

**VÂNIA PERETTI DE ALBUQUERQUE WOBETO**

**“SILENCIAMENTO DO GENE DA ENZIMA  
PIP2I $\alpha$  EM CÉLULAS DE LINHAGEM  
ERITROLEUCÊMICA HUMANA (K562)”**

**CAMPINAS  
2012**





---

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

**“SILENCIAMENTO DO GENE DA ENZIMA PIPKII $\alpha$  EM CÉLULAS  
DE LINHAGEM ERITROLEUCÊMICA HUMANA (K562)”**

**VÂNIA PERETTI DE ALBUQUERQUE WOBETO**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas - UNICAMP para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, área de concentração Ciências Biomédicas. Sob orientação da Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati

CAMPINAS

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

W813s Wobeto, Vânia Peretti de Albuquerque, 1970 -  
Silenciamento do gene da enzima PIPKII $\alpha$  em células  
de linhagem eritroleucêmica humana (K562) / Vânia  
Peretti de Albuquerque Wobeto. -- Campinas, SP : [s.n.],  
2012.

Orientador : Maria de Fátima Sonati  
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Proteína Quinases. 2. Expressão Gênica. 3.  
Interferência de RNA. 4. Globinas. I. Sonati, Maria de  
Fátima. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Silencing of the PIPKII $\alpha$  in human erythroleukemia cell line

**Palavras-chave em inglês:**

Kinases Proteins

Gene Expression

RNA Interference

Globins

**Área de concentração:** Ciências Biomédicas

**Titulação:** Doutor em Ciências Médicas

**Banca examinadora:**

Maria de Fátima Sonati [Orientador]

Elvira Maria Guerra Shinohara

Jaime Martins de Santana

Maricilda Palandi de Mello

Márcia Regina de Souza Cossa Wenning

**Data da defesa:** 26-01-2012

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências Médicas

---

## Banca examinadora de Tese de Doutorado

---

Vânia Peretti de Albuquerque Wobeto

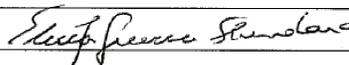
---

**Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Maria de Fátima Sonati**

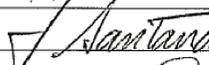
---

### Membros:

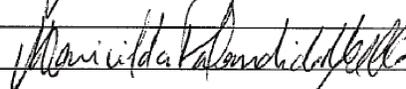
Professor (a) Doutor (a) Elvira Maria Guerra Shinohara



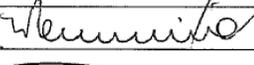
Professor (a) Doutor (a) Jaime Martins de Santana



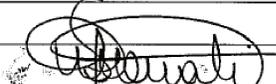
Professor (a) Doutor (a) Maricilda Palandi de Mello



Professor (a) Doutor (a) Márcia Regina de Souza Cossa Wenning



Professor (a) Doutor (a) Maria de Fátima Sonati



Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

**Data: 26/01/2012**

---

## **DEDICATÓRIA**

Ao meu esposo Rudimar pela compreensão, estímulo, paciência e incentivo para a concretização deste sonho.

## AGRADECIMENTOS

---

A Deus, que é vida e luz no meu caminho.

À memória de meus pais, Armando Albuquerque de Oliveira e Dora Peretti de Oliveira, que foram exemplo de força, coragem, caráter, dignidade e sabedoria.

Aos meus filhos, Rodrigo Peretti Wobeto e William Peretti Wobeto, que muitas vezes tiveram que suportar a minha ausência.

À Profª. Dra. Maria de Fátima Sonati, pela orientação, dedicação, paciência, apoio e compreensão na realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Profª. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara, Prof. Dr. Jaime Martins de Santana, Profª. Dra. Maricilda Palandi de Mello, Profª. Dra. Márcia Regina de Souza Cossa Wenning, pelas sugestões, correções e críticas que enriqueceram esta tese.

Ao João Agostinho Machado Neto, pela imensa colaboração, pelo grande tempo gasto, por suas ideias brilhantes e disponibilidade na execução deste trabalho sem o qual dificilmente teria obtido tantos resultados.

À Profª. Dra. Sara Teresinha Ollala Saad, Profª. Dra. Maria Heloisa de Souza Lima Blotta e ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa por disponibilizar seus laboratórios.

À Dra. Tânia Regina Zaccariotto, Dra. Carolina Lanaro e Dra. Daniela Maria Ribeiro, pelas valiosas colaborações em várias etapas deste trabalho.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação e do Laboratório de Hemoglobinopatias, pela saudável convivência e amizade.

À FAPESP, CAPES e ao CNPq, pelo suporte financeiro ao projeto.

## SUMÁRIO

---

	PÁG.
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xvi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>18</b>
1.1) A Sinalização celular .....	19
1.2) As Proteínas Quinases.....	21
1.3) Os Fosfoinosítídeos e a Família das Fosfatidilinositol-Fostato Quinases (PIPks).....	23
1.4) As PIPks, os Fosfoinosítídeos e as suas Funções no Núcleo. ....	30
1.5) As PIPks, o PI4,5P <sub>2</sub> e as Células Hematopoiéticas.....	31
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
<b>3. CAPÍTULO 1</b> .....	<b>38</b>
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>64</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>70</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>72</b>
<b>7. ANEXOS</b> .....	<b>78</b>
ANEXO 1: Dados estatísticos utilizados para elaboração do manuscrito .....	79
ANEXO-2: Parecer do Comitê de Ética/FCM/UNICAMP .....	95

## LISTA DE FIGURAS

	<b>PÁG.</b>
<b>Figura 1</b> Via de sinalização intracelular ativada por molécula sinalizadora extracelular. A molécula sinalizadora se liga à proteína receptora, ativando uma via de sinalização intracelular mediada por uma série de proteínas. Este sinal interage com uma proteína alvo e gera uma resposta celular (Albert et al., 2010).....	20
<b>Figura 2</b> Atuação de moléculas-sinal em vários receptores ocasionando diferentes respostas. Quando ocorre a privação destes sinais, a célula entra em processo de apoptose (Albert et al., 2010). .....	21
<b>Figura 3</b> Proteína quinase adiciona covalentemente um fosfato de ATP na proteína sinalizadora, e uma proteína-fosfatase remove o fosfato (Albert et al., 2010).....	22
<b>Figura 4</b> A estrutura química do fosfatidilinositol é composta por um anel de inositol, que pode ser fosforilado nas posições 3, 4 ou 5 (indicado em vermelho), uma “espinha” de glicerol e cadeias de ácidos graxos (Adaptado de Liu e Bankaitis, 2010).....	24
<b>Figura 5</b> Localização celular do PI4,5P2 (Adaptado de Doughman et al., 2003). .....	26

## LISTA DE TABELAS

---

	PÁG.
<b>Tabela 1 Dados dos pacientes com Doença da Hb H estudados por Wenning et al., 2009.....</b>	<b>34</b>

## **ABREVIATURAS**

DAG: Diacilglicerol

dsRNA: RNA de dupla fita

EGF: Fator de crescimento epidérmico

Hb: Hemoglobina

HbA2: Hemoglobina A2

HbF: Hemoglobina fetal

HCM: Hemoglobina corpuscular média

Ht: Hematócrito

HL60: Leucemia mielocítica aguda

K562: Células de eritroleucemia humana

KG1: Eritroleucemia

NB4: Leucemia promielocítica aguda

IP: Inositol fosfato

IP<sub>2</sub>: Inositol bifosfato

IP<sub>3</sub>: Inositol trifosfato

mRNA: RNA mensageiro

P39: Leucemia mielomonocítica secundária à mielodisplasia

PI3P: Fosfatidilinositol-3-fosfato

PI4P: Fosfatidilinositol-4-fosfato

PI5P: Fosfatidilinositol-5-fosfato

PI3,4P<sub>2</sub>: Fosfatidilinositol-3,4-bifosfato

PI3,5P<sub>2</sub>: Fosfatidilinositol-3,5-bifosfato

PI3,4,5P<sub>3</sub>: Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato

PI4,5P<sub>2</sub>: Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato

PIPKs: Fosfatidilinositol- fosfato quinases

PKC: Proteína quinase C

RET: Reticulócitos

RNAi: RNA de interferência

SDM: Sistema de demarcação de membrana

TNF: Fator de necrose tumoral

VCM: Volume corpuscular médio

## **RESUMO**

As fosfatidilinositol-fosfato quinases (PIPks) pertencem a uma família de enzimas lipídio-quinases que geram vários mensageiros lipídicos, incluindo um importante segundo mensageiro denominado fosfatidilinositol-4,5-bifosfato, que participa da regulação de diversas atividades celulares, como a modulação do citoesqueleto de actina, o transporte de vesículas, a formação de adesão focal e diversos eventos nucleares, incluindo a expressão gênica. A subfamília da PIPK está dividida, conforme a especificidade de sinalização, em tipo I (isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ), tipo II (isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) e tipo III. Em estudo recentemente realizado em nosso laboratório, o gene da PIPKII $\alpha$  mostrou-se diferencialmente expresso em reticulócitos de dois irmãos com Doença de Hemoglobina H, sendo maior no paciente com maior nível de hemoglobina anômala, paralelamente à expressão do gene da globina  $\beta$ , sugerindo uma possível relação entre a PIPKII $\alpha$  e a produção de globinas. Além disso, análises realizadas durante a diferenciação eritróide de células CD34<sup>+</sup>, em cultura, demonstraram que as expressões dos genes das PIPks aumentam à medida que essas células se tornam mais diferenciadas. O papel da PIPK no processo hematopoiético, no entanto, tem sido pouco explorado. No presente trabalho, investigamos a localização celular da PIPKII $\alpha$  e sua expressão gênica e protéica durante a diferenciação eritróide, megacariocítica e granulocítica de células da linhagem hematopoiética e demonstramos que o silenciamento do gene da PIPKII $\alpha$ , em células K562, resulta em diminuição da proliferação deste tipo celular, aumento de expressão do gene da globina  $\alpha$  e uma tendência de elevação da expressão do gene da globina  $\gamma$ . Esses resultados corroboram a sugestão prévia de existência de relação entre a PIPKII $\alpha$  e a expressão dos genes de globinas, relação que deve continuar a ser investigada em células eritróides normais e de pacientes com hemoglobinopatias.

## **ABSTRACT**

Phosphatidylinositol-phosphate kinases (PIPKs) belong to a family of lipid kinase enzymes that generate various lipid messengers, including an important second messenger known as phosphatidylinositol-4,5-biphosphate, which participates of the regulation of several cell activities, such as modulation of the actin cytoskeleton, vesicle transport, formation of focal adhesions and various nuclear events, including regulation of gene expression. The PIPK subfamily is divided into types I (isoforms  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ), II ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ) and III according to signaling specificity. In a recent study in our laboratory, the PIPKII $\alpha$  gene was differentially expressed in reticulocytes from two siblings with hemoglobin H disease: expression of this gene, as well as that of the  $\beta$ -globin gene, was greater in the patient with the higher level of the abnormal hemoglobin, suggesting a possible relationship between PIPKII $\alpha$  and the production of globins. In addition, analyses carried out using CD34<sup>+</sup> cells from cultures undergoing erythroid differentiation showed that PIPK gene expression increased as the cells became more differentiated. However, there has been little research into the role of PIPK in the hematopoietic process. In this study we investigate the cellular location of PIPKII $\alpha$  and the gene and protein expression of this enzyme during erythroid, megakaryocytic and granulocytic differentiation of hematopoietic lineage cells. We show that PIPKII $\alpha$  gene silencing in K562 cells results in reduced proliferation of this cell type, increased  $\alpha$ -globin gene expression and a tendency towards increased  $\gamma$ -globin gene expression. These results corroborate the previous suggestion of a relationship between PIPKII $\alpha$  and globin gene expression, a relationship that should be the subject of further investigation in normal erythroid cells and erythroid cells from patients with hemoglobinopathies.

## **1. INTRODUÇÃO GERAL**

## **1.1) A Sinalização celular**

Para a evolução dos organismos multicelulares levou ao desenvolvimento de mecanismos complexos para coordenar as diversas atividades celulares, como a diferenciação, proliferação e crescimento. A sinalização celular é responsável por uma grande parte destes processos vitais. A informação transmitida, em alguns casos, é realizada por um processo chamado transdução de sinal, na qual uma série de proteínas age alterando a conformação das proteínas subsequentes, ocasionando a sua inibição ou a ativação (Papin et al., 2005). A alteração da proteína alvo modifica a concentração de um ou mais mediadores intracelulares, incluindo os segundos mensageiros, que podem se difundir para longe de sua fonte de produção, transmitindo o sinal para outras partes das células (Figura 1). Esta forma de sinalização celular exige mais do que simples trocas moleculares para inativar ou ativar diversos processos celulares. O sucesso da transdução de sinal necessita da criação de ramos que interajam ativamente e possam influenciar um ao outro. Desta maneira, a simplicidade da comunicação molecular é transformada em sofisticação pela maneira como as vias são interligadas (Ben-Shlomo et al., 2003; Alberts et al., 2010).

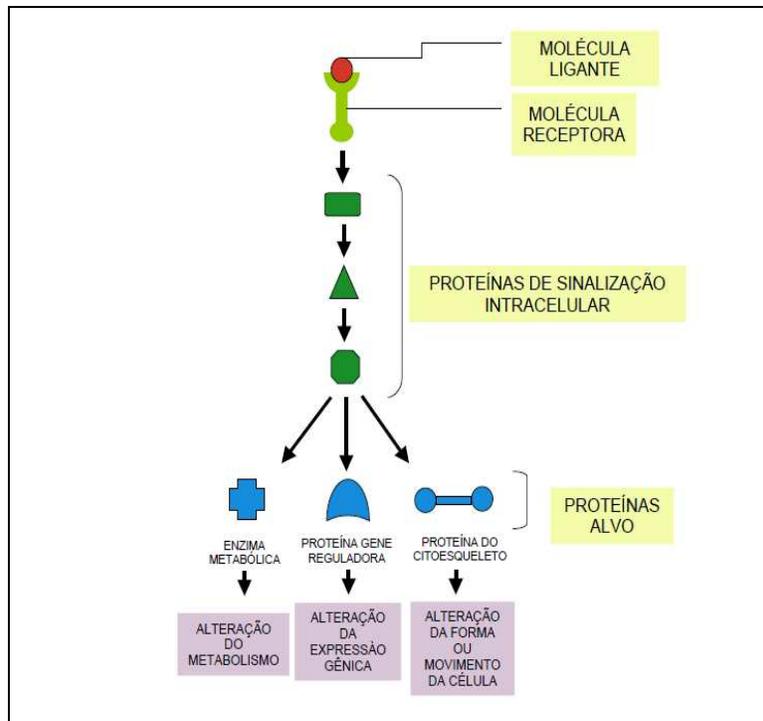


Figura 1 Via de sinalização intracelular ativada por molécula sinalizadora extracelular. A molécula sinalizadora se liga à proteína receptora, ativando uma via de sinalização intracelular mediada por uma série de proteínas. Este sinal interage com uma proteína alvo e gera uma resposta celular (Albert et al., 2010)

Cada célula está exposta a vários sinais provenientes do seu ambiente e precisa estar programada para responder a combinações específicas de moléculas sinalizadoras. A resposta precisa ser seletiva, de acordo com sua característica específica, e é adquirida através da especialização celular progressiva que ocorre durante o desenvolvimento (Pires daSilva e Sommer, 2003). Diferentes células podem responder distintamente ao mesmo sinal químico em função do grupo de proteínas receptoras, ou de acordo com a maquinaria celular que integra e interpreta a informação recebida. Desta forma, a mesma molécula ligante pode ter diversos efeitos sobre as células-alvo e necessita ser reconhecida por receptores específicos para transmitir o sinal de forma eficiente (Figura 2) (Alberts et al., 2010).

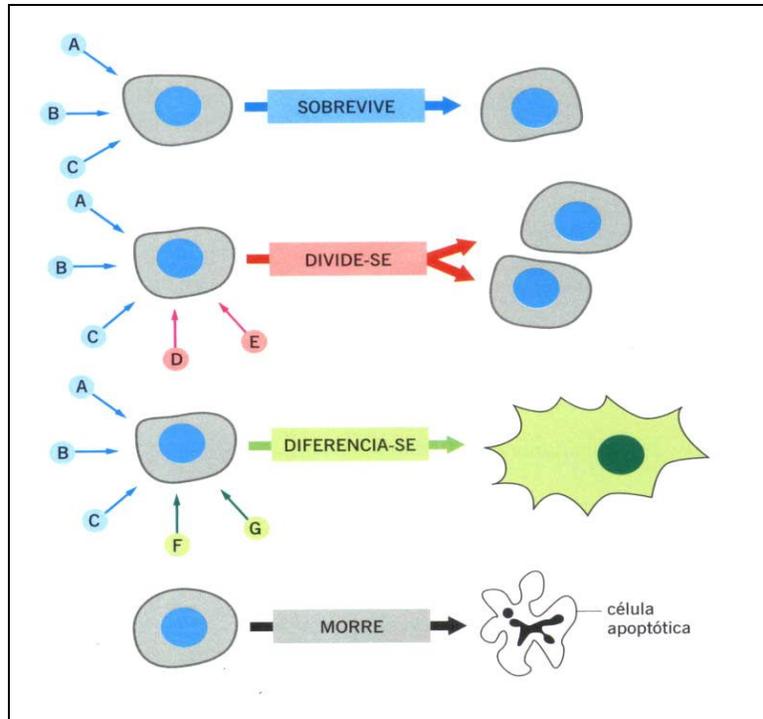


Figura 2 Atuação de moléculas-sinal em vários receptores ocasionando diferentes respostas. Quando ocorre a privação destes sinais, a célula entra em processo de apoptose (Albert et al., 2010).

## 1.2) As Proteínas Quinases

Os primeiros relatos sobre as proteínas quinases foram realizados por Krebs et al., em 1959, e no início dos anos 80 várias delas foram descobertas (Krebs et al., 1959). Estas quinases compõem a maior família de proteínas nos seres eucariontes e possuem um papel central na regulação de suas funções celulares básicas, tais como: rearranjo do citoesqueleto, apoptose, metabolismo energético, replicação, controle do ciclo celular, transcrição gênica, entre outras (Engh e Bossemeyer, 2001). Além disso, participam da sinalização celular através da transdução de sinal, catalisando a fosforilação de proteínas através da transferência de um grupo fosfato de ATP e, em alguns casos, de GTP, para resíduos de treonina-serina ou de tirosina. A fosforilação destes resíduos faz com que ocorram estímulos extracelulares e intracelulares fornecendo um mecanismo altamente

eficiente para o controle da atividade protéica (Figura 3) (Alberts et al. 2010). Neste tipo de sinalização celular ocorre uma grande amplificação do sinal, uma vez que uma única molécula pode fosforilar muitos substratos.

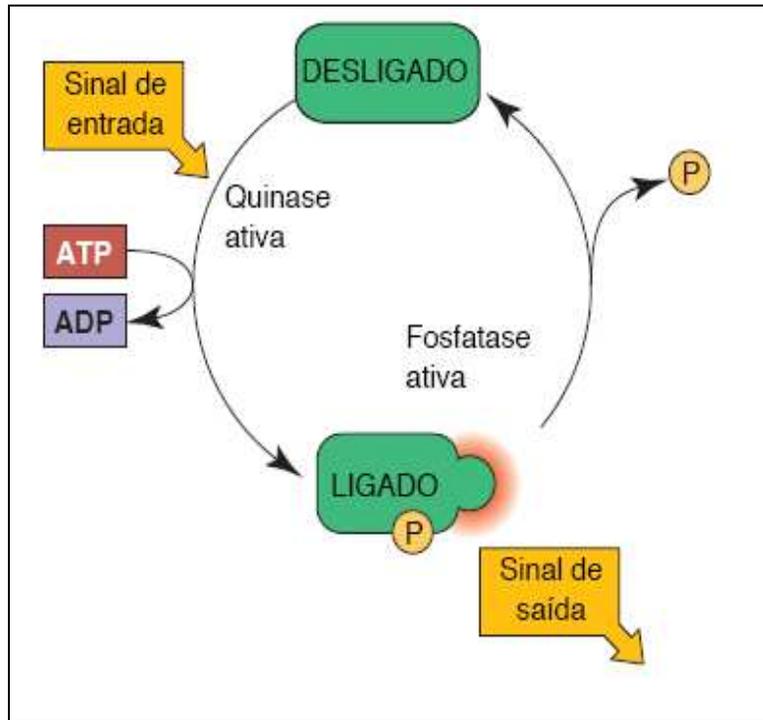


Figura 3 Proteína quinase adiciona covalentemente um fosfato de ATP na proteína sinalizadora, e uma proteína-fosfatase remove o fosfato (Albert et al., 2010).

Plowman et al., usando o *Caenorhabditis elegans* como modelo para estudo de transdução de sinal, demonstraram que as proteínas quinases compõem a segunda maior família de domínios protéicos neste nemátodo, com um total de 411 sequências completas (Plowman et al., 1999). Com a elucidação do projeto genoma humano foram identificados 518 genes codificantes para proteínas quinases, consistindo 1,7% do total de genes humanos (Manning et al., 2002). Dentre 258 proteínas quinases analisadas foram identificados 83 tipos de domínios, dos quais a maioria encontra-se relacionada com a interação com proteínas sinalizadoras que reconhecem e se ligam a resíduos de tirosina

fosforilados. O domínio catalítico característico desta família consiste de aproximadamente 250 a 300 resíduos de aminoácidos e divide-se em onze subdomínios invariáveis. Eles estão fortemente implicados no desempenho de um papel importante na função catalítica das enzimas, tendo ação direta no sítio ativo ou contribuindo para a formação do sítio ativo em uma estrutura secundária. A região não conservada ocorre em forma de “*loop*”, permitindo o encontro entre as regiões catalíticas. Resíduos de aminoácidos individuais, altamente conservados dentro dos subdomínios, participam da ligação ao ATP e da transferência do fósforo.

As alterações funcionais destas enzimas podem levar a uma série de modificações dentro da célula e ocasionar o surgimento de várias patologias, como neoplasias, diabetes e doenças resultantes de defeitos imunológicos (Shchemelinin et al., 2006).

### **1.3) Os Fosfoinosítídeos e a Família das Fosfatidilinositol-Fostato**

#### **Quinases (PIPKs)**

Nos últimos anos, o metabolismo dos fosfolípidos tem se demonstrado um campo de investigação promissor, sobretudo, com a constatação de que a dupla camada de fosfolípidos da membrana celular não tem apenas um papel estrutural, mas também o de um importante reservatório de moléculas pré-formadas a partir de mensageiros dos processos de sinalização intracelular. O fosfatidilinositol, um componente da membrana celular dos eucariotos, é o único fosfolípido cujo grupo inositol pode ser fosforilado nas posições 3, 4 ou 5 (Figura 4), resultando em 7 diferentes fosfolípidos de inositol ou fosfoinosítídeos, o fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P), fosfatidilinositol-4-fosfato (PI4P), fosfatidilinositol-5-fosfato (PI5P), fosfatidilinositol-3,4-bifosfato (PI3,4P2),

fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PI4,5P2), fosfatidil inositol-3,5-bisfosfato (PI3,5P2) e o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PI3,4,5P3), cada um destes apresentando distintas funções (McCrea e De Camilli, 2009).

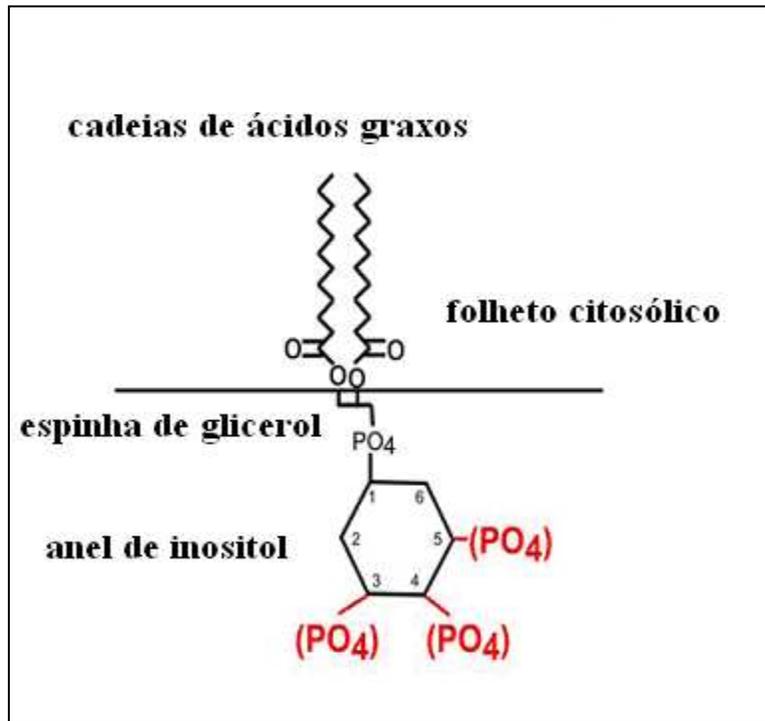


Figura 4 A estrutura química do fosfatidilinositol é composta por um anel de inositol, que pode ser fosforilado nas posições 3, 4 ou 5 (indicado em vermelho), uma “espinha” de glicerol e cadeias de ácidos graxos (Adaptado de Liu e Bankaitis, 2010).

Estes lipídeos representam somente uma pequena porcentagem do total de fosfolípidos presentes na célula e estão envolvidos na regulação de diversos processos celulares, incluindo a proliferação e sobrevivência celular, organização do citoesqueleto, tráfego de vesículas, a formação de adesão focal, regulação de canais iônicos e diversos eventos nucleares (Heck et al., 2007; Skwarek e Boulianne, 2009).

A maioria do conhecimento sobre sinalização celular por fosfoinosítídeos é derivada de vias de sinalização citosólica. Recentemente, alguns estudos, buscaram elucidar o papel

destes mensageiros no núcleo e demonstraram que há diferenças na regulação da sinalização neste compartimento em relação ao citosol e membrana plasmática (Martelli et al., 2005; Bunce et al., 2006; Barlow et al., 2010).

O PI4,5P<sub>2</sub> é um dos fosfoinosítídeos mais estudado e é considerado um mensageiro crítico que propaga sinais intracelulares através de proteínas mediadoras subsequentes na cascata de sinalização, e está presente em vários compartimentos celulares, principalmente, no complexo de Golgi, membrana plasmática e núcleo (Figura 5). A sua produção localizada é requerida nos processos de exocitose, endocitose, proliferação, processamento de RNA mensageiro, transcrição gênica, formação de adesão focal, tráfego de vesículas, e remodelamento de actina (Doughman et al., 2003). Nas células hematopoiéticas, o PI4,5P<sub>2</sub> exerce um papel essencial na sinalização da resposta destas células a certos estímulos, como, por exemplo, a ativação de plaquetas, proliferação celular, quimiotaxia e produção de espécies ativas de oxigênio por neutrófilos (Michell et al., 1992). Além disso, complexos de proteínas solúveis podem se associar com o PI4,5P<sub>2</sub>, mas a relevância funcional ainda não foi bem estabelecida (Doughman et al., 2003; Halstead et al., 2005; Huang et al., 2011).

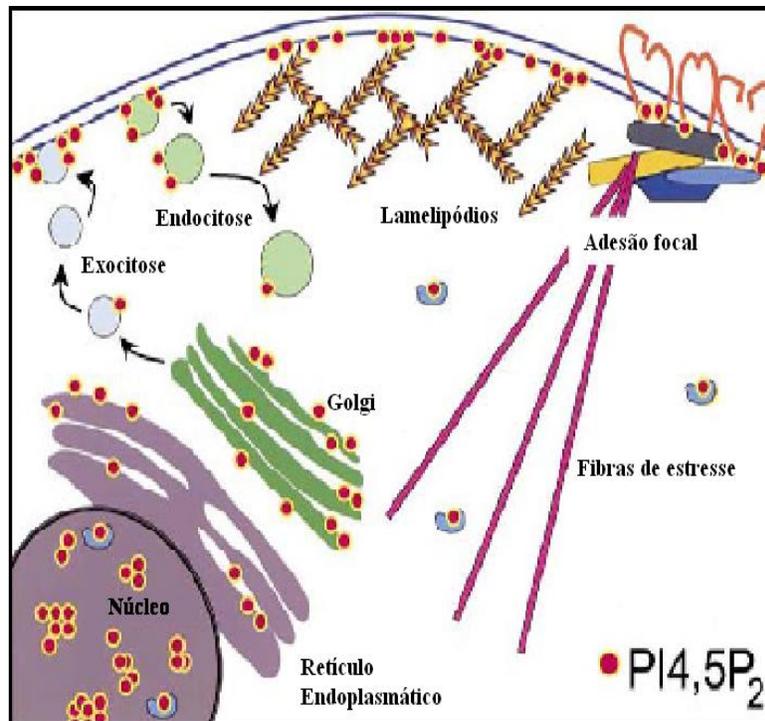


Figura 5 Localização celular do PI4,5P<sub>2</sub> (Adaptado de Doughman et al., 2003).

A hidrólise do PI4,5P<sub>2</sub> é feita pela fosfolipase C e origina dois importantes segundos mensageiros, o diacilglicerol (DAG) e o inositol-trifosfato (IP<sub>3</sub>). O DAG provoca a ativação da proteína quinase C (PKC) e IP<sub>3</sub> causa liberação intracelular de Ca<sup>2+</sup>. Subseqüentemente, o IP<sub>3</sub> recicla-se através de desfosforilações, originando inositol bifosfato (IP<sub>2</sub>) e inositol fosfato (IP), e finalmente inositol, que é o precursor dos fosfoinositóis. Em outra via de sinalização celular, o PI4,5P<sub>2</sub> é clivado pela fosfolipase A para gerar o ácido aracdônico, que é precursor de muitas moléculas de sinalização (McCrea e De Camilli, 2009). Embora seja essencial em diversos processos celulares, a sua regulação fisiológica não é totalmente compreendida (Hinchliffe et al., 2002; Heck et al., 2007).

As enzimas que produzem o PI4,5P<sub>2</sub> pertencem a uma família de lipídeo quinases, as fosfatidilinositol-fosfato quinases (PIPKs), que participam de inúmeras vias de sinalização celular e transdução de sinal, cuja atividade foi descoberta por Hokin e Hokin

em 1964 (Hokin e Hokin, 1964; Doughman et al., 2003) . Somente após três décadas, aproximadamente, as PIPKs foram isoladas de eritrócitos, cérebro, medula da adrenal, fígado, tireóide, baço, além de outras fontes (Bazenet et al., 1990; Carpenter e Cantley, 1990; Divecha et al., 1992; Divecha et al., 1995; Loijens et al., 1996).

Todos os membros desta família apresentam um domínio quinase não conservado em forma de “*loop*”, localizada na região C terminal da proteína, que contém cerca de 20 a 25 resíduos de aminoácidos, que determina a preferência por um substrato específico (Doughman et al., 2003).

As PIPKs são divididas em três subfamílias conforme a especificidade de sinalização em: Tipo I ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ), Tipo II ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) e Tipo III. As PIPK Tipo I (PIPKI)  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  e as PIPK Tipo II (PIPKII)  $\alpha$ ,  $\beta$  são responsáveis por catalisar a produção do PI4,5P<sub>2</sub>, através da fosforilação do PI4P na posição 5 do anel de inositol e da fosforilação do PI5P na posição 4 do anel de inositol, respectivamente (van den Bout e Divecha, 2009). A PIPKII $\gamma$  parece ser inativa, mas, *in vitro*, exerce alguma atividade catalítica quando associada com a PIPKII $\alpha$  (Clarke et al., 2010) No entanto, a PIPKI é responsável pela produção da maioria do PI4,5P<sub>2</sub>, pois a concentração celular do PI4P é cerca de dez vezes maior do que a PI5P (van den Bout e Divecha, 2009). Além disso, estas subfamílias, *in vitro*, fosforilam o PI3P na posição 4 do anel de inositol para gerar o PI3,4P<sub>2</sub>, e na posição 5 para gerar o PI3,4,3P<sub>3</sub>. A família da PIPK tipo III (PIPKIII) produz outro PI3,5P<sub>2</sub> através da fosforilação da posição 5 do anel de inositol do PI3P (Zhang et al., 1997; Heck et al., 2007; van den Bout e Divecha, 2009).

As sequências transcritas da PIPKI $\alpha$  e PIPKII $\alpha$  revelam somente 35% de homologia entre os aminoácidos do domínio quinase, estabelecendo, desta forma, diferenças estruturais

importantes entre as duas isoformas, indicando que estas enzimas apresentam distintas funções e localizações na célula (Loijens e Anderson, 1996). Além disso, estas famílias possuem, ainda, algumas variantes de *splicing* (Heck et al., 2007).

A PIPKI $\alpha$  é encontrada na membrana plasmática, complexo de Golgi e nos agregados de grânulos intercromatínicos. A PIPKI $\beta$  está localizada na membrana plasmática e em vesículas presentes na região perinuclear. A PIPKI $\gamma$  está localizada, principalmente, no complexo de adesão focal. A atividade desta subfamília é necessária para o rearranjo do citoesqueleto de actina, adesão celular, secreção de neurotransmissores, regulação de pequenas proteínas G que agem como sinalizadores (Rac e Rho), endocitose, exocitose, fagocitose e regulação de canais iônicos (Heck et al., 2007; van den Bout e Divecha, 2009). A PIPKII $\alpha$  localiza-se no citosol e, em menor proporção, no núcleo. A PIPKII $\beta$  parece estar localizada, predominantemente, no núcleo, mas a sua capacidade de interagir com o receptor p55 do fator de necrose tumoral (TNF), modulando sua resposta, e com o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF), sugere que esta proteína também pode ser requerida para atuar no citosol. Além disso, esta isoforma pode ser inativada quando é fosforilada em resposta ao estresse celular, levando a um aumento de PI5P nuclear. A PIPKII $\gamma$  localiza-se em um compartimento da endomembrana, que parcialmente se co-localiza com o complexo de Golgi (Heck et al., 2007). Embora ainda existam discussões sobre as funções desempenhadas pela PIPKII, há um consenso que o seu papel principal é regular o nível do PI5P. O PI5P foi descoberto em 1997 como uma fonte de PI4,5P<sub>2</sub> em fibroblastos de mamíferos, mas ainda permanece sendo o membro menos caracterizado de toda família do fosfoinositol, além disso, suas funções celulares e o seu metabolismo são ainda pobremente entendidos, e mutações nos genes que codificam as

suas proteínas regulatórias podem ocasionar várias doenças, como o câncer, miopatia miotubular, desordem bipolar, canalopatias, entre outras (Halstead et al., 2005)

Lecompte et al., em 2008, sugeriram que a geração do PI5P e a sua remoção possa ocorrer por diferentes rotas, envolve distintas combinações de enzimas, e as últimas representantes deste ciclo, que é exclusivo dos metazoários, são a fosfatidilinositol 4,5-bifosfato 4-fosfatase e a PIPKII.

Recentemente, alguns estudos revelaram as localizações e funções das PIPKII. Bultsma et al. (2010) demonstraram que a PIPKII $\beta$ , *in vitro*, apresenta atividade duas mil vezes menor do que a PIPKII $\alpha$ , com a qual pode interagir, *in vitro* e *in vivo*, e que a maioria da atividade enzimática desta enzima é possível somente através desta interação. Desta forma, a PIPKII $\beta$  modula a localização nuclear da PIPKII $\alpha$ , e a PIPKII $\alpha$  tem o papel de regular a função da PIPKII $\beta$ . A superexpressão das duas PIPKs, realizada pelo mesmo grupo de pesquisadores, promoveu o aumento da concentração da PIPKII $\alpha$  no núcleo, sugerindo que, em alguns tipos celulares, o aumento da expressão da PIPKII $\beta$  poderia promover um aumento na concentração de PIPKII $\alpha$  no núcleo. Este aumento promoveria a formação do complexo PIPKII $\alpha$ -PIPKII $\beta$ , tornaria a PIPKII $\beta$  ativa, o que poderia regular a sua atividade catalítica. Wang et al., em 2010, investigando a localização nuclear das PIPKII $\alpha$  e PIPKII $\beta$  sugeriram que 95% PIPKII $\beta$  está presente no núcleo, e que a PIPKII $\alpha$  está distribuída 60% no citoplasma e 40% no núcleo. Além disso, este estudo demonstrou que a interação entre as duas PIPKs é mais prevalente no núcleo, e que uma das formas de migração da PIPKII $\alpha$  do citoplasma para o núcleo é consequência da sua interação com a PIPKII $\beta$ .

A PIPKIII é encontrada basicamente na parte interna da membrana e está envolvida na manutenção da integridade das vesículas celulares (Heck et al., 2007).

#### **1.4) As PIPKs, os Fosfoinosítídeos e as suas Funções no Núcleo.**

A presença de fosfoinositóis e das enzimas responsáveis pelo seus metabolismos, no núcleo de eucariotos já são conhecidas há algumas décadas (Divecha et al., 1993). Os fosfoinositóis nucleares estão localizados, principalmente, na parte interna do envelope nuclear e também em outros locais como nos corpos de Cajal, nucléolo, matriz nuclear e cromatina. Além disto, este *pool* nuclear é independente do *pool* citosólico, e possui a função de regular diversos eventos como a diferenciação, proliferação, progressão do ciclo celular, apoptose, regulação da expressão gênica, processamento do pré-RNA mensageiro (mRNA) e exportação do mRNA para o citoplasma (Doughman et al., 2003; Bunce et al., 2008; Barlow et al., 2010). Algumas PIPKs, como as PIPKI $\alpha$ , PIPKI $\gamma$ , PIPKII $\alpha$  e PIPKII $\beta$ , estão localizadas no núcleo e no citoplasma. A PIPKII $\beta$ , em situações de estresse celular, parece regular os níveis de PI5P nuclear ativando a p38 MAP quinase, que através da fosforilação de dois resíduos de serina da PIPKII $\beta$  causa a sua inibição e, conseqüentemente, aumenta o pool de PI5P (Jones et al., 2006).

A presença de PIPKs tipo I e tipo II no núcleo sugere que diferentes pools de PI4,5P<sub>2</sub> são gerados e podem regular distintas funções. Estas enzimas são direcionadas para estruturas nucleares denominadas agregados de grânulos intercromatínicos, que são ricas em ribonucleoproteínas nucleares pequenas, fatores auxiliares de *splicing* de mRNA e formas hiperfosforiladas de RNA polimerase II. No entanto, os mecanismos pelo qual elas diretamente regulam vários eventos nucleares permanecem, ainda, desconhecidos (Boronenkov et al., 1998; Barlow et al., 2010).

### **1.5) As PIPKs, o PI4,5P<sub>2</sub> e as Células Hematopoiéticas.**

A purificação e caracterização das PIPKs Tipo I e II da membrana de plaquetas humanas foram realizadas por Suzuki et al., em 1991 (Suzuki et al., 1991). A clonagem e sequenciamento da isoforma PIPKII  $\gamma$  foram realizadas por Divecha et al., em 1995 (Divecha et al., 1995). Em 1996, Hinchliffe et al. detectaram a presença do PI4,5P<sub>2</sub> em frações de citoesqueleto de plaquetas lisadas por detergente. Este estudo demonstrou, também, que este pool aumenta em resposta à sinalização mediada por integrinas em eventos associados à agregação plaquetária (Hinchliffe et al., 1996). As PIPKs Tipo I e II contribuem para a produção de grânulos  $\alpha$  plaquetários. No entanto, a PIPK Tipo II é mais abundante nas plaquetas, e o seu substrato, o PI5P, tem seus níveis aumentados após a estimulação de plaquetas pela trombina (Rozenvayn e Flaumenhaft, 2001). Experimentos de silenciamento gênico da PIPKII $\alpha$  em megacariócitos realizados por Schulze et al., em 2006, demonstraram que houve efeitos prejudiciais no sistema de demarcação de membrana (SDM) e na expansão do tamanho celular, sugerindo que a PI4,5P<sub>2</sub> tem, também, a função de facilitar o desenvolvimento do SDM e organizar os filamentos de actina na biogênese das plaquetas.

A clivagem do PI4,5P<sub>2</sub> é necessária para ativar a sinalização dos leucócitos polimorfonucleares quando em contato com substâncias quimioatraentes e para direcionar a migração destas células. No entanto, este mecanismo, ainda não é totalmente compreendido. Pike e Arndt, em 1988, foram os primeiros a identificar a presença da PIPK em neutrófilos (Pike e Arndt, 1988). Estas células, quando estimuladas por um fator quimiotático, adquirem rapidamente a forma polarizada. Esta conformação decorre do aparecimento de ondas de contração equatorial, perpendiculares ao eixo de polarização,

iniciadas pela interação da substância quimiotóxica com o seu receptor, na superfície do neutrófilo. Lacalle et al., realizando experimentos de silenciamento gênico da PIPKI $\beta$ , observaram a inibição da polarização e, conseqüentemente, prejuízo no direcionamento da quimiotaxia de células dHL60 (células de leucemia promielocítica diferenciadas) (Lacalle et al., 2007). Adicionalmente, este mesmo estudo, verificou um efeito positivo na regulação da quimiotaxia dos neutrófilos quando o gene da PIPKI $\beta$  foi superexpresso.

Durante o processo inflamatório, as integrinas desempenham o papel de promover a firme adesão dos neutrófilos às células endoteliais. Recentemente, Xu et al. demonstraram que a deficiência da PIPKI $\gamma$  prejudica o recrutamento de neutrófilos por ocasionar um defeito no mecanismo de adesão. Este estudo sugeriu que a PIPKI $\gamma$  regula o processo de adesão, facilitando a ativação da RhoA GTPase e das integrinas pelos quimioatraentes (Xu et al., 2010). Embora o papel da PIPK Tipo I na sinalização dos neutrófilos tenha sido avaliado em algumas pesquisas, ainda não há trabalhos sobre as funções da PIPK Tipo II nestas células.

Alguns estudos caracterizaram as PIPKs na membrana de eritrócitos humanos permitindo que muitas das suas propriedades bioquímicas fossem elucidadas. Em 1989, Ling et al. purificaram uma proteína com 53 kDa que tinha atividade de PIPK (Ling et al., 1989). Em 1990, Bazenet et al. caracterizaram a PIPK tipo I, com um peso molecular de 68 kDa, na membrana, e a PIPK tipo II, com 53 kDa, no citosol. Este estudo demonstrou, também, que a PIPK Tipo II está presente em grandes quantidades em células provenientes da medula óssea, podendo influenciar, através da produção de PI4,5P<sub>2</sub>, as células precursoras eritróides (Bazenet et al., 1990). A primeira PIPK a ser clonada dos eritrócitos foi a PIPKII $\alpha$  (Boronenkov e Anderson, 1995). Além disso, Clarke et al., em 2008, investigando as localizações dos subtipos da PIPK Tipo II em vários tecidos, demonstraram

que a PIPKII $\alpha$  é a isoforma mais abundante no baço, que é um sítio de síntese de linfócitos B e T, eritrócitos e plaquetas, refletindo, provavelmente, o papel desta isoenzima na hematopoiese (Clarke et al., 2008). Wenning et al., em um estudo recentemente realizado no nosso laboratório, analisaram a expressão gênica diferencial em reticulócitos de dois irmãos com Doença de Hemoglobina (Hb) H (genótipo  $-\alpha^{3.7}/-^{SEA}$ ), em que somente um dos genes  $\alpha$  globina no genoma diplóide permanece ativo, resultando em anemia hemolítica crônica, que pode ser agravada por infecções, febre, ingestão de drogas oxidantes e gravidez (Chui et al., 2003). A Hb H é instável e precipita nas hemácias com o envelhecimento, lesando a membrana celular e levando à remoção precoce dos eritrócitos da circulação. A doença manifesta-se com um quadro clínico que guarda relação com a quantidade de Hb H produzida. Formas não deletoriais de talassemia  $\alpha$  correspondem a níveis de Hb H mais elevados do que aqueles resultantes da interação de deleções porque, neste último caso, há um aumento compensatório na expressão do gene  $\alpha$  remanescente. Os irmãos analisados neste estudo, um deles do sexo masculino e o outro do sexo feminino, de origem étnica mista (pai chinês e mãe afro-descendente), apresentavam a deleção  $-\alpha^{3.7}$ , que envolve a região 3' do gene  $\alpha_2$  e 5' do gene  $\alpha_1$ , resultando em um único gene  $\alpha$  híbrido ( $\alpha_2-\alpha_1$ ), e a deleção  $--^{SEA}$ , que remove ambos os genes  $\alpha$  do mesmo cromossomo (Higgs, 1993). Os níveis de Hb H, ao diagnóstico, eram de 18,7 e 5,0%, respectivamente (Tabela 1) (Wenning et al., 2009). Utilizando as técnicas de *Differential Display Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (DDRT-PCR) (Liang e Pardee, 1992) e de *Subtractive Supression Hybridization* (SSH) (Diatchenko et al., 1996), dois dos transcritos diferencialmente expressos foram selecionados, correspondentes aos genes da enzima PIPKII $\alpha$  e da globina  $\beta$ , de forma que a maior expressão de PIPKII $\alpha$  foi observada em reticulócitos do paciente com maior quantidade de Hb H em sangue periférico (maior expressão dos genes  $\beta$ ). Os dados obtidos

nesta pesquisa sugerem que a proporção mais elevada de Hb anômala deve-se, provavelmente, a uma taxa maior de transcrição do gene da globina  $\beta$ , e que, de alguma forma, sua expressão foi influenciada pela enzima PIPKII $\alpha$ . Adicionalmente, Wenning et al. avaliaram as taxas de expressão do gene PIPKII $\alpha$  em reticulócitos de dois outros irmãos com Doença de Hb H através da técnica de PCR em tempo real, um com 5% e o outro com 12,4% de Hb H, e de três pacientes com Talassemia  $\beta$  intermediária (dados não publicados). Novamente, o gene da PIPKII $\alpha$  apresentou-se mais expresso nos pacientes com Doença da Hb H, sendo a taxa de expressão do paciente com o maior nível de Hb H a mais elevada. Já nos pacientes com talassemia  $\beta$ , a expressão desse gene encontrou-se diminuída, reforçando a hipótese de relação entre os genes PIPKII $\alpha$  e da globina  $\beta$ .

Análises realizadas dos perfis de expressão dos genes das PIPKs e das globinas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) durante a diferenciação eritróide humana em cultura de células CD34+, demonstraram que a expressão do gene PIPKII $\alpha$ , bem como os demais genes das subfamílias das PIPKs, aumentou à medida que as células se tornaram mais diferenciadas, coincidindo com os perfis de expressão dos genes de globinas (Zaccariotto, 2009).

Tabela 1 Dados dos pacientes com Doença da Hb H estudados por Wenning et al. (2009).

	<b>Paciente do sexo masculino</b>	<b>Paciente do sexo feminino</b>
GV (106/ $\mu$ l)	4,45	4,55
Hb (g/dl)	9,4	7,6
Ht (%)	35,5	26,5
VCM (fl)	79,8	58,2
HCM (pg)	21,1	16,7
RDW – CV (%)	20,2	28,1

RET (%)	3,9	1,87
Perfil Hb	HbA2 +HbA+Hb H	HbA2 +HbA+Hb H (+Hb Bart's)
HbA2 (%)	1,23	1,27
HbF (%)	1,53	1,74
Hb H (%)	18,7	5,0
<b>Genótipo</b>	$-\alpha 3,7/-$ -SEA	$-\alpha 3,7/-$ -SEA

A expressão do gene  $PIP2I\alpha$ , localizado no cromossomo 10p12, ainda não havia sido previamente detectada em reticulócitos e, também, durante a diferenciação eritróide de células CD34+. No entanto, o papel das PIPKs nas hemoglobinopatias e anemias hemolíticas ainda não está definido (Wenning, 2007; Wenning et al., 2009).

Há poucos estudos na literatura que buscaram elucidar o papel das PIPKs nas células hematopoiéticas e, também, a sua relação com a expressão dos genes de globinas. A principal proposta do presente estudo foi, através da técnica de RNA de interferência (RNAi), silenciar o gene da enzima  $PIP2I\alpha$  em células de linhagem eritroleucêmica humana (K562), analisando posteriormente o fenótipo celular resultante, com ênfase no grau de expressão dos genes das globinas  $\alpha$  e  $\gamma$ .

## **2. OBJETIVOS**

O presente trabalho teve como objetivos principais induzir o silenciamento estável do gene da PIPKII $\alpha$  em células K562 e avaliar os efeitos na proliferação, ciclo celular, apoptose, e na expressão dos genes das globinas  $\alpha$  e  $\gamma$ . Adicionalmente, caracterizar a expressão gênica e protéica da PIPKII $\alpha$  em células de linhagens de leucemias mieloides agudas humanas (K562, KG1, NB4, HL60 e P39), determinar a localização celular da PIPKII $\alpha$  em células hematopoiéticas (K562, NB4 e HL60) e avaliar a expressão gênica durante as diferenciações eritroide e megacariocítica das células K562, e durante a diferenciação granulocítica das células NB4.

### **3. CAPÍTULO 1**

**PIP3KII $\alpha$  is widely expressed in hematopoietic-derived cells and plays a role in the expression of alpha and gamma globins in K562 cells**

Vânia P.A. Wobeto<sup>1</sup>, João Agostinho Machado-Neto<sup>2</sup>, Tânia Regina Zaccariotto<sup>1</sup>, Daniela Maria Ribeiro<sup>1</sup>, Adriana S. S. Duarte<sup>2</sup>, Sara Teresinha Olalla Saad<sup>2</sup>, Fernando Ferreira Costa<sup>2</sup>, Maria de Fátima Sonati<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Pathology, School of Medical Sciences, University of Campinas - UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil.

<sup>2</sup>Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas - UNICAMP, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue, Campinas, São Paulo, Brazil.

**Corresponding Author:**

Maria de Fátima Sonati MD, PhD

Department of Clinical Pathology, School of Medical Sciences, University of Campinas

P.O. Box 6111 ZIP Code 13083-970

Campinas, SP, Brazil

Phone: 55-19-35219451; Fax: 55-19-3521-9434

E-mail: [sonati@fcm.unicamp.br](mailto:sonati@fcm.unicamp.br)

## **Abstract**

Characterized for the first time in erythrocytes, phosphatidylinositol phosphate kinases (PIP kinases) belong to a family of enzymes that generate various lipid messengers and participate in several cellular processes, including gene expression. Recently, the PIPKII $\alpha$  gene was found to be expressed differentially in reticulocytes from two siblings with hemoglobin (Hb) H disease, suggesting a possible relationship between PIPKII $\alpha$  and the production of globins. Here, we investigated PIPKII $\alpha$  gene and protein expression, protein localization in hematopoietic-derived cells during their differentiation and the effects of PIPKII $\alpha$  silencing on K562 cells. PIPKII $\alpha$  silencing resulted in an increase in  $\alpha$  and  $\gamma$  globins and a decrease in the proliferation of K562 cells without affecting cell cycle progression and apoptosis. In conclusion, using a cell line model, we demonstrated that PIPKII $\alpha$  is widely expressed in hematopoietic-derived cells, is localized in their cytoplasm and nucleus and is upregulated during erythroid differentiation. We also showed that PIPKII $\alpha$  silencing can induce  $\alpha$  and  $\gamma$  globin expression and decrease cell proliferation in K562 cells.

**Keywords:** PIPKII alpha, globins, K562 cell, hematopoiesis, proliferation

## Introduction

Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI4,5P<sub>2</sub>) is a second messenger that regulates several cell processes, including cytoskeleton dynamics, vesicle trafficking, focal adhesion, migration, proliferation, survival and gene transcription[1]. PI4,5P<sub>2</sub> also plays an essential role in signaling responses of many hematopoietic cells to stimuli such as platelet activation, cell proliferation and chemotaxis[2]. The major regulators of PI4,5P<sub>2</sub>-mediated events are PIP kinases, which in turn are involved in PI4,5P<sub>2</sub> synthesis[1]. PIP kinases are divided into three subfamilies: PIPKI, PIPKII and PIPKIII, according to substrate specificity and signaling functions[3]. PIPKI and PIPKII produce PI4,5P<sub>2</sub> by catalyzing the phosphorylation of phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P) and phosphatidylinositol-5-phosphate (PI5P), respectively. In mammalian cells, three isoforms of PIPKI and PIPKII subfamilies encoded by distinct genes are found ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ )[3]. PIPKI isoforms participate in several cellular processes, including adhesion and vesicular trafficking, and are found in the plasma membrane, focal adhesions, Golgi apparatus and nucleus. PIPKII isoforms have been found in the cytosol, nucleus and endoplasmatic reticulum, but in contrast to PIPKI isoforms, little is known about their physiological functions[3-5].

PIP kinases were characterized in human erythrocyte membranes, allowing several biochemical properties of this enzyme family to be elucidated[6]. Ling et al. (1989) identified a protein with 53 KDa that had PIP kinase activity. Their findings indicated that this 53 kDa protein could be the major PIP kinase in human erythrocyte membranes[6]. Hinchliffe et al. (1996) showed that the cytoskeletal fractions of detergent-lysed platelets contain a pool of PtdInsP<sub>2</sub> that increases in response to integrin-mediated signaling, with a consequent marked increase in PIP kinase activity in cytoskeletal-linked events associated with platelet aggregation[7].

In a recent study by Wenning et al (2009), the *PIP2II $\alpha$*  gene (also known as *PIP4K2A*, *PI5P4KA*; *PIP5K2A*; *FLJ13267*; *PIP5K1IA* and *PIP5K1I $\alpha$* ) was differentially expressed in reticulocytes from two siblings with hemoglobin (Hb) H disease who had the same genotype (-a<sup>3.7</sup>/--<sup>SEA</sup>). Expression of both the *PIP2II $\alpha$*  and  *$\beta$ -globin* genes was higher in the patient with the higher Hb H level, suggesting a possible relationship between *PIP2II $\alpha$*  and the production of globins[8], corroborating findings that PIPKII isoforms have nuclear functions, such as regulation of gene expression, pre-mRNA processing and mRNA export. Thus, *PIP2II $\alpha$*  signaling could be involved in the regulation of globin gene expression[3, 9-11].

Although PIP kinases were characterized in erythrocytes[5, 12-14], studies have shown the presence and activity of *PIP2II $\alpha$*  in platelets[15, 16], and recent findings suggest that *PIP2II $\alpha$*  may be involved in the regulation of globin expression[8]. To date little effort has been directed towards understanding the role of *PIP2II $\alpha$*  in hematopoiesis. The aim of this study was therefore to characterize *PIP2II $\alpha$*  expression and localization in hematopoietic-derived cells during erythroid, megakaryocytic and granulocytic differentiation in cell line models and to use RNA interference to investigate the effects of *PIP2II $\alpha$*  silencing on  $\alpha$  and  $\gamma$  globin expression, cell proliferation, cell cycle and apoptosis in K562 cells.

## **Materials and methods**

### **Cell culture and reagent chemicals**

A panel of human myeloid hematopoietic cell lines which included the K562, KG1, NB4 and HL60 cell lines was used. All cell lines were obtained from ATCC (Philadelphia, PA, USA). Cells were cultured in RPMI containing 10% fetal bovine serum, penicillin/streptomycin and amphotericin B and were maintained at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. The P39 cell line was kindly provided by Prof. Eva Hellström-Lindberg (Department of Medicine, Division of Hematology, Karolinska University Hospital–Huddinge, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden). Imatinib mesylate was kindly provided by Novartis (Novartis Pharmaceuticals, Basel, Switzerland). Puromycin was obtained by Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), hemin (HE) and hydroxyurea (HU) were supplied by Sigma (St. Louis, MO, USA). All-trans retinoic acid (ATRA) was supplied by Roche (Basel, Switzerland).

### **Quantitative PCR (qPCR) analysis**

Total RNA was extracted from cells using the commercial kits RNeasy Mini and RNeasy Micro (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. RNA integrity was assessed by electrophoresis on a 1 % agarose gel. One microgram of RNA was subjected to DNase I treatment (Invitrogen, Life Technologies, USA) and used to synthesize cDNA with SuperScript III<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase (Invitrogen, Life Technologies, USA) according to the manufacturer's instructions. The NanoDrop ND1000 spectrophotometer was used to quantify RNA from the samples (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA). *PIP2II $\alpha$* ,  *$\alpha$ -globin* and  *$\gamma$ -globin*

expression was determined with the SYBR Green system (Invitrogen, Life Technologies, USA) and the StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) according to the manufacturer's instructions, using specific forward (Fw) and reverse (Rv) primers. Primer sequences and concentrations are described in Table 1. *GAPDH* and  *$\beta$ -actin* were used as endogenous controls. Relative quantification was determined according to the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  equation [17]. A negative control (no template) was included for each primer pair. The dissociation protocol was performed at the end of each run to check for non-specific amplifications. Two replicates were run on the same plate for each sample.

### **Western Blot**

Equal amounts of total cell extract proteins were separated by SDS-PAGE, and Western blot analysis with the indicated antibodies was carried out using the ECL™ Western Blotting Analysis System (Amersham Pharmacia Biotech Ltd., Buckinghamshire, UK) as previously described [18]. The polyclonal antibodies against PIPKII $\alpha$  (sc-100406),  $\alpha$ -globin (sc-31109),  $\gamma$ -globin (sc-21756) and actin (sc-1616) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Blots were stripped and reprobed as necessary.

### **Confocal immunofluorescence microscopy**

Confocal imaging was carried out using primary antibodies against PIPKII $\alpha$  (diluted 1:100). Briefly,  $2 \times 10^5$  cells were plated on coverslips previously treated with poly-L-lysine. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde-PBS for 20 min and then permeabilized with 0.5% Triton-X-100 in PBS for 10 min. The cells were blocked with 3% skimmed milk-PBS

and then incubated with the indicated primary (overnight, 4 °C) and secondary (1 h, room temperature) antibodies. Finally, coverslips were mounted on slides using the ProLong Gold® antifade reagent and the cells were analyzed by confocal laser scanning in a Zeiss LSM 780-NLO (Carl Zeiss AG, Germany). Cells incubated with the secondary antibody only were used as a negative control.

### **Cell differentiation and surface marker analysis**

K562 cells were induced to undergo megakaryocytic and erythroid differentiation. For the former, the cells were treated with 20nM of PMA for 4 days[19] and differentiation was assessed based on morphology and CD61 expression. For the latter, they were treated with 50µM of hemin (HE) and 100 µM hydroxyurea (HU) for 4 days and evaluated by benzidine staining as previously described [20]. NB4 cells were induced to undergo granulocytic differentiation with  $10^{-6}$  M ATRA for 4 days and evaluated by morphologic analysis and CD11b expression [21].

### **Generation of PIPKII $\alpha$ -knockdown cells**

To generate PIPKII $\alpha$ -knockdown K562 cells, small hairpin-type RNAi oligonucleotide specific for PIPKII $\alpha$  (sc-39139-SH, shPIPKII $\alpha$ ) or control (sc-108060, shControl) were used (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). The vectors were transfected into K562 cells by electroporation using a BTX electroporator (BTX, San Diego, CA). shPIPKII $\alpha$  or shControl cells were selected by treatment with 2 µg/mL of puromycin for 28 days before the experiments. Cells that were only electroporated (Control) were also used in the experiments.

### **Methylthiazolotetrazolium (MTT) assay**

Cell proliferation was determined by MTT assay. Briefly, after 12h of serum starvation,  $5 \times 10^4$  Control or shPIP2II $\alpha$  cells per well were plated in a 96-well plate in RPMI supplemented with 10% FBS in the presence or absence of two different concentrations of imatinib mesylate (0.5 or 1  $\mu$ M) for 48h. After incubation, 10  $\mu$ L of a 5 mg/mL solution of MTT was added to the wells and incubated at 37°C for 4 h. The reaction was stopped by using 100  $\mu$ L of 0.1 N HCl in anhydrous isopropanol. Cell growth was evaluated by measuring the absorbance at 570 nM using an automated plate reader. All conditions were tested in six replicates.

### **Cell cycle analysis**

Cells were fixed in 70% ethanol for at least 2h at 4°C and stained with 20 $\mu$ g/mL propidium iodide (PI) containing 10 $\mu$ g/mL Rnase A for 30 min at room temperature. Fluorescence analysis was carried out with a FACSCalibur (Becton-Dickinson, CA, USA). The resulting DNA distributions were analyzed by Modifit (Verify Software House Inc. Topsham, ME, USA) for the proportions of cells in each phase of the cell cycle.

### **Apoptosis assay**

Apoptosis was assessed using the Annexin-V binding assay. Control or shPIP2II $\alpha$  cells were seeded on 12-well plates and either treated or not with different concentrations of imatinib mesylate (0.5 or 1  $\mu$ M) for 48h. They were then washed twice with ice cold PBS and resuspended in binding buffer containing 1  $\mu$ g/mL PI and 1 $\mu$ g/mL Annexin-V-FITC. After 15 minutes of incubation at room temperature in a light-protected area, all samples

were analyzed on a FACSCalibur flow cytometer. Ten thousand events were acquired for each sample.

### **Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using GraphPad InStat 3 (GraphPad Software, Inc., San. Diego, CA, USA) and SAS software for Windows (SAS version 9.1.3., SAS Institute, Inc., Cary, NC). Data were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD). For comparisons, an appropriate Student's *t*-test or Mann-Whitney test was used. The level of significance was set at  $P \leq 0.05$ .

## **Results**

### **PIP2II $\alpha$ is widely expressed in hematopoietic-derived cells**

Quantitative PCR and Western blot were used to examine PIP2II $\alpha$  expression in hematopoietic-derived cells (K562, KG1, NB4, HL60 and P39). qPCR analysis showed that PIP2II $\alpha$  was expressed in all the hematopoietic-derived cell lines analyzed and that there is a slight increase in the gene expression of PIP2II $\alpha$  in K562 compared with the other cell lines (Figure 1A). Western blot analysis showed that the protein expression levels of PIP2II $\alpha$  in K562, KG1 and NB4 cells were close (Figure 1B). Additionally, we determined the cellular localization of PIP2II $\alpha$  in hematopoietic cells. Confocal analysis revealed that PIP2II $\alpha$  is localized in the cytoplasm and nucleus of hematopoietic-derived cells (K562, HL60 and NB4; Figure 1C).

### **PIP2II $\alpha$ is upregulated during erythroid differentiation, but not during megakaryocytic and granulocytic differentiation**

To address the expression of PIP2II $\alpha$  in hematopoietic cells during differentiation, we used cell line models for erythroid, megakaryocytic and granulocytic differentiation. For this, erythroid differentiation was induced in K562 cells by combining HE and HU treatments, which resulted in more than 70% benzidine-positive cells (Figure 2A). After PMA treatment, K562 cells exhibited megakaryocytic morphology (Figure 2B) and more than 70% CD61-positive cells (data not shown). Similarly, after ATRA treatment NB4 cells exhibited a granulocytic morphology (Figure 2C) and more than 90% were CD11b-positive (data not shown). Interestingly, qPCR analysis revealed a significant increase in PIP2II $\alpha$  in differentiated erythrocytes compared with undifferentiated control cells ( $P=0.01$ ) (Figure

2D), and no differences were observed in differentiated megakaryocytes (Figure 2E) or granulocytes (Figure 2F) compared with the respective undifferentiated controls. These findings suggest that PIPKII $\alpha$  is involved specifically in erythroid differentiation.

### **Efficient silencing of PIPKII $\alpha$ expression in K562 cells after shRNA transfection**

K562 cells were used to examine the effects of PIPKII $\alpha$  silencing in hematopoietic cells. After selection with puromycin, mRNA and protein levels of PIPKII $\alpha$  were determined by qPCR and Western Blot. A significant reduction in PIPKII $\alpha$  mRNA levels (79 $\pm$ 8%) was observed in shPIPKII $\alpha$  compared with shControl or Control cells (Figure 3A). Western blot analysis corroborated these findings (Figure 3B).

### **PIPKII $\alpha$ silencing induces $\alpha$ -globin and $\gamma$ -globin expression**

Since PIPKII $\alpha$  expression was differentially expressed in reticulocytes from two siblings with Hb H disease and is possibly correlated with production of globins[8], and as our data showed an increase in PIPKII $\alpha$  during erythroid differentiation, we investigated the effects of PIPKII $\alpha$  knockdown on  $\alpha$ -globin and  $\gamma$ -globin expression. Interestingly, qPCR analysis showed a significant increase in  $\alpha$ -globin expression in shPIPKII $\alpha$  cells compared with shControl or Control cells ( $P$ <0.05) (Figure 4A). A significant but borderline increase in  $\gamma$ -globin was observed in shPIPKII $\alpha$  compared with the shControl cells ( $P$ =0.05); however, compared with the Control cells this increase was statistically significant ( $P$ <0.05) (Figure 4B). These findings were corroborated by Western blot analysis (Figure 4C).

### **Knockdown of PIPKII $\alpha$ results in a slight decrease in proliferation without affecting cell cycle and apoptosis**

Finally, we checked the role of PIPKII $\alpha$  in cell proliferation, cell cycle and apoptosis in K562 cells. After 48 h of culture, proliferation was reduced in shPIPKII $\alpha$  cells compared with Control cells (inhibition rate =  $10\pm 1.5\%$ ;  $P=0.02$ ) (Figure 5). Imatinib treatment was used as a control and, as expected, reduced cell proliferation. In contrast, no changes were observed in the proportion of cells in each cell cycle phase between the shPIPKII $\alpha$  and Control cells (Table 2). Additionally, as expected, imatinib treatment induced apoptosis in K562 cells, as observed by an increase in Annexin-V positive cells, but again no difference was observed between the shPIPKII $\alpha$  and Control cells (Figure 6). These data suggest that shPIPKII $\alpha$  plays a specific role in mechanisms involved in the proliferation of K562 cells.

## Discussion

The development of mature blood cells of distinct lineages from hematopoietic stem cells involves a restricted differentiation potential and the establishment of lineage-specific gene expression profiles and is the result of coordinated control of developmental decisions, survival and proliferation by transcription factors that modulate the expression of their target genes [22, 23]. However, to date the precise mechanisms of this regulation have not been well-defined.

Here, we characterized PIPKII $\alpha$  expression in hematopoietic cells during their differentiation and analyzed the effects of PIPKII $\alpha$  silencing on K562 cells. Our results show that PIPKII $\alpha$  is widely expressed in hematopoietic-derived cells, is localized in the cytoplasm and nucleus and is upregulated during erythroid differentiation of K562 cells. PIPKII $\alpha$  silencing resulted in an increase in the expression of  $\alpha$  and  $\gamma$  globins and a slight decrease in cell proliferation in K562 cells without any effect on the modulation of cell cycle progression and apoptosis. Studies of PIPKII $\alpha$  have rarely addressed hematopoiesis, and a previous study correlated the higher mRNA levels of PIPKII $\alpha$  with an increase in  $\beta$ -globin expression in a patient with high levels of Hb H [8]. It has been demonstrated that PIPKIIs are present in the nucleus of normal adherent and solid tumor cell lines [4, 10, 24]. In agreement with these findings, our confocal analysis showed the presence of PIPKII $\alpha$  in the nucleus of hematopoietic cells. Nuclear localization has been correlated with pre-mRNA processing [10]; thus, PIPKs may regulate gene expression. In our study, an increase in  $\alpha$  and  $\gamma$  globins was observed in PIPKII $\alpha$ -silenced cells. Interestingly, PIPKII $\alpha$  expression was significantly increased only in erythroid differentiation and not in megakaryocytic or granulocytic differentiation in cell line models. These data support the

hypothesis that PIPKII $\alpha$  signaling is involved in the regulation of globin expression and in human erythropoiesis.

The role of PIP kinases in cell proliferation has been reported. Luoh et al. (2004) showed that overexpression of PIPKII $\beta$  in breast cancer cells leads to morphological changes and enhances cell proliferation[25]. Our findings suggest that PIPKII $\alpha$  may also be involved in cell proliferation as PIPKII $\alpha$  knockdown resulted in a decrease in cell proliferation, although no differences were observed in cell cycle progression and apoptosis between PIPKII $\alpha$  knockdown and control cells. However, knockout mice for PIPKII $\alpha$  do not have obvious phenotype aberrations[26], indicating that PIPKII isoforms may have redundant functions. The association between PIPKII $\alpha$  and  $\beta$  *in vitro* and *in vivo* has been described in HEK293 cells, and this interaction is predominant in the nucleus; the same study showed that PIPKII $\alpha$  has much greater activity than PIPKII $\beta$ , and PIPKII $\beta$  is responsible for modulating the cellular localization of PIPKII $\alpha$  [24]. Another study found an association between PIPKII $\alpha$  and  $\beta$  in DT40 cells[27]. Taken together, these findings indicate the occurrence of heterodimers between PIPKII isoforms that regulate the activity, localization, and possibly different signaling targets.

In summary, our study has shown that PIPKII $\alpha$  is expressed and localized in the cytoplasm and nucleus in hematopoietic cells and is upregulated during erythroid differentiation. PIPKII $\alpha$  silencing modulates expression of globins and cell proliferation. Further studies are necessary to elucidate the involvement of PIPKs in normal and defective hematopoietic processes and the signaling pathway used.

## References

- [1] Doughman RL, Firestone AJ and Anderson RA. Phosphatidylinositol phosphate kinases put PI4,5P(2) in its place. *J Membr Biol* 2003;194:77-89.
- [2] Michell RH, Conroy LA, Finney M, French PJ, Bunce CM, Anderson K, Baxter MA, Brown G, Gordon J, Jenkinson EJ and et al. Inositol lipids and phosphates in the proliferation and differentiation of lymphocytes and myeloid cells. *Ciba Found Symp* 1992;164:2-11; discussion 12-6.
- [3] Anderson RA, Boronenkov IV, Doughman SD, Kunz J and Loijens JC. Phosphatidylinositol phosphate kinases, a multifaceted family of signaling enzymes. *J Biol Chem* 1999;274:9907-10.
- [4] Bunce MW, Boronenkov IV and Anderson RA. Coordinated activation of the nuclear ubiquitin ligase Cul3-SPOP by the generation of phosphatidylinositol 5-phosphate. *J Biol Chem* 2008;283:8678-86.
- [5] Clarke JH, Wang M and Irvine RF. Localization, regulation and function of type II phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinases. *Adv Enzyme Regul* 2010;50:12-8.
- [6] Ling LE, Schulz JT and Cantley LC. Characterization and purification of membrane-associated phosphatidylinositol-4-phosphate kinase from human red blood cells. *J Biol Chem* 1989;264:5080-8.
- [7] Hinchliffe KA, Irvine RF and Divecha N. Aggregation-dependent, integrin-mediated increases in cytoskeletally associated PtdInsP2 (4,5) levels in human platelets are controlled by translocation of PtdIns 4-P 5-kinase C to the cytoskeleton. *Embo J* 1996;15:6516-24.
- [8] Wenning MR, Mello MP, Andrade TG, Lanaro C, Albuquerque DM, Saad ST, Costa FF and Sonati MF. PIP4KIIA and beta-globin: transcripts differentially expressed in reticulocytes and associated with high levels of Hb H in two siblings with Hb H disease. *Eur J Haematol* 2009;83:490-3.
- [9] Heck JN, Mellman DL, Ling K, Sun Y, Wagoner MP, Schill NJ and Anderson RA. A conspicuous connection: structure defines function for the phosphatidylinositol-phosphate kinase family. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2007;42:15-39.
- [10] Boronenkov IV, Loijens JC, Umeda M and Anderson RA. Phosphoinositide signaling pathways in nuclei are associated with nuclear speckles containing pre-mRNA processing factors. *Mol Biol Cell* 1998;9:3547-60.
- [11] York JD, Odom AR, Murphy R, Ives EB and Wente SR. A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export. *Science* 1999;285:96-100.

- [12] Bazenet CE, Ruano AR, Brockman JL and Anderson RA. The human erythrocyte contains two forms of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase which are differentially active toward membranes. *J Biol Chem* 1990;265:18012-22.
- [13] Jenkins GH, Fiset PL and Anderson RA. Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase isoforms are specifically stimulated by phosphatidic acid. *J Biol Chem* 1994;269:11547-54.
- [14] Boronenkov IV and Anderson RA. The sequence of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase defines a novel family of lipid kinases. *J Biol Chem* 1995;270:2881-4.
- [15] Martin TF. PI(4,5)P(2) regulation of surface membrane traffic. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:493-9.
- [16] Matsui T, Yonemura S and Tsukita S. Activation of ERM proteins in vivo by Rho involves phosphatidyl-inositol 4-phosphate 5-kinase and not ROCK kinases. *Curr Biol* 1999;9:1259-62.
- [17] Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-8.
- [18] Machado-Neto JA, Favaro P, Lazarini M, Costa FF, Olalla Saad ST and Traina F. Knockdown of insulin receptor substrate 1 reduces proliferation and downregulates Akt/mTOR and MAPK pathways in K562 cells. *Biochim Biophys Acta* 2011.
- [19] Chang CW, Chou HY, Lin YS, Huang KH, Chang CJ, Hsu TC and Lee SC. Phosphorylation at Ser473 regulates heterochromatin protein 1 binding and corepressor function of TIF1beta/KAP1. *BMC Mol Biol* 2008;9:61.
- [20] Di Pietro R, di Giacomo V, Caravatta L, Sancilio S, Rana RA and Cataldi A. Cyclic nucleotide response element binding (CREB) protein activation is involved in K562 erythroleukemia cells differentiation. *J Cell Biochem* 2007;100:1070-9.
- [21] Pass MB, Borregaard N and Cowland JB. Derangement of transcription factor profiles during in vitro differentiation of HL60 and NB4 cells. *Leuk Res* 2007;31:827-37.
- [22] Ferreira R, Ohneda K, Yamamoto M and Philipsen S. GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Mol Cell Biol* 2005;25:1215-27.
- [23] Stachura DL, Chou ST and Weiss MJ. Early block to erythromegakaryocytic development conferred by loss of transcription factor GATA-1. *Blood* 2006;107:87-97.

- [24] Bultsma Y, Keune WJ and Divecha N. PIP4Kbeta interacts with and modulates nuclear localization of the high-activity PtdIns5P-4-kinase isoform PIP4Kalpha. *Biochem J* 2010;430:223-35.
- [25] Luoh SW, Venkatesan N and Tripathi R. Overexpression of the amplified Pip4k2beta gene from 17q11-12 in breast cancer cells confers proliferation advantage. *Oncogene* 2004;23:1354-63.
- [26] Clarke JH, Richardson JP, Hinchliffe KA and Irvine RF. Type II PtdInsP kinases: location, regulation and function. *Biochem Soc Symp* 2007;149-59.
- [27] Wang M, Bond NJ, Letcher AJ, Richardson JP, Lilley KS, Irvine RF and Clarke JH. Genomic tagging reveals a random association of endogenous PtdIns5P 4-kinases Ialpha and Ibeta and a partial nuclear localization of the Ialpha isoform. *Biochem J* 2010;430:215-21.

**Acknowledgments**

The authors would like to thank Tereza Salles for her valuable technical assistance and the National Institute of Science and Technology for Photonics Applied to Cell Biology (INFABIC) for providing access to equipment and assistance. This work received financial support from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

**Conflict of interest statement**

The authors have no conflict of interest to report.

**Table 1. Primer sequences and concentration**

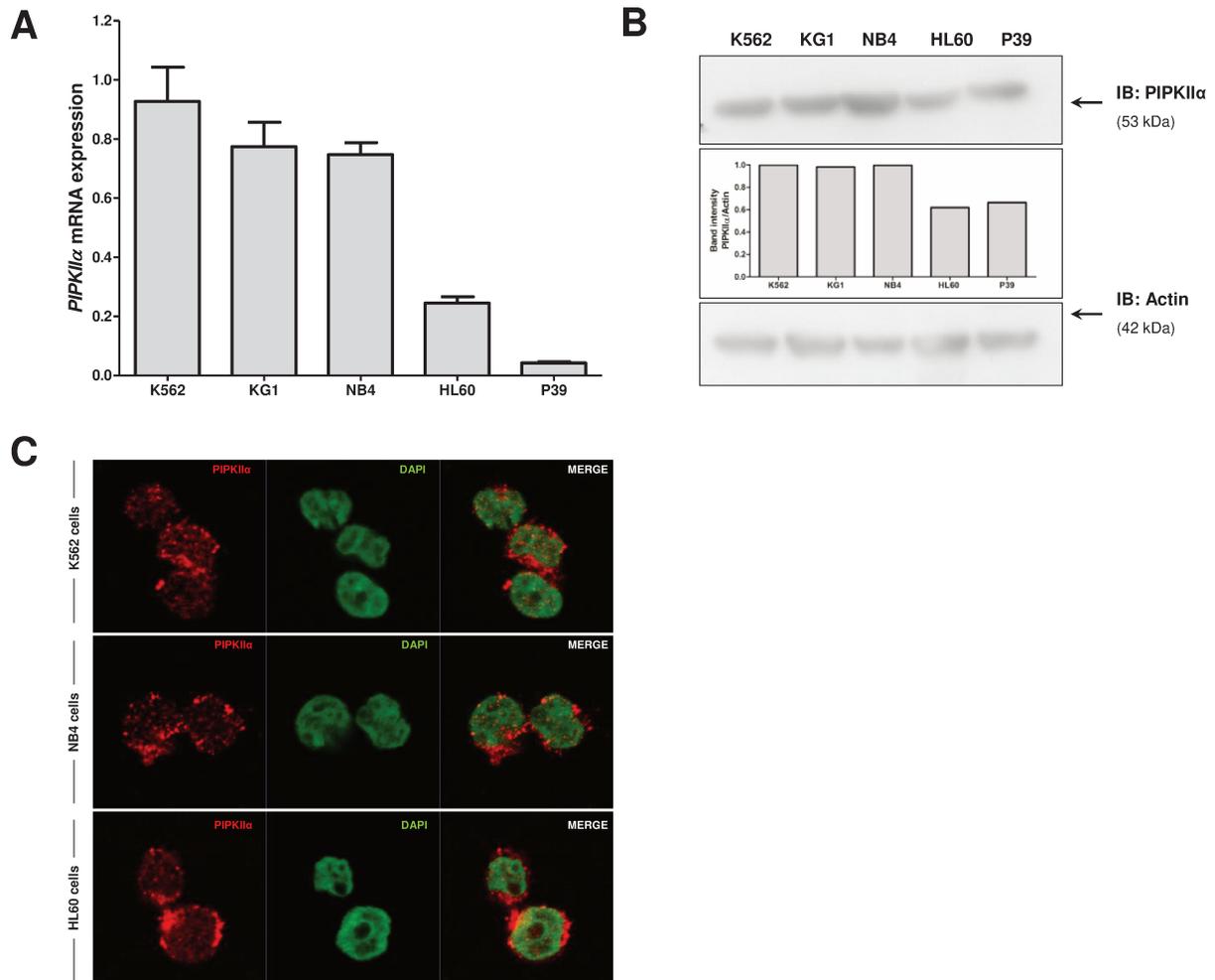
Gene	Sequence	Concentration
<i>PIP2I<math>\alpha</math></i>	FW: 5'-CCACCGTTTGTCTGTGTATAGGA-3' RV: 5'-TTCAGAGTTGGCAGTTCTTTGG-3'	300 nM
<i><math>\alpha</math>-globin</i>	FW: 5' -GGCGAGTATGGTGC GGAG-3' RV: 5'- TGC GGG AAGTAGGTCTTGGT-3'	150 nM
<i><math>\gamma</math>-globin</i>	FW: 5'-TGTGGAAGATGCTGGAGGAGA-3' RV: 5'- CAAAGAACCTCTGGGTCCATG-3'	150 nM
<i>GAPDH</i>	FW: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3' RV: 5'- CCACTTGATTTTGGAGGGATCT-3 '	300 nM
<i><math>\beta</math>-actin</i>	FW: 5'-AGGCCAACCGCGAGAAG-3' RV: 5'- ACAGCCTGGATAGCAACGTACA	300 nM

**Table 2. Effect of PIP2I $\alpha$  silencing on the cell cycle phases of K562 cells**

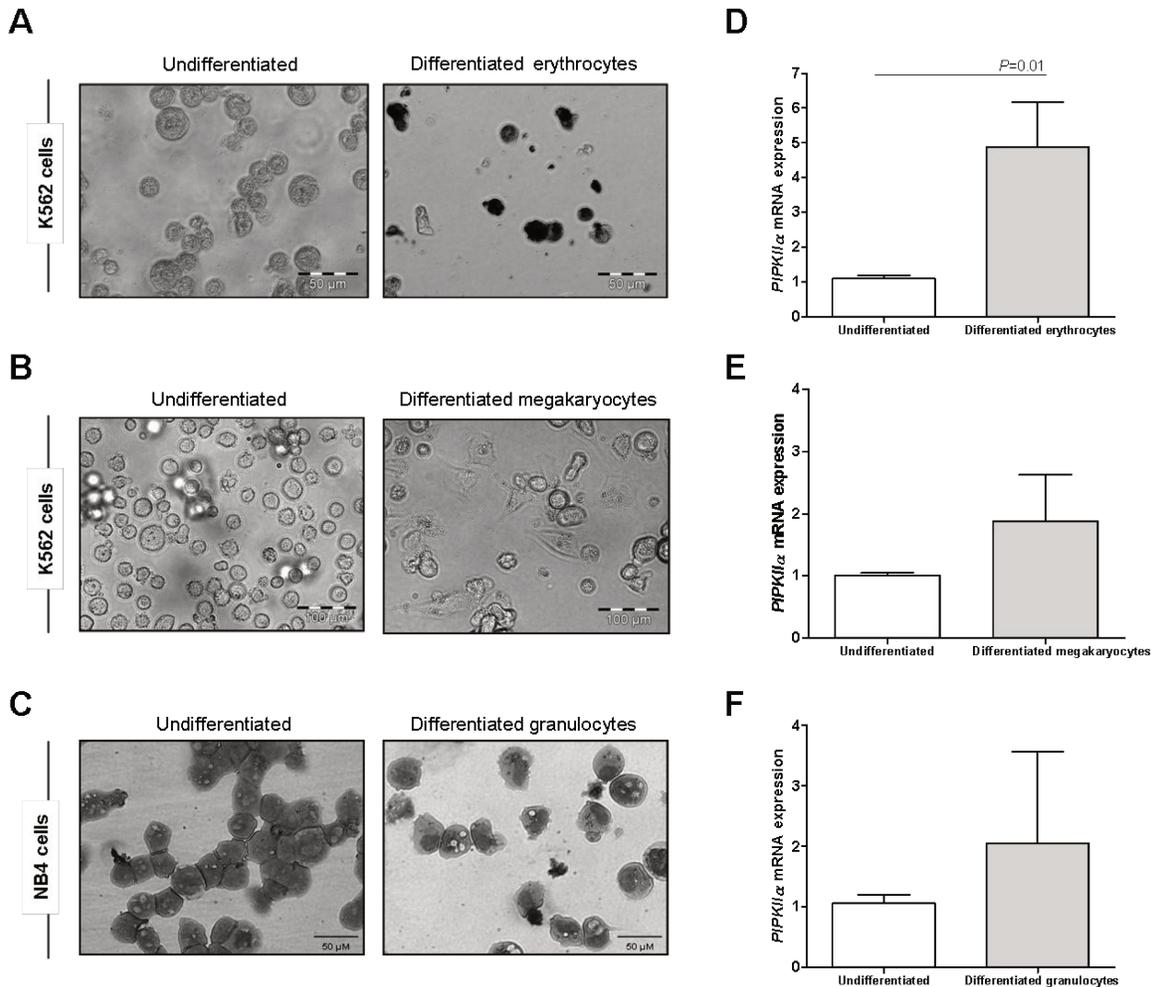
K562 cell	Cell cycle phase (%)		
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
<b>Control</b>	48±2	46±2	6±1
<b>shPIP2I<math>\alpha</math></b>	43±7	48±4	9±4

Cell cycle phases detected by flow cytometry. Results are expressed as the percentage of total cells. Three independent experiments were performed and the mean  $\pm$  SD are shown.  $P=0.474$

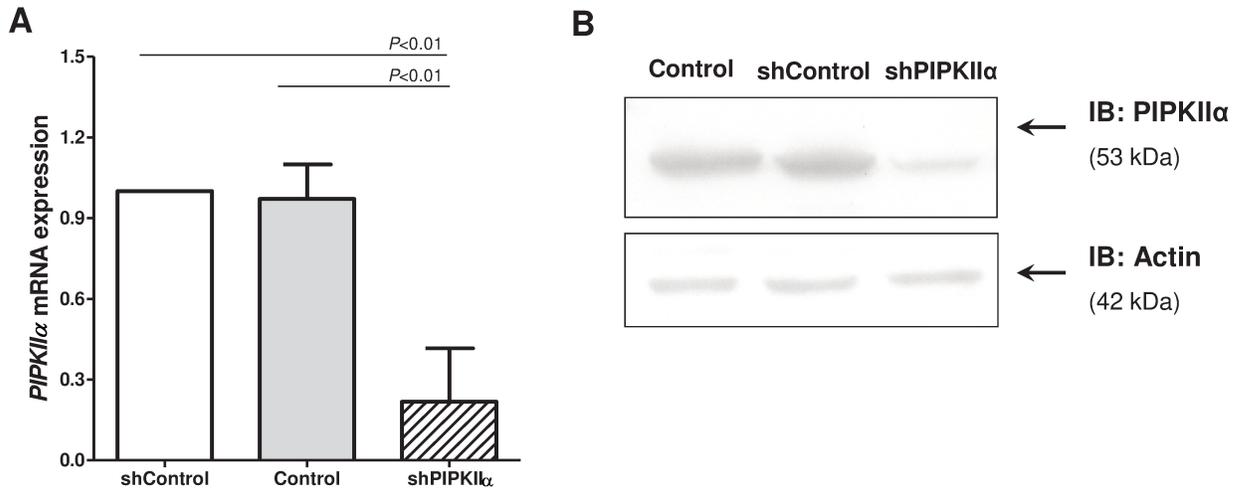
## Figures



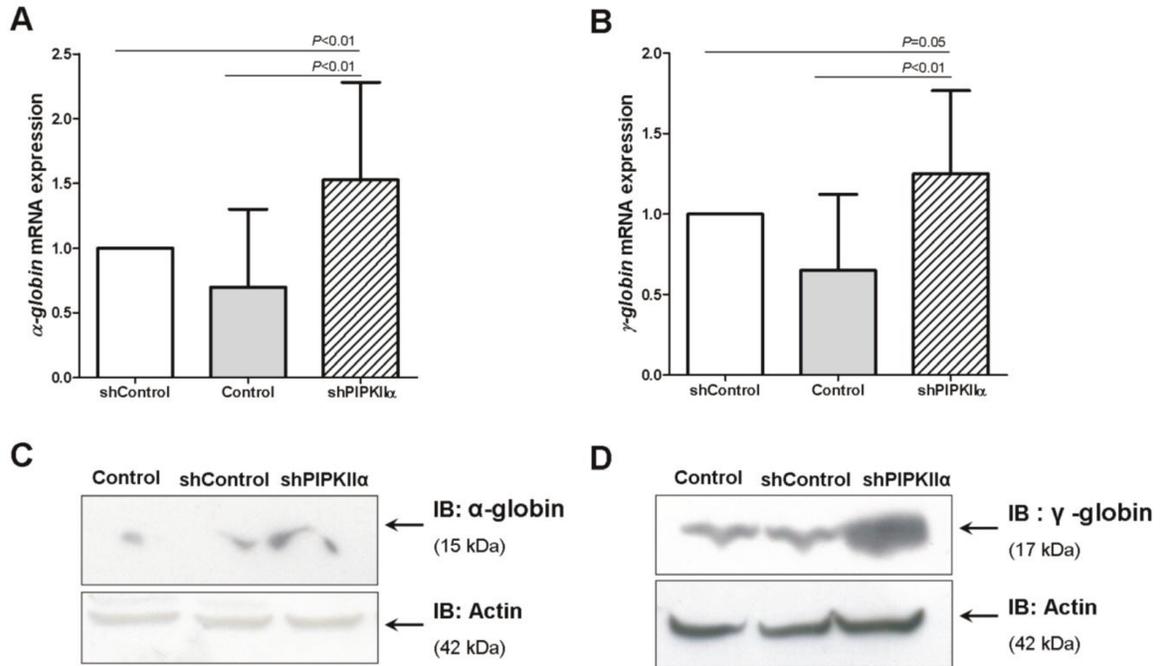
**Figure 1. PIPKII $\alpha$  is widely expressed in hematopoietic-derived cells.** (A) Quantitative expression of PIPKII $\alpha$  in hematopoietic-derived cell lines. mRNA expression levels of PIPKII $\alpha$  were normalized with an endogenous control (*GAPDH*). Results were analyzed using  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Calibrator sample: K562 cells. Experiments were performed in triplicate. (B) Western blot analysis of extracts of hematopoietic cell lines. The membrane was blotted with antibodies against PIPKII $\alpha$  (53 kDa) or actin (42 kDa), which was used as a loading control, and developed with the ECL Western Blotting Analysis System. The hematopoietic-derived cell lines are indicated in the figure. (C) Confocal micrographs of K562, NB4 and HL60 cell lines displaying PIPKII $\alpha$  (red) and DAPI (green) staining; MERGE shows the overlapped images.



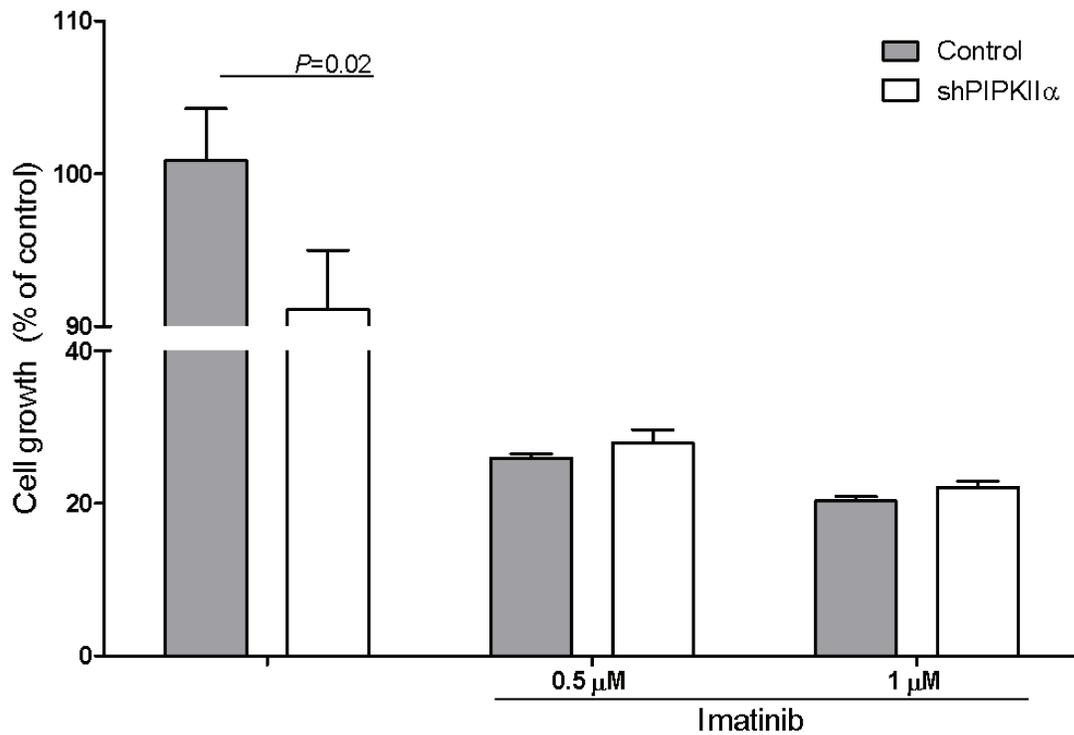
**Figure 2.** (A) Phase contrast images of K562 cells stained with benzidine (dark cells) that did and did not undergo erythroid differentiation after 4 days of HE+HU treatment. (B) Phase contrast images of K562 cells that did and did not undergo megakaryocytic differentiation after 4 days of PMA treatment. (C) Rosenfeld-stained cytospin preparation of NB4 cells that did and did not undergo granulocytic differentiation after 4 days of ATRA treatment. qPCR analysis of *PIPKIIα* mRNA expression in differentiated erythrocytes (D), differentiated megakaryocytes (E) and differentiated granulocytes and their respective undifferentiated cells (F). mRNA expression levels of *PIPKIIα* were normalized with an endogenous control (GAPDH). Results were analyzed using  $2^{-\Delta\Delta CT}$  and are expressed as a fold change relative to the calibrator sample (undifferentiated cells). Bars indicate mean $\pm$ SD of three independent experiments. *P* value are indicates in the figure ; Student's t-test.



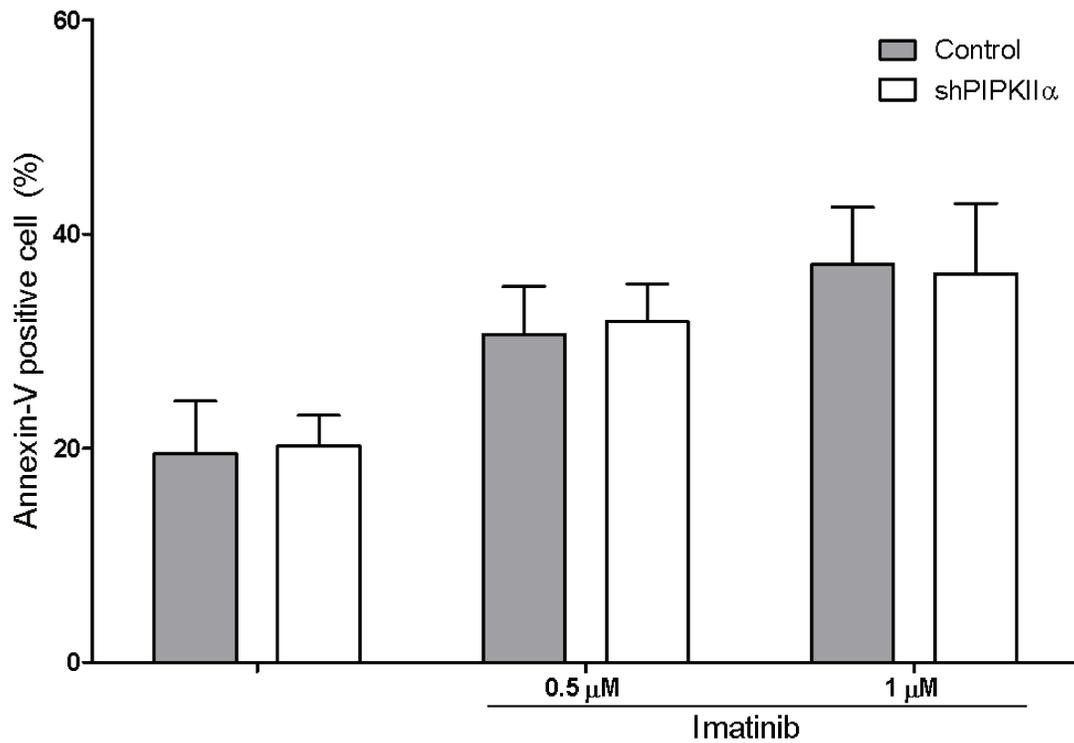
**Figure 3. Transfection of vector containing shRNA targeting PIPKIIα effectively silenced PIPKIIα in K562 cells.** (A) Quantitative expression of *PIPKIIα* mRNA in shPIPKIIα and shControl cells relative to the Control cells. mRNA expression levels of PIPKIIα were normalized with the endogenous controls *GAPDH* and *β-actin*. Results were analyzed using  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Experiments were performed in triplicate. Bars indicate mean $\pm$ SD of five independent experiments; (B) Western blot analysis of Control, shControl and shPIPKIIα cell extracts. The membrane was blotted with antibodies against PIPKIIα (53 kDa) or actin (42 kDa), which was used as a loading control, and developed with the ECL Western Blotting Analysis System. *P* values are indicated in the figure.



**Figure 4. PIPKII $\alpha$  silencing induces  $\alpha$ -globin and  $\gamma$ -globin expression.** Quantitative expression of  $\alpha$ -globin (A) and  $\gamma$ -globin (B) mRNA in Control and shPIPKII $\alpha$  cells relative to shControl cells. mRNA expression levels of  $\alpha$ -globin and  $\gamma$ -globin were normalized with the endogenous controls *GAPDH* and  *$\beta$ -actin*. Results were analyzed using  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Experiments were performed in triplicate. Bars indicate mean $\pm$ SD of five independent experiments. Western blot analysis of Control, shControl and shPIPKII $\alpha$  cell extracts. The membrane was blotted with antibodies against  $\alpha$ -globin (15 kDa) (C),  $\gamma$ -globin (17 kDa) (D) or actin (42 kDa), which was used as a loading control, and developed with the ECL Western Blotting Analysis System. *P* values are indicates in the figure.



**Figure 5. PIP2Iα silencing results in a slight decrease in proliferation.** Cell proliferation was determined by MTT assay after 48 hours of incubation of shPIP2Iα or Control cells with or without imatinib mesylate (0.5 or 1 μM). Untreated Control cells were used as reference. Results are shown as mean±SD of six replicates and are representative of four independent experiments.  $P=0.02$ ; Mann-Whitney test.



**Figure 6. Knockdown of PIP2Iα does not affect apoptosis in K562 cells.** Apoptosis was determined by flow cytometry in the Control and shPIP2Iα cells with or without imatinib mesylate (0.5 or 1 μM) for 48 hours, using the Annexin-V/PI staining method. Figures indicate the percentage of annexin-V positive cells. Bars represent the mean±SD of three independent experiments.

## **4. DISCUSSÃO**

O processo hematopoiético corresponde a um desenvolvimento hierárquico organizado iniciado pelas células-tronco hematopoiéticas. Essas células apresentam a capacidade de se diferenciar, gradualmente e progressivamente, nas diferentes linhagens hematopoiéticas, o que resultará em células sanguíneas diferenciadas. Este processo necessita ser regulado por efeitos do microambiente, pela atuação de fatores de crescimento que promovem a sobrevivência, proliferação e diferenciação das células progenitoras, e por fatores nucleares que regulam a transcrição de todos os genes envolvidos (Ferreira et al., 2005; Stachura et al., 2006). O mecanismo pelo qual os genes dos mamíferos são ativados e regulados durante a diferenciação e desenvolvimento celular ainda não é bem compreendido, mas é evidente a importância da interação de elementos “*cis*” (promotores, estimuladores e silenciadores) com fatores “*trans-acting*” (coativadores, adaptadores, modificadores de cromatina e fatores transcricionais), que conjuntamente provocam mudanças no padrão de expressão gênica e estão associados a modificações nos fatores epigenéticos (metilação, replicação e acetilação das histonas) (Higgs, 2004). A recente descoberta de mutações alterando fatores “*trans acting*”, o entendimento de como os genes da globina  $\alpha$  e  $\beta$  são normalmente regulados durante a hematopoiese, e ainda, análises de mutações hereditárias e adquiridas, podem ajudar a entender a heterogeneidade clínica das hemoglobinopatias, incluindo as talassemias  $\alpha$  (Higgs, 2004). Os mecanismos regulatórios envolvidos na transformação de células-tronco hematopoiéticas em células maduras ainda não são totalmente compreendidos. As PIPKs pertencem a uma família de enzimas lipídico quinases que geram vários mensageiros lipídicos, incluindo um importante segundo mensageiro denominado PI4,5P<sub>2</sub> que regula diversas atividades celulares, como a modulação do citoesqueleto de actina, o transporte de vesículas, a formação de adesão focal e diversos eventos nucleares. Na década de 90 estas enzimas foram isoladas de vários

tecidos e células, incluindo cérebro, medula da adrenal, fígado e eritrócitos. Existem evidências que a fosforilação de proteínas exerce um efeito na maturação dos eritrócitos e na manutenção do seu formato discóide (Backman, 1988). No entanto, o papel das PIPKs nas células hematopoiéticas ainda não foi totalmente elucidado. Nosso estudo foi o primeiro a caracterizar a expressão gênica e protéica da PIPKII $\alpha$  em células de linhagem hematopoiéticas (K562, KG1, NB4, HL60 e P39). A expressão do gene da PIPKII $\alpha$ , aparentemente, difere entre as linhagens, sendo maior nas células K562. Já em relação ao nível protéico, as linhagens K562, KG1 e NB4 apresentaram resultados muito próximos. Além disso, pudemos demonstrar através da microscopia confocal que a PIPKII $\alpha$  está localizada no núcleo e no citoplasma de células das linhagens K562, HL60 e NB4. A localização nuclear desta proteína está, provavelmente, relacionada com o processamento do pré-RNA mensageiro, desempenhando, também, um papel na expressão gênica. Os dados obtidos no nosso estudo de localização celular corroboram com o recente estudo de Wang et al. que analisou a distribuição da PIPKII $\alpha$  em linhagens de linfócitos B (DT40) (Wang et al., 2010). Adicionalmente, Bultsma et al. demonstraram que a interação entre as PIPKII $\alpha$  e PIPKII $\beta$ , *in vitro* e *in vivo*, ocorre, predominantemente, no núcleo de células HEK293 (Bultsma et al., 2010). Estes dados sugerem que a ocorrência de heterodímeros entre estas as duas isoformas da PIPKII, no núcleo, regula a atividade, localização e, possivelmente, direciona-os para os diferentes alvos da sinalização intracelular nos quais estas proteínas estão envolvidas.

Recentemente, um estudo desenvolvido em nosso laboratório por Wenning et al. analisou a expressão gênica diferencial em reticulócitos de dois irmãos com talassemia  $\alpha$  (Doença da Hb H), com a mesma base molecular da doença e diferentes percentuais de Hb H nas hemácias do sangue periférico e observou-se que os genes da enzima PIPKII $\alpha$  e da

globina  $\beta$ , estavam superexpressos em reticulócitos do paciente com maior quantidade de Hb H (Wenning et al., 2009). Estes dados sugerem que a proporção mais elevada de Hb anômala deve-se, provavelmente, a uma taxa maior de transcrição do gene da globina  $\beta$ , e que, de alguma forma, sua expressão foi influenciada pela enzima PIPKII $\alpha$  e pela via de sinalização celular do fosfatidilinositol. Além disso, outro estudo realizado no mesmo laboratório, analisou os perfis de expressão dos genes das PIPKs e das globinas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) durante a diferenciação eritróide humana em cultura de células CD34<sup>+</sup> e demonstrou que a expressão do gene PIPKII $\alpha$ , bem como os demais genes das subfamílias das PIPKs, aumentou à medida que as células se tornaram mais diferenciadas, coincidindo com os perfis de expressão dos genes de globinas (Zaccariotto, 2009). No presente estudo, nós analisamos os perfis de expressão gênica da PIPKII $\alpha$  em células de linhagem hematopoiéticas durante as diferenciações eritroide, granulocítica e megacariocítica e observamos que a PIPKII $\alpha$  está envolvida, especificamente, somente com a diferenciação eritroide. Estes dados reforçam a hipótese de que a sinalização celular desempenhada pela PIPKII $\alpha$ , no núcleo, envolve a regulação da expressão gênica das globinas durante a eritropoiese.

Classicamente, as análises genéticas procedem do fenótipo para o genótipo, ou seja, o fenótipo alterado fornece dicas sobre a função do gene responsável e, por clonagem posicional ou por análise de genes candidatos, pode-se isolar o gene causador da doença. Esta abordagem tem sido utilizada com sucesso na identificação de genes responsáveis por várias doenças, utilizando-se marcadores de localização cromossômica ou estudando-se, quando conhecidas, as vias bioquímicas que produzem o fenótipo em questão (Barbosa e Lin, 2004). Os experimentos de perda-de-função são estratégias para se conhecer a função

de um determinado gene e procedem do genótipo para o fenótipo. Esta poderosa estratégia é chamada de “genética reversa”, em oposição à abordagem clássica (direta) (Wicking e Williamson, 1991). Desde o final dos anos 90, os *short interfering* RNAs têm sido utilizados para se estudar a função de genes. Essas pequenas moléculas de RNA são intermediárias de um processo conhecido como RNAi (Baulcombe, 2002). Esse fenômeno foi descrito pela primeira vez no nemátodo *Caenorhabditis elegans*, em 1998, quando se observou que a presença de apenas algumas poucas moléculas de RNA dupla-fita (dsRNA) eram capazes de abolir a expressão de um determinado gene com seqüência similar àquele dsRNA (Fire et al., 1998). Neste trabalho, pela primeira vez em células de linhagem eritroleucêmica humana, foi possível demonstrar pela redução na produção da proteína PIPKII $\alpha$ , através da técnica de RNAi, mediada por moléculas de shRNA, que a diminuição da expressão do gene da PIPKII $\alpha$  provoca um aumento significativo da expressão gênica e protéica da globina  $\alpha$ . Observamos, também, uma tendência de maior expressão gênica e protéica da globina  $\gamma$  ( $p=0,05$ ). Estes resultados evidenciam uma relação entre esta enzima e a síntese de Hb nas células K562.

A alteração da sinalização normal pode ocorrer como resultado de mutações, alteração de expressão ou ativação dos componentes das vias de sinalização, com consequente alteração na regulação da proliferação, diferenciação e apoptose celular. Luoh et al., em 2004, observaram modificações na morfologia celular e um aumento na proliferação das células de câncer de mama que tinham o gene da PIPKII $\beta$  superexpresso (Luoh et al., 2004). Nós observamos que o silenciamento do gene da PIPKII $\alpha$  não afetou a progressão do ciclo celular e apoptose, mas resultou em uma diminuição na proliferação celular das células K562. No entanto, animais submetidos ao *knockout* para o gene da

PIP2II $\alpha$  não apresentaram fenótipos aberrantes, sugerindo que isoformas das PIPKs podem ter funções redundantes (Clarke et al., 2007).

Em resumo, o presente estudo demonstrou que a PIP2II $\alpha$  estava presente no núcleo e citoplasma das células de linhagem hematopoiética. Durante a diferenciação eritroide das células K562, o gene da PIP2II $\alpha$  foi superexpresso, e durante o silenciamento gênico houve um discreto aumento da expressão dos genes  $\gamma$ , elevação significativa da expressão dos genes  $\alpha$  e diminuição da proliferação celular. Esses resultados corroboram a sugestão prévia de existência de relação entre a PIP2II $\alpha$  e a expressão dos genes de globinas, relação que deve continuar a ser investigada em células eritroides normais e de pacientes com hemoglobinopatias.

A elucidação dos mecanismos regulatórios envolvidos na modulação da expressão dos genes das globinas  $\alpha$  e  $\gamma$  pela PIP2II $\alpha$  nas células hematopoiéticas dependem, ainda, de estudos que investiguem o perfil da expressão gênica e protéica de outras proteínas envolvidas na via de sinalização celular por fosfoinosítídeos durante a diferenciação eritroide e o papel do PI4,5P<sub>2</sub> na regulação da expressão gênica.

## **5. CONCLUSÕES**

- 1) A PIPKII $\alpha$  encontra-se presente nas células de linhagem hematopoiética K562, KG1, NB4, HL60 e P39. A expressão do gene da PIPKII $\alpha$  difere entre as linhagens, sendo maior nas células K562. Já em relação ao nível protéico, as linhagens K562, KG1 e NB4 apresentaram resultados muito próximos;
- 2) A PIPKII $\alpha$  está localizada e no núcleo e citoplasma das células das linhagem hematopoiéticas K562, H160 e NB4;
- 3) A maior expressão gênica da PIPKII $\alpha$  ocorre durante a diferenciação eritroide das células K562;
- 4) Não há mudanças na expressão gênica da PIPKII $\alpha$  durante a diferenciação megacariocítica das células K562, e durante a diferenciação granulocítica das células NB4;
- 6) A inibição da PIPKII $\alpha$  resulta em aumento da expressão gênica e protéica da globina  $\alpha$  e uma tendência de aumento da globinas  $\gamma$  em células K562.
- 5) O silenciamento da PIPKII $\alpha$  resulta em redução da proliferação das células K562, mas não afeta o ciclo celular e a apoptose.

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da Célula*. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2010.

Backman L. Protein cytoskeleton. Functional or futile phosphorus. *Nature* 1988; 334:653-653.

Barbosa AS, Lin CJ. Silenciamento de genes com RNA interferência: um novo instrumento para investigação da fisiologia e fisiopatologia do córtex adrenal. *Arq Brás Endocrinol Metab* 2004; 48:612-619.

Barlow CA, Laishram RS, Anderson RA. Nuclear phosphoinositides: a signaling enigma wrapped in a comportmental conundrum. *Trends Cell Biol* 2010; 20:25-35.

Baulcombe D. RNA silencing. *Curr Biol* 2002; 12:82-84.

Bazenet CE, Ruano AR, Brockman JL, Anderson RA. The human erythrocyte contains two forms of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase which are differentially active toward membranes. *J Biol Chem* 1990; 265:18012-18022.

Ben-Shlomo I, Yu Hsu S, Rauch R, Kowalski HW, Hsueh AJ. Signaling receptome: a genomic and evolutionary perspective of plasma membrane receptors involved in signal transduction. *Sci STKE* 2003; 187:R9.

Boronenkov IV, Anderson RA. The sequence of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase defines a novel family of lipid kinases. *J Biol Chem* 1995; 270:2881-2884.

Boronenkov IV, Loijens JC, Umeda M, Anderson RA. Phosphoinositide signaling pathways in nuclei are associated with nuclear speckles containing pre-mRNA processing factors. *Mol Biol Cell* 1998; 9:3547-3560.

Bridges AJ. Chemical inhibitors of protein kinases. *Chem Rev* 2001; 101:2541-2572.

Bunce MW, Bergendahl K, Anderson RA. Nuclear PI(4,5)P(2): a new place for an old signal. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1761:560-569.

Bunce MW, Boronenkov IV, Anderson RA. Coordinated activation of the nuclear ubiquitin ligase Cul3-SPOP by the generation of phosphatidylinositol 5-phosphate. *J Biol Chem* 2008; 283:8678-8686.

Bultsma Y, Keune WJ, Divecha N. PIP4K $\beta$  interacts with and modulates nuclear localization of the high-activity PtIns5P-4-kinase isoform PIP4K $\alpha$ . *Biochem J* 2010; 430:223-235.

Carpenter CL, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. *Biochemistry* 1990; 29:11147-11156.

Chui DHK, Furcharoen S, Chan V. Hemoglobin H disease: not necessarily a benign disorder. *Blood* 2003;101: 781-800.

Clarke JH, Richardson JP, Hinchliffe KA and Irvine RF. Type II PtdInsP kinases: location, regulation and function. *Biochem Soc Symp* 2007;149-59.

Clarke JH, Wang M, Irvine RF. Localization, regulation and function of type II phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinases. *Adv Enzyme Regul* 2010; 50:12-18.

Clarke JH, Emson PC, Irvine RF. Localization of phosphatidylinositol phosphate kinase II $\gamma$  in kidney to a membrane trafficking compartment within specialized cells of the nephron. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 295:1422-1430.

Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 93:6025-3030.

Divecha N, Banfic H, Irvine RF. Inositides and the nucleus and inositides in the nucleus. *Cell* 1993; 74:405-407.

Divecha N, Brooksbank CE, Irvine RF. Purification and characterization of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinases. *Biochem J* 1992; 288:637-642.

Divecha N, Truong O, Hsuan JJ, Hinchliffe KA, Irvine RF. The cloning and sequence of the C isoform of PtdIns4P 5-kinase. *Biochem J* 1995; 309:715-719.

Doughman RL, Firestone AJ, Anderson RA. Phosphatidylinositol phosphate kinases put PI4,5P<sub>2</sub> in its place. *J Membrane Biol* 2003; 194:77-89.

Engh RA, Bossemeyer D. The protein kinase activity modulation sites: mechanisms for cellular regulation: targets for therapeutic intervention. *Adv Enzyme Regul* 2001; 41:121-149.

Ferreira R, Ohneda K, Yamamoto M and Philipsen S. GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Mol Cell Biol* 2005;25:1215-27.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by doublestranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391:806-11.

Halstead JR, Jalink K, Divecha N. An emerging role for PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-mediated signaling in human disease. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26:654-660.

Heck JN, Mellman DL, Ling K, Sun Y, Wagoner MP, Schill NJ et al. A conspicuous connection: structure defines function for the phosphatidylinositol-phosphate kinase family. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2007; 42:15-39.

Higgs DR. Alpha-Thalassemia. *Baillieres Clin Haematol* 1993; 6:117-50.

Higgs DR. Gene regulation in hematopoiesis: new lessons from thalassemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004; 1-13.

Hinchliffe KA, Irvine RF and Divecha N. Aggregation-dependent, integrin-mediated increases in cytoskeletally associated PtdInsP2 (4,5) levels in human platelets are controlled by translocation of PtdIns 4-P 5-kinase C to the cytoskeleton. *Embo J* 1996;15:6516-24.

Loijens JC, Anderson RA. Type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases are distinct members of this novel lipid kinase family. *J Biol Chem* 1996; 271:32937-32943.

Luoh SW, Venkatesan N and Tripathi R. Overexpression of the amplified Pip4k2beta gene from 17q11-12 in breast cancer cells confers proliferation advantage. *Oncogene* 2004;23:1354-63.

Martelli AM, Follo MY, Evangelisti C, Falà F, Fiume R, Billi AM et al. Nuclear inositol lipid metabolism: More than just second messenger. *J Cell Biochem* 2005; 96:285-292.

McCrea HJ, de Camilli P. Mutations in phosphoinositide metabolizing enzymes and human disease. *Physiology (Bethesda)* 2009; 24:8-16.

Heck JN, Mellman DL, Ling K, Sun Y, Wagoner MP, Schill NJ et al. A conspicuous connection: structure defines function for the phosphatidylinositol-phosphate kinase family. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2007; 42:15-39.

Hinchliffe KA, Giudici ML, Letcher AJ, Irvine RF. Type II alpha phosphatidylinositol phosphate kinase associates with the plasma membrane via interaction with type I isoforms. *Biochem J* 2002; 363:563-570.

Hokin Le, Hokin MR. The incorporation of 32P from triphosphate into polyphosphoinositides (gamma-32P) adenosine and phosphatidic acid in erythrocyte membranes. *Biochim Biophys Acta* 1964; 84:563-575.

Huang Z, Anderson RE, Cao W, Wiechmann AF, Rajala RVS. Light-induced tyrosine phosphorylation of rod outer segment membrane proteins regulate the translocation, membrane binding and activation of type II  $\alpha$  phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase. *Neurochem Res* 2011; 36:627-635.

Krebs EG, Graves DJ, Fischer EH. Factors affecting the activity of muscle phosphorylase b kinase. *J Biol Chem* 1959; 234:2867-2873.

Lacalle RA, Peregil RM, Albar JP, Merino E, Martínez-A C, Mérida I, et al. Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase controls neutrophil polarity and directional movement. *J Cell Biol* 2007; 179:1539-1553.

Lecompte O, Poch O, laporte J. PtdIns5P regulation through evolution: roles in membrane trafficking? *Trends Biochem Sci* 2008; 33:453-460.

Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 1992; 257:967-971.

Liu Y, Bankaitis VA. Phosphoinositide phosphatases in cell biology and disease. *Prog Lipid Res* 2010; 49:201-217.

Loijens JC, Boronenkov IV, Parker GJ, Anderson RA. The phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase family. *Adv Enzyme Regul* 1996; 36:115-140.

Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. *Science* 2002; 298:1912-1934.

McCrea HJ, De Camilli P. Mutations in phosphoinositide metabolizing enzymes and human disease. *Physiology* 2009; 24:8-16.

Michell RH, Conroy LA, Finney M, French PJ, Bunce CM, Anderson K et al. Inositol lipids and phosphates in the proliferation and differentiation of lymphocytes and myeloid cells. *Ciba Found Symp* 1992; 164:2-11.

Papin JA, Hunter T, Palsson BO, Subramaniam S. Reconstruction of cellular signaling networks and analysis of their properties. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6:99-111.

Pike MC, Arndt C. Characterization of phosphatidylinositol and phosphatidylinositol-4-phosphate kinases in human neutrophils. *J Immunol* 1988; 140:1967-1973.

Pires daSilva A, Sommer RJ. The evolution of signalling pathways in animal development. *Nat Rev Genet* 2003; 4:39-49.

Plowman GD, Sudarsanam S, Bingham J, Whyte D, Hunter T. The protein kinases of *Caenorhabditis elegans*: a model for signal transduction in multicellular organisms. *PNAS* 1999; 96:13603-13610.

Rozenvayn N, Flaumenhaft R. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate mediates Ca<sup>2+</sup>-induced platelet  $\alpha$ -granule secretion. *J Biol Chem* 2001; 276:22410-22419.

Schulze H, Korpál M, Hurov J, Kim SW, Zhang J, Cantley LC, et al. Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood* 2006; 107:3868-3875.

Shchemelinin I, Sefc L, Necas E. Protein kinases, their function and implication in cancer and other diseases. *Folia Biol (Praha)* 2006; 52:81-100.

Skwarek LC, Boulianne GL. Great expectations for PIP: phosphoinositides as regulators of signaling during development and disease. *Dev Cell* 2009; 16:12-20.

Stachura DL, Chou ST and Weiss MJ. Early block to erythromegakaryocytic development conferred by loss of transcription factor GATA-1. *Blood* 2006;107:87-97.

Suzuki T, Banno Y, Nozawa Y. Partial purification and characterization of two forms of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase from human platelet membrane. *Thromb Res* 1991; 64:45-56.

van den Bout I, Divecha Nullin. PIP5K-driven PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> synthesis: regulation and cellular functions. *J Cell Sci* 2009; 122:3837-3850.

Wang M, Bond NJ, Letcher AJ, Richardson JP, Lilley KS, Irvine RF, Clarke JH. Genomic tagging reveals a random association of endogenous PtdIns5P 4-kinases II $\alpha$  and II $\beta$  and a partial nuclear localization of the II $\alpha$  isoform. *Biochem J* 2010; 430:215-221.

Wenning MRSC, Mello MP, Albuquerque DM, Assis AM, Lanaro C, Zaccariotto TR, Costa FF, Sonati MF. PIP5KIIA-Um transcrito diferencialmente expresso em reticulócitos de pacientes com Doença de Hb H. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 28: 34, 2006.

Wenning MR, Mello MP, Andrade TG, Lanaro C, Albuquerque DM, Saad ST, Costa FF, Sonati MF. PIP4KIIA and beta-globin: transcripts differentially expressed in reticulocytes and associated with high levels of Hb H in two siblings with Hb H disease. *Eur J Haematol* 2009; 83:490-493.

Wicking C, Williamson B. From linked marker to gene. *Trends Genet* 1991; 7:288-293.

Xu W, Wang P, Petri B, Zhang Y, Tang W, Sun L, et al. Integrin-induced regulates neutrophil polarization, directionality, and in vivo infiltration. *Immunity* 2010; 33:340-350.

Zhang X, Loijens JC, Boronenkov IV, parker GJ, Norris FA, Chen J et al. Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase isozymes catalyze the synthesis of 3-phosphate containing phosphatidylinositol signalling molecules. *J Biol Chem* 1997; 272:17756-17761.

Zaccariotto TR. Perfil de expressão das PIP quinases durante a diferenciação eritroide humana *in vitro* [Tese-Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2009.

## **7. ANEXOS**

**ANEXO 1: DADOS ESTATÍSTICOS UTILIZADOS PARA ELABORAÇÃO  
DO MANUSCRITO**

## Resultados:

### *Análise Descritiva e Comparativa entre Grupos e Tempos – K2A/Mock*

- As tabelas 1 e 2, a seguir, apresentam as estatísticas descritivas e a comparação das variáveis entre os grupos e os tempos para PIPK2A.

**Tabela 1.** Análise descritiva das variáveis numéricas por grupo e tempo para PIPK2A.

VARIÁVEL	N	MÉDIA	D.P.	MÍN	MEDIANA	MÁX
Mock10	5	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
dsC10	3	0.89	0.15	0.74	0.89	1.04
SH10	5	0.18	0.18	0.01	0.16	0.46
Mock15	5	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
dsC15	3	1.06	0.12	0.98	1.01	1.20
SH15	5	0.34	0.22	0.11	0.30	0.65
Mock20	5	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
dsC20	3	0.99	0.09	0.91	0.98	1.09
SH20	4	0.19	0.23	0.01	0.12	0.50
Mock22	5	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
dsC22	3	0.93	0.20	0.77	0.86	1.15
SH22	4	0.29	0.25	0.03	0.29	0.53
Mock24	5	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
dsC24	3	1.01	0.13	0.91	0.96	1.15
SH24	4	0.18	0.17	0.02	0.15	0.38
Mock28	5	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
dsC28	3	0.95	0.11	0.84	0.95	1.06
SH28	4	0.11	0.15	0.02	0.05	0.34

**Tabela 2.** Resultados da ANOVA para medidas repetidas para comparação entre grupos e avaliações para PIPK2A.

Variável*	Comparação entre Grupos (Mock, dsC e SH)	Comparação entre Tempos (10, 15, 20, 22, 24 e 28 dias)	Interação Grupos vs Tempos
PIPK2A	<b>P=0.020<sup>a</sup></b>	P=0.700	P=0.994

\* Variável transformada em postos (*ranks*) para os testes devido à ausência de distribuição Normal.

(a) Diferenças significativas entre grupos (teste de perfil por contraste): Mock  $\neq$  SH, dsC  $\neq$  SH.

## Análise Descritiva e Comparativa entre Grupos e Tempos – Alfa/Mock

- As tabelas 3 e 4, a seguir, apresentam as estatísticas descritivas e a comparação das variáveis entre os grupos e os tempos para alfa-globina usando Mock como controle. O tempo 22 foi desconsiderado por ter apenas n=2 experimentos completos com os 3 grupos.

**Tabela 3.** Análise descritiva das variáveis numéricas por grupo e tempo para alfa/Mock.

VARIÁVEL	N	MÉDIA	D. P.	MÍN	MEDIANA	MÁX
Mock10	5	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
dsC10	3	0.85	0.21	0.70	0.77	1.09
SH10	4	2.30	1.30	0.91	2.25	3.79
Mock15	5	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
dsC15	3	2.95	1.07	2.29	2.37	4.18
SH15	4	3.66	2.28	1.05	3.65	6.31

**Tabela 3 (cont).** Análise descritiva das variáveis numéricas por grupo e tempo para alfa/Mock.

VARIÁVEL	N	MÉDIA	D. P.	MÍN	MEDIANA	MÁX
Mock20	5	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
dsC20	3	5.36	2.55	2.49	6.24	7.36
SH20	4	4.58	3.37	1.29	4.15	8.74
Mock22	5	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
dsC22	2	3.37	2.51	1.60	3.37	5.14
SH22	3	2.69	2.87	0.96	1.10	6.00
Mock24	5	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
dsC24	3	1.97	1.15	1.28	1.32	3.29
SH24	4	2.22	1.30	1.19	1.81	4.07
Mock28	4	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
dsC28	3	1.07	0.17	0.88	1.10	1.21
SH28	4	1.32	0.60	0.55	1.36	2.02

**Tabela 4.** Resultados da ANOVA para medidas repetidas para comparação entre grupos e avaliações para alfa/Mock.

Variável*	Comparação entre Grupos (Mock, dsC e SH)	Comparação entre Tempos (10, 15, 20, 24 e 28 dias)	Interação Grupos vs Tempos
Alfa/Mock	<b>P&lt;0.001</b> <sup>a</sup>	P=0.178	<b>P=0.030</b> <sup>a</sup>

\* Variável transformada em postos (*ranks*) para os testes devido à ausência de distribuição Normal.

(a) Efeito significativo da interação Grupos vs Tempos: Diferenças significativas entre grupos (teste de perfil por contraste): Mock  $\neq$  dsC, Mock  $\neq$  SH. Diferenças significativas entre grupos por tempo (teste de perfil por contraste): Tempo10: nenhuma diferença significativa; tempo15: Mock  $\neq$  dsC, Mock  $\neq$  SH; tempo20: Mock  $\neq$  dsC, Mock  $\neq$  SH; tempo24: Mock  $\neq$  dsC, Mock  $\neq$  SH; tempo28: nenhuma diferença significativa; diferenças significativas entre tempos por grupo (teste de perfil por contraste): Mock: nenhuma diferença significativa; dsC: nenhuma diferença significativa; SH: nenhuma diferença significativa.

### *Análise Descritiva e Comparativa entre Grupos e Tempos – Gama/Mock*

- As tabelas 5 e 6, a seguir, apresentam as estatísticas descritivas e a comparação das variáveis entre os grupos e os tempos para gama-globina usando Mock como controle. O tempo 22 foi desconsiderado por ter apenas n=2 experimentos completos com os 3 grupos.

**Tabela 5.** Análise descritiva das variáveis numéricas por grupo e tempo para gama/Mock.

VARIÁVEL	N	MÉDIA	D. P.	MÍN	MEDIANA	MÁX
Mock10	5	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
dsC10	3	0.73	0.27	0.55	0.60	1.04
SH10	4	1.42	0.71	0.76	1.27	2.38
Mock15	4	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
dsC15	3	2.01	0.19	1.79	2.10	2.14
SH15	4	2.20	1.01	1.19	2.05	3.51
Mock20	4	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
dsC20	3	4.05	3.20	1.31	3.26	7.57
SH20	4	3.99	4.64	0.80	2.25	10.68
Mock22	4	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
dsC22	2	2.72	1.83	1.42	2.72	4.01
SH22	3	2.47	1.90	1.18	1.58	4.65
Mock24	4	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
dsC24	3	2.52	1.26	1.33	2.40	3.84
SH24	4	3.32	2.16	1.40	3.26	5.36
Mock28	4	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
dsC28	3	1.54	0.54	1.11	1.35	2.15
SH28	4	1.33	0.54	0.60	1.41	1.89

**Tabela 6.** Resultados da ANOVA para medidas repetidas para comparação entre grupos e avaliações para gama/Mock.

Variável*	Comparação entre Grupos (Mock, dsC e SH)	Comparação entre Tempos (10, 15, 20, 24 e 28 dias)	Interação Grupos vs Tempos
Gama/Mock	<b>P=0.028</b> <sup>a</sup>	P=0.058	P=0.185

\* Variável transformada em postos (*ranks*) para os testes devido à ausência de distribuição Normal.

(a) Diferenças significativas entre grupos (teste de perfil por contraste): Mock  $\neq$  dsC, Mock  $\neq$  SH.

### **Análise Descritiva e Comparativa entre Grupos e Tempos – Alfa/dsC**

- As tabelas 7 e 8, a seguir, apresentam as estatísticas descritivas e a comparação das variáveis entre os grupos e os tempos para alfa-globina usando dsC como controle.

**Tabela 7.** Análise descritiva das variáveis numéricas por grupo e tempo para alfa/dsC.

VARIÁVEL	N	MÉDIA	D. P.	MÍN	MEDIANA	MÁX
Mock10	3	1.21	0.26	0.92	1.30	1.42
dsC10	3	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
SH10	3	2.28	1.11	1.29	2.05	3.48
Mock15	3	0.37	0.11	0.24	0.42	0.44
dsC15	3	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
SH15	3	1.54	0.38	1.19	1.51	1.94
Mock20	3	0.23	0.15	0.14	0.16	0.40
dsC20	3	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
SH20	3	1.04	0.13	0.93	1.00	1.19
Mock22	3	0.33	0.26	0.18	0.19	0.63
dsC22	3	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
SH22	3	0.88	0.21	0.69	0.84	1.10
Mock24	3	0.61	0.27	0.30	0.76	0.78
dsC24	3	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
SH24	3	1.27	0.33	0.96	1.24	1.62
Mock28	3	1.43	0.97	0.82	0.90	2.55
dsC28	3	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
SH28	3	2.15	0.89	1.60	1.66	3.17

**Tabela 8.** Resultados da ANOVA para medidas repetidas para comparação entre grupos e avaliações para alfa/dsC.

Variável*	Comparação entre Grupos (Mock, dsC e SH)	Comparação entre Tempos (10, 15, 20, 22, 24 e 28 dias)	Interação Grupos vs Tempos
Alfa/dsC	<b>P=0.004<sup>a</sup></b>	<b>P=0.037<sup>a</sup></b>	P=0.053

\* Variável transformada em postos (*ranks*) para os testes devido à ausência de distribuição Normal.

(a) Diferenças significativas entre grupos (teste de perfil por contraste): Mock  $\neq$  dsC, Mock  $\neq$  SH; diferenças significativas entre tempos (teste de perfil por contraste): t10 $\neq$ t15, t10 $\neq$ t20, t10 $\neq$ t22, t10 $\neq$ t24.

### **Análise Descritiva e Comparativa entre Grupos e Tempos – Gama/dsC**

- As tabelas 9 e 10, a seguir, apresentam as estatísticas descritivas e a comparação das variáveis entre os grupos e os tempos para gama-globina usando dsC como controle. O tempo 22 foi desconsiderado por ter apenas n=2 experimentos completos com os 3 grupos.

**Tabela 9.** Análise descritiva das variáveis numéricas por grupo e tempo para gama/dsC.

VARIÁVEL	N	MÉDIA	D. P .	MÍN	MEDIANA	MÁX
Mock10	3	1.48	0.46	0.96	1.66	1.83
dsC10	3	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
SH10	3	1.66	0.92	1.01	1.26	2.71
Mock15	3	0.50	0.05	0.47	0.48	0.56
dsC15	3	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
SH15	3	1.26	0.42	0.81	1.34	1.64
Mock20	3	0.40	0.33	0.13	0.31	0.76
dsC20	3	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
SH20	3	1.06	0.37	0.67	1.11	1.41
Mock22	2	0.48	0.31	0.26	0.48	0.70
dsC22	2	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
SH22	2	1.25	0.20	1.11	1.25	1.40
Mock24	3	0.47	0.26	0.25	0.42	0.75
dsC24	3	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
SH24	3	1.46	0.54	1.14	1.16	2.08
Mock28	3	0.70	0.22	0.47	0.74	0.90
dsC28	3	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
SH28	3	1.07	0.23	0.88	1.00	1.32

**Tabela 10.** Resultados da ANOVA para medidas repetidas para comparação entre grupos e avaliações para gama/dsC.

Variável*	Comparação entre Grupos (Mock, dsC e SH)	Comparação entre Tempos (10, 15, 20, 24 e 28 dias)	Interação Grupos vs Tempos
Gama/dsC	P=0.054	P=0.100	P=0.131

\* Variável transformada em postos (*ranks*) para os testes devido à ausência de distribuição Normal.

### *Análise Descritiva e Comparativa entre Grupos – Quantif. Protéica*

- As tabelas 11 e 12, a seguir, apresentam as estatísticas descritivas e a comparação das variáveis entre os grupos para quantificação protéica.

**Tabela 11.** Análise descritiva das variáveis numéricas por grupo para quantificação protéica.

VARIÁVEL	N	MÉDIA	D.P.	MÍN	MEDIANA	MÁX
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PIPK2ACtrl	3	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
PIPK2Ash	3	0.25	0.14	0.14	0.19	0.41
VARIÁVEL	N	MÉDIA	D.P.	MÍN	MEDIANA	MÁX
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GamaCtrl	3	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
Gamash	3	3.46	2.22	1.82	2.57	5.99
VARIÁVEL	N	MÉDIA	D.P.	MÍN	MEDIANA	MÁX
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PIPK2AM	6	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
PIPK2AdsC	6	1.03	0.13	0.81	1.04	1.21
PIPK2AShh	6	0.26	0.07	0.18	0.24	0.37
VARIÁVEL	N	MÉDIA	D.P.	MÍN	MEDIANA	MÁX
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GamaM	6	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
GamadsC	6	5.82	4.28	1.03	5.19	11.70
GamaShh	6	13.79	10.04	2.72	11.57	28.43
VARIÁVEL	N	MÉDIA	D.P.	MÍN	MEDIANA	MÁX
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AlfaM	3	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00
AlfadsC	3	1.46	0.51	0.94	1.47	1.96
AlfaShh	3	3.65	2.83	1.94	2.08	6.92

**Tabela 12.** Resultados das ANOVAs para medidas repetidas para comparação entre grupos para quantificação protéica.

Variável*	Comparação entre Grupos	Variável*	Comparação entre Grupos
PIP2A – Ctrl vs Sh	<b>P=0.035</b> <sup>a</sup>	PIP2A – M, dsC e Sh	<b>P=0.001</b> <sup>b</sup>
Gama – Ctrl vs Sh	<b>P=0.035</b> <sup>a</sup>	Gama – M, dsC e Sh	<b>P&lt;0.001</b> <sup>c</sup>
		Alfa – M, dsC e Sh	P=0.112

\* Variável transformada em postos (*ranks*) para os testes devido à ausência de distribuição Normal.

(a) Diferenças significativas entre grupos (teste de perfil por contraste): Ctrl ≠ SH.

(b) Diferenças significativas entre grupos (teste de perfil por contraste): Mock ≠ SH, dsC ≠ SH.

(c) Diferenças significativas entre grupos (teste de perfil por contraste): Mock ≠ dsC, Mock ≠ SH, dsC ≠ SH.

### ***Análise Descritiva e Comparativa entre Grupos e Doses – MTT***

- As tabelas 13 e 14, a seguir, apresentam as estatísticas descritivas e a comparação das variáveis entre os grupos e as doses para MTT.

**Tabela 13.** Análise descritiva das variáveis numéricas por grupo e dose para MTT.

Grupo	VARIÁVEL	N	MÉDIA	D. P.	MÍN	MEDIANA	MÁX
MOCK	Dose0	4	100.07	0.69	99.24	100.09	100.86
	Dose05	4	32.58	7.79	25.73	32.28	40.05
	Dose1	4	26.93	7.90	19.92	26.76	34.28
PIP	Dose0	4	90.07	1.81	88.11	90.08	92.01
	Dose05	4	39.49	12.86	27.92	39.00	52.03
	Dose1	4	30.78	10.07	22.10	29.53	41.97

**Tabela 14.** Resultados da ANOVA para medidas repetidas para comparação entre grupos e doses para MTT.

Variável*	Comparação entre Grupos (Mock e PIP)	Comparação entre Doses (0, 0.5 e 1)	Interação Grupos vs Doses
Proliferação celular	P=0.875	<b>P&lt;0.001</b> <sup>a</sup>	P=0.144

\* Variável transformada em postos (*ranks*) para os testes devido à ausência de distribuição Normal.

(a) Diferenças significativas entre doses (teste de perfil por contraste): D0 ≠ D0.5, D0≠D1, D0.5≠D1.

### *Análise Descritiva e Comparativa entre Grupos e Doses – Apoptose*

- As tabelas 15 e 16, a seguir, apresentam as estatísticas descritivas e a comparação das variáveis entre os grupos e as doses para apoptose.

**Tabela 15.** Análise descritiva das variáveis numéricas por grupo e dose para apoptose.

Grupo	VARIÁVEL	N	MÉDIA	D. P.	MÍN	MEDIANA	MÁX
Control	Dose0	4	19.47	4.95	12.76	20.21	24.70
	Dose05	4	30.65	4.46	26.05	30.30	35.96
	Dose1	4	37.17	5.31	30.98	38.03	41.65
PIP	Dose0	4	20.23	2.85	17.61	19.51	24.28
	Dose05	4	31.81	3.51	27.22	32.54	34.93
	Dose1	4	36.25	6.62	30.11	35.09	44.71

**Tabela 16.** Resultados da ANOVA para medidas repetidas para comparação entre grupos e doses para apoptose.

Variável*	Comparação entre Grupos (Control e PIP)	Comparação entre Doses (0, 0.5 e 1)	Interação Grupos vs Doses
Células apoptóticas	P=0.853	<b>P&lt;0.001</b> <sup>a</sup>	P=0.621

\* Variável transformada em postos (*ranks*) para os testes devido à ausência de distribuição Normal.

(a) Diferenças significativas entre doses (teste de perfil por contraste):  $D0 \neq D0.5$ ,  $D0 \neq D1$ ,  $D0.5 \neq D1$ .

### *Análise Descritiva e Comparativa entre Grupos e Fases – Ciclo Celular*

- As tabelas 17 e 18, a seguir, apresentam as estatísticas descritivas e a comparação das variáveis entre os grupos e as fases para ciclo celular.

**Tabela 17.** Análise descritiva das variáveis numéricas por grupo e fase para ciclo celular.

Grupo	VARIÁVEL	N	MÉDIA	D.P.	MÍN	MEDIANA	MÁX
Control	CicloG0G1	3	48.09	1.89	46.85	47.15	50.27
	CicloS	3	45.68	2.09	43.29	46.58	47.16
	CicloG2	3	6.17	0.44	5.69	6.24	6.57
PIP	CicloG0G1	4	43.27	7.13	36.25	43.46	49.90
	CicloS	4	48.15	3.56	44.74	48.31	51.23
	CicloG2	4	8.58	3.68	4.68	8.56	12.54

**Tabela 18.** Resultados da ANOVA para medidas repetidas para comparação entre grupos e fases para ciclo celular.

Variável*	Comparação entre Grupos (Control e PIP)	Comparação entre Fases (G0/G1, S e G2)	Interação Grupos vs Fases
Ciclo celular	P=0.453	<b>P=0.005<sup>a</sup></b>	P=0.474

\* Variável transformada em postos (*ranks*) para os testes devido à ausência de distribuição Normal.

- (a) Diferenças significativas entre fases (teste de perfil por contraste):  $G0/G1 \neq G2$ ,  $S \neq G2$ .

## Análise Descritiva e Comparativa entre Grupos - Diferenciação Eritroide

### Unpaired t test

Do the means of CTRL and Erythroid differ significantly?

#### P value

The two-tailed P value is 0.0066, considered very significant.

t = 5.175 with 4 degrees of freedom.

#### 95% confidence interval

Mean difference = 3.843 (Mean of Erythroid minus mean of CTRL)

The 95% confidence interval of the difference: 1.782 to 5.905

#### Assumption test: Are the standard deviations equal?

The t test assumes that the columns come from populations with equal SDs. The following calculations test that assumption.

F = 49647

The P value is < 0.0001.

This test suggests that the difference between the two SDs is extremely significant. Since the t test assumes populations with equal SDs, you should consider transforming your data (reciprocal or log), selecting a nonparametric test, or selecting the alternate (Welch) t test.

#### Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

The t test assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
CTRL	Too few values to test.		
Erythroid	Too few values to test.		

### Summary of Data

Parameter:	CTRL	Erythroid
Mean:	1.037	4.880
# of points:	3	3
Std deviation:	0.005774	1.286
Std error:	0.003333	0.7427
Minimum:	1.030	3.400
Maximum:	1.040	5.730
Median:	1.040	5.510
Lower 95% CI:	1.022	1.684
Upper 95% CI:	1.051	8.076

\* \* \*

## Análise Descritiva e Comparativa entre Grupos - Diferenciação Granulocítica

### Unpaired t test

Do the means of CTRL and Granulocytic differ significantly?

#### P value

The two-tailed P value is 0.1095, considered not significant.

t = 2.051 with 4 degrees of freedom.

#### 95% confidence interval

Mean difference = 0.8800 (Mean of Granulocytic minus mean of CTRL)

The 95% confidence interval of the difference: -0.3108 to 2.071

#### Assumption test: Are the standard deviations equal?

The t test assumes that the columns come from populations with equal SDs. The following calculations test that assumption.

F = 337.00

The P value is 0.0030.

This test suggests that the difference between the two SDs is very significant. Since the t test assumes populations with equal SDs, you should consider transforming your data (reciprocal or log), selecting a nonparametric test, or selecting the alternate (Welch) t test.

#### Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

The t test assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
CTRL	Too few values to test.		
Granulocytic	Too few values to test.		

### Summary of Data

Parameter:	CTRL	Granulocytic
Mean:	1.003	1.883
# of points:	3	3
Std deviation:	0.04041	0.7419
Std error:	0.02333	0.4283
Minimum:	0.9600	1.060
Maximum:	1.040	2.500
Median:	1.010	2.090
Lower 95% CI:	0.9029	0.04017
Upper 95% CI:	1.104	3.726

\* \* \*

## Análise Descritiva e Comparativa entre Grupos -Diferenciação Megacariocítica

### Unpaired t test

Do the means of CTRL and Megakariocytic differ significantly?

#### P value

The two-tailed P value is 0.3266, considered not significant.

t = 1.117 with 4 degrees of freedom.

#### 95% confidence interval

Mean difference = 0.9833 (Mean of Megakariocytic minus mean of CTRL)

The 95% confidence interval of the difference: -1.460 to 3.427

#### Assumption test: Are the standard deviations equal?

The t test assumes that the columns come from populations with equal SDs. The following calculations test that assumption.

F = 125.13

The P value is 0.0079.

This test suggests that the difference between the two SDs is very significant. Since the t test assumes populations with equal SDs, you should consider transforming your data (reciprocal or log), selecting a nonparametric test, or selecting the alternate (Welch) t test.

#### Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

The t test assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
CTRL	Too few values to test.		
Megakariocytic	Too few values to test.		

### Summary of Data

Parameter:	CTRL	Megakariocytic
Mean:	1.063	2.047
# of points:	3	3
Std deviation:	0.1358	1.519
Std error:	0.07839	0.8768
Minimum:	0.9800	1.140
Maximum:	1.220	3.600
Median:	0.9900	1.200
Lower 95% CI:	0.7260	-1.726
Upper 95% CI:	1.401	5.820

## Análise Descritiva e Comparativa entre Grupos - Proliferação

Mann-Whitney Test

---

Do the medians of CTRL and shPIP2Ia differ significantly?

The two-tailed P value is 0.0286, considered significant.  
(The P value is exact.)

Calculation details  
Mann-Whitney U-statistic = 0.000  
U' = 16.000  
Sum of ranks in CTRL = 26.000. Sum of ranks in shPIP2Ia = 10.000.

Summary of Data

---

Parameter:	CTRL	shPIP2Ia
Mean:	100.07	90.070
# of points:	4	4
Std deviation:	0.6904	1.806
Std error:	0.3452	0.9028
Minimum:	99.236	88.114
Maximum:	100.86	92.011
Median:	100.09	90.077
Lower 95% CI:	98.970	87.197
Upper 95% CI:	101.17	92.942

\* \* \*

## Análise Descritiva e Comparativa entre Grupos –PIP2IIA

### One-way Analysis of Variance (ANOVA)

---

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.  
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

### Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.654 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
K562 vs KG1	0.1528	3.929	ns P>0.05
K562 vs NB4	0.1797	4.622	ns P>0.05
K562 vs HL60	0.6818	17.538	*** P<0.001
K562 vs P39	0.7468	19.211	*** P<0.001
KG1 vs NB4	0.02692	0.6925	ns P>0.05
KG1 vs HL60	0.5290	13.609	*** P<0.001
KG1 vs P39	0.5941	15.282	*** P<0.001
NB4 vs HL60	0.5021	12.916	*** P<0.001
NB4 vs P39	0.5671	14.589	*** P<0.001
HL60 vs P39	0.06504	1.673	ns P>0.05

Difference	Mean	95% Confidence Interval	
	Difference	From	To
K562 - KG1	0.1528	-0.02817	0.3337
K562 - NB4	0.1797	-0.001247	0.3606
K562 - HL60	0.6818	0.5009	0.8627
K562 - P39	0.7468	0.5659	0.9277
KG1 - NB4	0.02692	-0.1540	0.2078
KG1 - HL60	0.5290	0.3481	0.7099
KG1 - P39	0.5941	0.4131	0.7750
NB4 - HL60	0.5021	0.3212	0.6830
NB4 - P39	0.5671	0.3862	0.7481
HL60 - P39	0.06504	-0.1159	0.2460

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett's test can only be performed when every column has at least five values.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
K562	Too few values to test.		
KG1	Too few values to test.		
NB4	Too few values to test.		
HL60	Too few values to test.		
P39	Too few values to test.		

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	4	1.374	0.3434
Residuals (within columns)	10	0.04534	0.004534
Total	14	1.419	

$$F = 75.756 = (MS_{\text{treatment}}/MS_{\text{residual}})$$

Summary of Data

---

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
K562	3	0.9264	0.1164	0.06718	0.9869
KG1	3	0.7736	0.08296	0.04790	0.7938
NB4	3	0.7467	0.04086	0.02359	0.7312
HL60	3	0.2446	0.02164	0.01249	0.2491
P39	3	0.1796	0.01042	0.006016	0.1850

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
K562	0.7922	1.000	0.6373	1.215
KG1	0.6825	0.8447	0.5675	0.9797
NB4	0.7159	0.7931	0.6452	0.8482
HL60	0.2211	0.2637	0.1908	0.2984
P39	0.1676	0.1862	0.1537	0.2055

\* \* \*

### Bibliografia:

- Conover, W. J. & Iman, R. L. (1981), Rank transformations as a bridge between parametric and nonparametric statistics. *The American Statistician*, 35, pp 124-129.
- Milliken, G.A. & Johnson, D.E. (1984), *Analysis of Messy Data. Volume I: Designed Experiments*. New York: Van Nostrand Reinhold Company.
- Montgomery, Douglas C. (1991), *Design and Analysis of Experiments*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: John Wiley & Sons.

### Programa Computacional:

Para análise estatística foi utilizado o seguinte programa computacional:

- SAS for Windows (Statistical Analysis System), versão 9.1.3. SAS Institute Inc, 2002-2003, Cary, NC, USA.

**ANEXO-2: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA/FCM/UNICAMP**



CEP, 24/07/07.  
(Grupo III)

**PARECER CEP:** N° 400/2007 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)  
**CAAE:** 0309.0.146.000-07

#### **I - IDENTIFICAÇÃO:**

**PROJETO:** “SILENCIAMENTO DO GENE DA ENZIMA PIP5KIIA EM CÉLULAS ERITRÓIDES DE PACIENTE COM DOENÇA DE HEMOGLOBINA H”.

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Vânia Peretti de Albuquerque Wobeto.

**INSTITUIÇÃO:** Hospital as Clínicas / UNICAMP

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 13/06/2007

**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 26/06/08 (O formulário encontra-se no *site* acima)

#### **II - OBJETIVOS**

Silenciar o gene da enzima PIP5KIIA em células eritróides de pacientes com Doença de HB H e de controle normal, em cultura, analisando posteriormente o fenótipo resultante.

#### **III - SUMÁRIO**

Serão isoladas células mononucleares do sangue periférico de indivíduo com genótipo alfa normal e de pacientes com doença de Hb H. Será feito silenciamento do gene por eletroporação de siRNA específico. A confirmação do silenciamento será feito por Rt-PCR e o fenótipo celular será analisado por observação microscópica e submissão a agentes oxidantes.

#### **IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES**

Projeto de silenciamento gênico in vitro. Protocolo adequado. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido está de acordo, após resposta do parecer.

#### **V - PARECER DO CEP**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

#### **VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES**



O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

#### VI - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 26 de junho de 2007.

  
**Prof. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo**  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP