-induced bone marrow depression: effects of gangliosides on erythroid cell production. *Int. J. Cancer* **82**, 92-97.
- Simons, K., Ikonem, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 56-772.
- Simons, M., Friedrichson, T., Schulz, J.B., Pitto, M., Masserini, M., Kurzchalia, T.V. (1999) Exogenous administration of gangliosides displaces GPI-anchored proteins from lipid microdomains in living cells. *Mol. Biol. Cell.* **10**, 3187-3196.
- Simons, K., Toomre, D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nature reviews* **1**, 31-39.
- Singer, S.J., Nicholson, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-731.

- Skokos, D., Le Panse, S., Villa, I., Rousselle, J.C., Peronet, R., David, B., Namane, A., Mécheri, S. (2001) Mast cell-dependent B and T lymphocyte activation is mediated by the secretion of immunologically active exosomes. *J. Immunol.* **166**, 868-876.
- Song, Y., Withers, D.A., Hakomori, S. (1998) Globoside-dependent adhesion of human embryonal carcinoma cells, based on carbohydrate-carbohydrate interaction, initiates signal transduction and induces enhanced activity of transcription factors AP1 and CREB. *J. Cell. Biol.* **273**, 2517-2525.
- Sorice, M., Longo, A., Garofalo, T., Mattei, V., Misasi, R., Pavan, A. (2004) Role of GM3-enriched microdomains in signal transduction regulation in T lymphocytes. *Glycoconj. J.* **20**, 63-70.
- Svennerholm, L. (1956) Composition of gangliosides from human brain. *Nature* **177**, 524-52.
- Svennerholm, L. (1963) Chromatographic separation of human brain gangliosides. *J. Neurochem.* **10**, 613-623.
- Tagami, S., Inokuchi, J., Kabayama, K., Yoshimura, H., Kitamura, F., Uemura, S., Ogawa, S., Ishii, A., Saito, M., Ohtsuka, Y., Sakaue, S., Igarashi, Y. (2002) Ganglioside GM3 participates in the pathological conditions of insulin resistance. *J. Biol. Chem.* **277**, 3085-3092.
- Tavian, M., Cortes, F., Charbord, P., Labastie, M.C., Peault, B. (1999) Emergence of the haemopoietic system in the human embryo and foetus. *Haematologica* **84**, 1-3.
- Tettamanti, G. (2004) Ganglioside/glycosphingolipid turnover: new concepts. *Glycoconj. J.* **20**, 301-317.
- Toledo, M.S., Suzuki, E., Handa, K., Hakomori, S. (2005) Effect of ganglioside and tetraspanins in microdomains on interaction of integrins with fibroblast growth factor receptor.
- Varki, A. (1994) Selectin ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7390-7397.

- Wang, X., Rahman, Z., Sun, P., Meuillet, E., George, D., Bremer, E.G., Paller, A.S. (2001a) Gangliosides modulates epidermal growth factor receptor action by altering ligand bind. *J. Invest. Dermatol.* **116**, 69-76.
- Wang, X., Sun, P., Al-Qamari, A., Tai, T., Kawashima, I., Paller, A.S. (2001b) Carbohydrate-carbohydrate binding of ganglioside to integrin alpha(5) modulates alpha(5)beta(1) function *J. Biol. Chem.* **276**, 8436-8444.
- Wang, X, Sun, P., O’Gorman, M., Tai, T., Paller, A.S. (2001c) Epidermal growth factor receptor glycosylation is required for ganglioside GM3 binding and GM3-mediated suppression of activation. *Glycobiology* **11**, 515-522.
- Wettreich, A., Sebollela, A., Carvalho, M.A., Azevedo, S.P., Borojevic, R., Ferreira, S.T., Coelho-Sampaio, T. (1999) Acidic pH modulates the interaction between human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* **274**, 31468-31475.
- Wisniewska, A., Draus, J., Subczynski, W.K. (2003) Is a fluid-mosaic model of biological membranes fully relevant? Studies on lipid organization in model and biological membranes. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **8**, 147-159.
- Yamamura, S., Handa, K., Hakomori, S. (1997) A close association of GM3 with c-Src and Rho in GM3-enriched microdomains at the B16 melanoma cell surface membrane: a preliminary note. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**, 218–222.
- Yamashita, T., Hashiramoto, A., Haluzik, M., Mizukami, H., Beck, S., Norton, A., Kono, M., Tsuji, S., Daniotti, J.L., Werth, N., Sandhoff, R., Sandhoff, K., Proia, R.L. (2003) Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 3445-9.
- Zheng, M., Fang, H., Tsuruoka, T., Tsuji, T., Sasaki, T., Hakomori, S. (1993) Regulatory role of GM3 ganglioside in $\alpha 5\beta 1$ integrin receptor for fibronectin-mediated adhesion of FUA169 cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 2217-2222.

Zon, L.I. (1995) Developmental biology of hematopoiesis. *Blood* **86**, 2876-2891.

ANEXO 1 – LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Estrutura química de alguns gangliosídeos	06
Figura 2. Representação esquemática da síntese de gangliosídeos	07
Figura 3. Esquema de um <i>raft</i> na membrana plasmática	13
Figura 4. Esquema representativo da hematopoiese	16

CAPÍTULO 1

Figure 1. Myelosupportive activity of AFT-024 cells for survival and proliferation of FDC-P1 cells	25
Figure 2. Inhibition of FDC-P1 cell survival and proliferation in co-culture with AFT-024 cells in which ganglioside synthesis was inhibited by PDMP	26
Figure 3. Analysis of glycosphingolipids in AFT-024 and FDC-P1 cells	26
Figure 4. Subcellular location of GM3 and GM-CSF-R α in cell cultures and co-culture systems	28
Figure 5. Subcellular location of GM1 and GM-CSF-R α in cell cultures and co-culture systems	29
Figure 6. Analysis of FDC-P1 uptake of ganglioside GM3 and GD1a from AFT-024-cell-conditioned medium	29

CAPÍTULO 2

Figura 1. Imagens representativas de esfingolipídios marcados com ceramida fluorescente em células AFT-024	45
Figura 2. Imagens representativas da transferência de esfingolipídios das células AFT-024 para as células FDC-P1 em sistemas de cocultivo	46
Figura 3. Solubilidade de glicosfingolipídios das linhagens AFT-024 e FDCP-1 a Triton X-100	47
Figura 4. Distribuição de gangliosídios (A) e imunodeteção de β integrina (B) nas frações obtidas do gradiente de sacarose contínuo (5 - 35%) após lise das células AFT-024 com Triton X-100 a 4°C	48

CAPÍTULO 3

Figure 1. FDC-P1 cell survival and proliferation in coculture with different stroma cells	73
Figure 2. Ganglioside synthesis and shedding by S17, SF and GRX cells	74
Figure 3. Inhibition of survival and proliferation of FDC-P1 cells in conditioned medium of S17, SF and GRX cells	75

CAPÍTULO 4

Figura 1. Imagens representativas da localização subcelular dos gangliosídios GM1 e GM3, GMCSFR β e CD44 em coculturas de células AFT-024 e FDC-P1	84
Figura 2. Imagens representativas da localização subcelular do gangliosídio GM1 em fibroblastos de pele e na linhagem celular S17	85

ANEXO 2 – LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1. Densitometric analysis of metabolically labelled lipids from AFT-024 cells	27
---	-----------

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Análise densitométrica das bandas autorradiográficas dos glicosfingolípídios das frações solúvel e insolúvel a Triton X-100 de células AFT-024 e FDC-P1	44
--	-----------

CAPÍTULO 3

Table 1. Sialic acid determination in lipids of the S17, SF and GRX cells	69
Table 2. Densitometric analysis of lipids synthesized and shed from S17, SF and GRX cells	70
Table 3. FDC-P1 proliferation in presence of cytokines, stromas conditioned mediums and gangliosides	71