

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia**

Marcelo Coutinho de Miranda

**O FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL (EGF) INDUZ A SINALIZAÇÃO DE  
CÁLCIO NUCLEAR POR MEIO DA AÇÃO DA FOSFOLIPASE C DELTA-4 EM SK-  
HEP-1**

Belo Horizonte

2020

Marcelo Coutinho de Miranda

**O FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL (EGF) INDUZ A SINALIZAÇÃO DE  
CÁLCIO NUCLEAR POR MEIO DA AÇÃO DA FOSFOLIPASE C DELTA-4 EM SK-  
HEP-1**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas  
da Universidade Federal de Minas Gerais, como  
requisito parcial para a obtenção do título de Doutor  
em Bioquímica e Imunologia, área de concentração  
Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Dawidson Assis Gomes

Belo Horizonte

2020

043

Miranda, Marcelo Coutinho de.

O fator de crescimento epidermal (EGF) induz a sinalização de cálcio nuclear por meio da ação da fosfolipase C delta-4 em SK-Hep-1 [manuscrito] / Marcelo Coutinho de Miranda. – 2020.

116 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Dawidson Assis Gomes.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Sinalização do Cálcio. 3. Fator de Crescimento Epidérmico. 4. Fosfolipase C delta. I. Gomes, Dawidson Assis. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE MARCELO COUTINHO DE MIRANDA.** Aos trinta dias do mês de junho de 2020 às 9:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "O fator de crescimento epidermal (EGF) induz a sinalização de cálcio nuclear por meio da ação da fosfolipase C delta-4 em SK-Hep-1", requisito final para a obtenção do grau de Doutorem Ciências: Biologia Molecular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dawidson Assis Gomes, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Erich Birelli Tahara (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Luciana Maria Silva (Fundação Ezequiel Dias - Funed-BH), aprovado; Dr. Vivian Resende (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Célio José de Castro Júnior (Santa Casa-BH Ensino e Pesquisa), aprovado; Dr. Dawidson Assis Gomes - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

- APROVADO  
 REPROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 30 de junho de 2020.

Dr. Erich Birelli Tahara (UFMG)

Dr. Luciana Maria Silva (Fundação Ezequiel Dias – Funed BH)

Dr. Vivian Resende (UFMG)

Dr. Célio José de Castro Júnior (Santa Casa-BH Ensino e Pesquisa)

Dr. Dawidson Assis Gomes - Orientador (UFMG)

## Agradecimentos

Agradeço, especialmente, ao Professor Dawidson Assis Gomes, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa, por me guiar pelos caminhos tortuosos da pesquisa, pelas oportunidades didáticas, por acreditar no meu potencial e me apoiar nas decisões mais difíceis. Agradeço também pela sabedoria transmitida, pela educação, pelo carisma, por ser modelo profissional e mais importante, pela amizade.

Ao Professor Alfredo de Miranda, pelo exemplo profissional, humanidade e serenidade.

Ao Dr. Michael Nathanson e ao Dr. Mário Strazzabosco por me permitir o privilégio de ter a experiência em uma instituição tão renomada. Agradeço pelo aprendizado e pela honra de pertencer a um grupo de pesquisa tão especial.

Aos meus familiares, de uma forma especial aos meus pais Mirian e Hilton, à minha avó Ilka, aos meus irmãos Andréia, Denise e Daniel, pela compreensão, incentivo, suporte, carinho, exemplo e amor incondicional. Ao meu cunhado David, pela força e compreensão. Ao meu querido sobrinho Bruno, por me mostrar a felicidade em pequenos e humildes gestos, por fazer os dias ao seu lado mais alegres e suaves.

À minha família emprestada. Ao Rodrigo Gosling, por ser esse amigo tão especial e sempre presente. Por ser meu confidente, meu porto seguro e nunca me deixar desistir. Ao Igor pelos sábios conselhos, pelo companheirismo, pelos votos de confiança e por me botar para cima quando eu preciso. Ao Pedrinho pela amizade, pelas aventuras, por ser uma pessoa tão meiga e presente.

À minha segunda família, LICM. À Mariane, uma grande e importante amiga, uma amiga confidente e modelo de pessoa; aos nossos apertos, nossas conversas, nossa alegria e um companheirismo invejável. Agradeço por me deixar ter você no coração e por ter certeza de que será para sempre. À minha doce Pricila, essa pessoa tão iluminada e persistente. Agradeço cada ensinamento que você me proporcionou, cada abraço que enriquecia o meu dia. Agradeço as neuras que faziam proveitosas as nossas discussões científicas. Pelo carinho tão especial e modelo de comportamento e suavidade. Agradeço pela sabedoria, pela amizade e por ser mais que uma amiga, ser uma irmã de coração. À Mari Kunrath, agradeço pela amizade tão especial. Pelas conversas intermináveis, pelo companheirismo, pelas nossas aventuras, pelo carinho e mais importante, por ser essa amiga tão presente e tão necessária. À Camila, pela doçura e paciência; por me mostrar que com muito esforço quase tudo é possível e por ser tão querida ao ponto de aquecer qualquer coração. À Joana pela amizade, pela confiança e almoços tão especiais. À Michele pela amizade, pelo companheirismo, pelos almoços e cafés; pelas conversas, pela experiência, pela paciência, pela sabedoria e, o mais importante, pelo carinho que fazia os dias cinzas de New Haven mais azul. Às companheiras Thaís, Elisa, com um sorriso contagiante e Junnia por fazer o LICM um lugar tão agradável. Aos membros distantes, mas sempre

presentes. À minha mentora e amiga Jerusa de quem sinto tanta falta. À amiga mais louca que já tive, Andréa. Muito obrigado por fazer meus dias tão agradáveis, de partilhar comigo cada tristeza e alegria, por fazer o ambiente de trabalho tão especial!

Aos membros dos laboratórios do Dr. Nathanson e Dr. Strazzabosco. À Paula pela amizade e companheirismo. Ao Remco, ao Massa, ao Mateus, à Emma, à Jittima, à Romina e à Mariangela pelo carinho, sabedoria e oportunidades.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia. Em especial, às professoras Leda e Glória pelos ensinamentos didáticos.

Aos colegas de pós-graduação, em especial àqueles companheiros de bases por fazer a ciência cada vez mais gostosa.

Aos funcionários do ICB e da UFMG.

Aos funcionários da Universidade de Yale.

Às agencias financiadoras National Institutes of Health (NIH), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio monetário.

## Resumo

A sinalização pelo cálcio nuclear regula eventos celulares específicos, como transcrição e proliferação celular. Os níveis de cálcio citosólico e nuclear podem ser regulados de forma independente. A translocação de receptores tirosina cinase para o núcleo é uma forma de ativar a via de sinalização de cálcio nesse compartimento. Os receptores desta família, que inclui o receptor para o fator de crescimento epidermal (EGFR), são importantes para processos celulares como a regulação da transcrição, reparo de dano ao DNA e resistência terapêutica ao câncer. Esses receptores podem hidrolisar fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIIns-4,5-P2) no núcleo, levando à liberação de cálcio do retículo nucleoplasmático pelos receptores de inositol-1,4,5-trifosfato (InsP3R). A hidrólise de PIIns-4,5-P2 é mediada por fosfolipases C (PLC); entretanto, não são conhecidas quais isoformas nucleares dessas enzimas são ativadas por EGFR. Neste trabalho, análises de frações subcelulares e de dados de *western blot*, imunofluorescência, silenciamento por siRNA e biossensores que usam transferência de energia por ressonância de Förster (FRET), foram realizadas para investigar o papel da PLC delta 4 (PLC $\delta$ 4) na sinalização de cálcio nuclear e os eventos desencadeados. Observou-se inibição na via de sinalização mediada por cálcio induzida pelo fator de crescimento epidermal (EGF) quando a translocação do EGFR foi bloqueada. O aumento da concentração de cálcio nuclear também foi reduzido pela diminuição da disponibilidade de inositol-1,4,5-trifosfato (InsP3) no núcleo. Além disso, a PLC $\delta$ 4 e não a PLC gama 1 (PLC $\gamma$ 1) foi capaz de induzir hidrólise de PIIns-4,5-P2 intranuclear. Adicionalmente, a proteína cinase C (PKC), um alvo do EGF, foi ativada no núcleo das células após estímulo com EGF. Por fim, PLC $\delta$ 4 e InsP3 também foram capazes de modular a progressão do ciclo celular, regulando a expressão das ciclinas A e B1. Esses resultados evidenciam que a sinalização nuclear induzida por EGF tem como componente a PLC $\delta$ 4 nuclear e sugere novos alvos terapêuticos para modular os efeitos proliferativos desse fator de crescimento.

Palavras chave: EGFR; cálcio; liberação de cálcio nuclear; receptor para o fator de crescimento epidermal; inositol 1,4,5-trifosfato (IP3); núcleo; fosfolipase C; fosfolipase C $\delta$ -4; proliferação; proteína cinase C.

## Abstract

Calcium signaling within the cell nucleus regulates specific cellular events such as gene transcription and cell proliferation. Nuclear and cytosolic calcium levels can be regulated independently and nuclear translocation of receptor tyrosine kinases (TRK) is one way to locally activate signaling cascades within the nucleus. Nuclear RTK, including epidermal growth factor receptor (EGFR), are important for processes such as transcriptional regulation, DNA-damage repair, and cancer therapy resistance. RTK can hydrolyze phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIns-4,5-P2) within the nucleus, leading to calcium release from the nucleoplasmic reticulum by inositol-1,4,5-triphosphate receptors (InsP3). PIns-4,5-P2 hydrolysis is mediated by phospholipase C (PLC). However, it is unknown which nuclear PLC isoform is triggered by EGFR. Here, using subcellular fractionation, immunoblotting, fluorescence, siRNA and FRET-based biosensor reporter assay, we investigated the role of PLC delta 4 (PLC $\delta$ 4) in epidermal growth factor (EGF)-induced nuclear calcium signaling and downstream events. We found that EGF-induced calcium signals are inhibited when nuclear translocation of EGFR is impaired. Nuclear calcium signaling also were reduced by selectively buffering inositol-1,4,5-triphosphate (InsP3) within the nucleus. EGF induced hydrolysis of nuclear PIns-4,5-P2 by the intranuclear PLC $\delta$ 4, rather than PLC gamma 1 (PLC $\gamma$ 1). Moreover, protein kinase C (PKC), a downstream target of EGF, was active in the nucleus of stimulated cells. Furthermore, PLC $\delta$ 4 and InsP3 modulated cell cycle progression by regulating the expression of cyclin A and B1. These results provide evidence that nuclear PLC $\delta$ 4 mediates EGF-induced nuclear signaling and suggest new therapeutic targets to modulate proliferation effects of this growth factor.

Keywords: EGFR; calcium; calcium intracellular release; epidermal growth factor receptor; inositol 1,4,5-triphosphate (IP3); nucleus; phospholipase C; phospholipase C $\delta$ -4; proliferation; protein kinase C (PKC).

## Lista de Figuras

Figura 1 - Formação de dímero de EGFR. _____	15
Figura 2 - Vias de transporte do EGFR para o compartimento nuclear. _____	17
Figura 3 – Sinalização nuclear mediada por cálcio via receptores tirosina cinase. _____	19
Figura 4 - Estrutura esquemática dos domínios das isoformas das PLC. As diferentes apresentações estruturais permitem caracterizar as PLC em distintos subtipos. _____	23
Figura 5 - Organização estrutural das PKC _____	24
Figura 6 - EGF regula cálcio nuclear mediado por PLC delta 4 e PKC não clássicas _____	28
Figura 7 - A redução da expressão de PLC $\delta$ 4 causa parada de ciclo celular e senescência. _____	29
Figura 8 - O EGF induz translocação do EGFR para o núcleo. _____	42
Figura 9 - EGF induz sinalização de cálcio dependente de endocitose mediada por clatrina. _____	42
Figura 10 - O EGF induz a liberação de cálcio por meio da hidrólise de Ins-4,5-P2 no núcleo e geração de InsP3 nuclear. _____	44
Figura 11 - PLC $\delta$ 4 nuclear medeia a hidrólise de Ins-4,5-P2, geração de InsP3 e sinalização de cálcio induzida por EGF. _____	46
Figura 12 - O silenciamento da PLC $\delta$ 4 diminui o crescimento celular e as expressões de ciclina A e B1 sem afetar a morte celular. _____	48
Figura 13 - EGF induz a hidrólise de Ins-4,5-P2, produção de InsP3 local e liberação de cálcio no interior do nucleoplasma que media a proliferação celular. _____	54

## Lista de Tabela

Tabela 1 - Anticorpos utilizados nos ensaios Western Blot _____	34
Tabela 2 - Sequências dos oligonucleotídios utilizados como siRNA _____	36
Tabela 3 - Probabilidade de localização subcelular das PLC humanas anotadas no NCBI _____	74
Tabela 4 - Probabilidade das PLC humanas anotadas no NCBI serem solúveis ou acoplada em membranas. _____	77
Tabela 5 - Tabela de sequências NLS e NES preditas para a PLC delta 4. _____	79

## Lista de Abreviaturas, siglas e símbolos

c-Met	Receptor do fator de crescimento hepático
AKT	Proteína cinase B
ATCC	Coleção de tipo cultura americana
ATRS	Sequência de resposta rica em AT
AURAKA	Aurora cinase A
CDC42	Proteína homóloga da proteína 42 de controle da divisão celular
COPI	Complexo de proteínas de revestimento I de vesículas
CPN	Complexo do poro nuclear
CREB	Proteína ligante a elementos responsivos à adenosina monofosfato cíclico
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DTK	Domínio de tirosina cinase
E2F1	Fator de transcrição 1 do complexo E2F
EGF	Fator de crescimento epidermal
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal
ER	Endossomo de recuperação
ERBb	Proteína cinase semelhante ao gene transformante do vírus para eritroblastose aviária
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular
ET	Endossomo tardio
FcεR1	Receptor Fc épsilon com alta afinidade para IgE
GAP	Proteínas ativadoras de GTPases
GEF	Fatores de troca de guaninas
HER	Receptor do fator de crescimento epidermal humano
HSP70	Proteína de choque térmico de 70 kilodaltons
IGF	Fator de crescimento similar à insulina
IGFR-1	Receptor para o fator de crescimento similar à insulina 1
Ins-3,4,5-P3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
Ins-4,5-P2	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
InsP3	Fosfatidilinositol-1,4,5-trifosfato
InsP3R	Receptor de fosfatidilinositol-1,4,5-trifosfato
JAK	Janus cinase
JNK	Cinase c-Jun amino terminal
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógenos
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
MUC1	Proteína mucina-1

NES	Sequência de exclusão nuclear
NFAT	Fator nuclear de células T ativadas
NLS	Sequência de localização nuclear
NOS	Óxido nítrico sintase
PBS	Tampão fosfato salina
PH	Domínio com homologia Pleckstrin
PIK3	Fosfatidilinositol-3-cinase
PKC	Proteína cinase C
PLC	Proteína fosfolipase C
PSF	Fator de <i>splicing</i> associado à PTB
PTGS2	Prostaglanina-endoperoxidase sintase 2
PVDF	Difluoreto de polivinilideno
RAC	Proteína substrato da toxina botulínica C3 relacionado à Ras
RAG	Proteína ativadora de recombinação gênica
RANKL	Ligante do receptor do ativador do fator nuclear Kappa B
RAS	Proteína semelhante à proteína oncogênica derivada do sarcoma vírus de rato
RE	Retículo endoplasmático
RHO	Proteína com homologia Ras
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SHP-1	Proteína com homologia ao domínio região 2 de Src contendo fosfatase 1
siRNA	Ácido ribonucleico pequeno de interferência
STAT	Proteína transdutora de sinal e ativadora da transcrição
TBS(T)	Tampão tris salina (com triton-X100)
TEAD	Fator acentuador transcricional TEF-1
VE	Vesícula endossomal

## Sumário

Introdução .....	14
Referencial Teórico .....	14
Receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) .....	14
EGFR e EGFR nuclear .....	16
EGFR e a sinalização mediada por cálcio .....	18
Fosfolipases C .....	20
Proteína cinase C e a sinalização nuclear .....	23
Justificativa .....	30
Objetivos .....	31
Objetivo Geral .....	31
Objetivos Específicos .....	31
Materiais e métodos .....	32
Cultura Celular .....	32
Estímulo com EGF .....	32
Fracionamento celular para extração de proteínas .....	32
Western Blot .....	33
Imunofluorescência .....	35
Transfecção do siRNA .....	35
Experimento de observação de cálcio por microscopia .....	35
Tamponamento de InsP3 .....	36
Extração e detecção de PIns-4,5-P2 .....	36
Experimento utilizando a Transferência de Energia Ressonante em Fluorescência (FRET) para detecção de InsP3 nuclear e PKC nuclear .....	37
Ensaio de captação e quantificação de BrdU .....	38
Ensaio de recuperação fenotípica da PLC $\delta$ 4 .....	38
Ensaio de morte celular .....	38
Localização subcelular das PLC humanas .....	39
Análises Estatísticas .....	39
Resultados .....	40
O EGFR transloca para o núcleo em SK-Hep-1 e em hepatócitos de rato após estímulo com EGF .....	40
A translocação do EGFR para o núcleo e a sinalização por cálcio nuclear são dependentes de endocitose mediada por clatrina .....	40
O EGF promove hidrólise de Ins-4,5-P2 nuclear e induz sinalização de cálcio por meio da formação de InsP3 .....	43
A PLC $\delta$ 4 nuclear participa da hidrólise de Ins-4,5-P2, da formação de InsP3 e contribui para a ativação de PKC nucleares por meio da sinalização de cálcio .....	44

A PLC $\delta$ 4 está envolvida na progressão do ciclo celular .....	47
Discussão e Conclusão .....	49
Referências Bibliográficas .....	55
Apêndice .....	73
Apêndice A – Localização subcelular das PLC humanas .....	73
Apêndice B – Predição <i>in silico</i> de NLS e NES na PLC $\delta$ 4.....	78
Apêndice C – Publicação originada deste trabalho .....	82
Anexos.....	114
Anexo A – Publicações em colaboração .....	114
Anexo B - Propriedade Intelectual em colaboração.....	116

## Introdução

O receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) pertence à família ErbB dos receptores tirosina cinase e exerce importantes funções na fisiologia celular, como proliferação e diferenciação celular (Yarden and Sliwkowski 2001). Diversos trabalhos apontaram mutações genéticas nas regiões que codificam o EGFR que levam a sua superexpressão ou à ativação constitutiva em uma variedade de tumores epiteliais (Kamaruddin 1993; Markman et al. 2010; Masuda et al. 2012; Prabhakar 2015). Com essa ativação, verifica-se uma presença constante desse receptor no compartimento nuclear e isso está correlacionado com um pior prognóstico clínico em diferentes tumores (Markman et al. 2010; Brand et al. 2011; Han and Lo 2012). Dessa forma, esses estudos suportam a hipótese de que o EGFR é importante no comportamento dessas patologias. Essas descobertas levantaram a possibilidade de encontrar uma terapia que tenha como alvo o EGFR, de forma a bloquear o seu efeito deletério. Isso foi traduzido no desenvolvimento de anticorpos monoclonais contra o EGFR que são atualmente utilizados no tratamento de diferentes tumores (Nakai et al. 2016; Agustoni et al. 2019). Contudo, múltiplas resistências são observadas e uma das hipóteses para a sua explicação seria a ativação alternativa realizada pelo receptor nuclear (Zhao et al. 2017). Apesar de muito explorado, ainda há muitas perguntas sobre o mecanismo de transdução de sinal pelo EGFR nuclear.

## Referencial Teórico

### Receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR)

O EGFR é uma glicoproteína transmembrana que atua como receptor celular de superfície. Ele consiste em um módulo extracelular com quatro domínios conectado por uma única alfa-hélice transmembrana ao módulo intracelular, que possui um seguimento justamembrana seguido de um domínio tirosina cinase e uma cauda C-terminal com os sítios de fosforilação (Ullrich and Schlessinger 1990; Needham et al. 2016). O EGFR integra a família dos receptores ErbB/HER (Receptor do Fator de Crescimento Epidermal Humano). Essa família de receptores é composta pelas proteínas ErbB1 (HER1 ou EGFR), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) e ErbB4 (HER4). Todos esses receptores com exceção do HER2 apresentam ligantes conhecidos. Os principais ligantes para os receptores dessa família são o fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento ligado à heparina similar ao EGF (HB-EGF), fator de crescimento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ), anfirregulina, beta celulina e epirregulina (Kalyankrishna and Grandis 2006; Faria et al. 2016). A interação desses ligantes com o módulo extracelular do EGFR promove a dimerização desse receptor. Isso pode acontecer entre o mesmo subtipo de receptor dessa família (homodimerização) ou entre subtipos distintos (heterodimerização). O EGFR pode ainda formar heterodímeros com outros receptores da família tirosina cinase, como o receptor do

fator de crescimento hepático (c-MET) ou o receptor para o fator semelhante à insulina (IGFR-1) (Qian et al. 1994; Johannessen et al. 2001; Morgillo et al. 2006; Ortiz-Zapater et al. 2017). A formação de dímeros de EGFR é estruturalmente bem caracterizada. Neste arranjo, os domínios extracelulares apresentam proximidade física com os dois sítios de ligação distais à interface do dímerno, conhecido como dimerização *back-to-back* (Garrett et al. 2002). A dimerização dos domínios extracelulares promove a autofosforilação das caudas C-terminais, como exemplificado na figura 1, e inicia os eventos de sinalização (Zhang et al. 2006). Furuuchi e colaboradores (2007) discutem que o EGFR pode também formar tetrâmeros e essa formação impediria o início da sinalização intracelular (Furuuchi et al. 2007). Entretanto, evidências mais recentes têm demonstrado que oligômeros de EGFR apresentam papel crucial na regulação da sinalização celular e permitem melhor eficiência no acesso do substrato à enzima ativada. Entretanto, o papel fisiológico desse processo ainda precisa ser esclarecido (Clayton et al. 2005; Needham et al. 2016). Essa formação de dímeros e, mais recentemente, de oligômeros, permite a transdução de sinal e ativa vias mediadas por proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK), fosfatidilinositol-3-cinase (PIK3), proteína cinase B (AKT), proteína alvo da rapamicina de mamíferos (mTOR), fosfolipase C (PLC), proteína cinase C (PKC), janus cinase (JAK) e proteína transdutora de sinal e ativadora da transcrição (STAT) (Kalyankrishna and Grandis 2006).

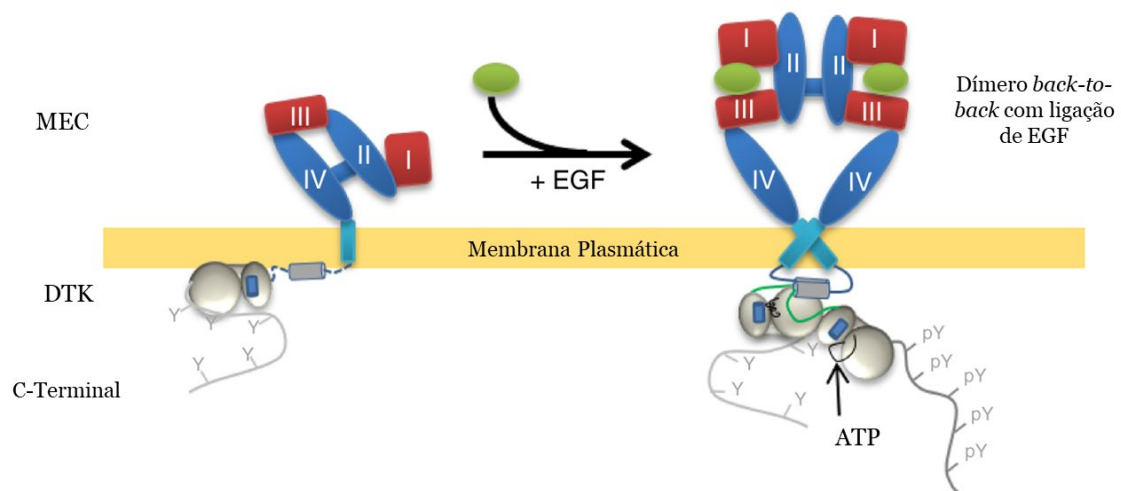


Figura 1 - Formação de dímero de EGFR. O módulo extracelular é composto por quatro domínios (I-IV) e o módulo intracelular é formado por um domínio tirosina cinase (DTK) e uma cauda C-Terminal com resíduos de tirosinas (Y). A interação com o ligante (EGF) promove alteração alostérica nos receptores, fazendo com que o domínio I de um receptor encontre distalmente o mesmo domínio de outro receptor (dimerização *back-to-back*). Isso promove ativação do domínio tirosina cinase que autofosforila resíduos de tirosina na cauda C-terminal (pY) dependente de ATP. MEC = matriz extracelular. Figura adaptada de (Zanetti-Domingues et al. 2018).

## EGFR e EGFR nuclear

Após interação com o ligante, observa-se que o complexo ligante-EGFR se redistribui na membrana plasmática formando agrupamentos que são endocitados por vesículas (Haigler et al. 1979; De Angelis Campos et al. 2011; Faraco et al. 2018). Essa internalização é importante não somente para o controle da sinalização, mas também para o transporte de receptores para outros compartimentos celulares.

Trabalhos pioneiros evidenciaram a presença do EGFR no complexo de Golgi, mitocôndria e núcleo (Marti et al. 1991; Marti and Wells 2000; Demory et al. 2009; Wang et al. 2010a). Os mecanismos exatos de transporte do EGFR para o núcleo não são bem esclarecidos. Lin e colaboradores (2001) relataram que o EGFR é encontrado no núcleo de diferentes tecidos e linhagens celulares e sua maior presença no núcleo é correlacionado com tecidos que apresentam altas taxas proliferativas. De forma inovadora, demonstraram também que o EGFR possui um forte domínio de transativação dependente da sequência consenso rica em AT. Os pesquisadores observaram que essa sequência está presente na região promotora da ciclina D1 sendo, dessa forma, alvo do EGFR que leva ao aumento da sua transcrição.

Giri e colaboradores (2005) constataram que a proteína importina beta1 é necessária para o transporte do ErbB-2 para o núcleo via um sinal de localização nuclear com a participação da proteína Nup358 do complexo do poro nuclear (Giri et al. 2005). Eles propuseram que a endocitose mediada por clatrina, adaptina e dinamina 2 daria início ao transporte do ErbB-2 ao núcleo. Em 2006, Lo e colaboradores confirmaram que o transporte do EGFR é mediado por importinas alfa1 e beta1 e é dependente da presença de um sinal de localização nuclear (Lo et al. 2006). Ainda em 2006, Orth e colaboradores, de forma controversa, declararam que o EGFR pode ser endocitado por mecanismo independente de clatrina e direcionado ao endossomo (Orth et al. 2006).

Então, em 2007, Hsu e Hung demonstraram que as proteínas da família do EGFR apresentam o seu sinal de localização nuclear dividido em três grupos de sequências na região justamembrana (NLS tripartido) e que mutações dirigidas à essas regiões impedem a translocação do EGFR para o núcleo (Hsu and Hung 2007). Também em 2007, Liao e Carpenter verificaram que a proteína Sec61 retrotransloca o receptor do retículo endoplasmático para o citoplasma onde se associa com a proteína de choque térmico HSP70, importante para a estabilização do domínio transmembrana (Liao and Carpenter 2007). Eles propuseram que o complexo citoplasmático do EGFR se liga à importina beta, que permite o transporte do receptor para o núcleo. Wang e colaboradores, em 2010, mostraram que vesículas revestidas com COPI são necessárias para o transporte do EGFR para o núcleo pela via retrógrada do complexo de Golgi para o retículo endoplasmático. Já em 2011, De Angelis Campos e colaboradores confirmaram que o EGFR inicia seu transporte para o núcleo por via dependente de clatrina e dinamina 1 (Wang et al. 2010a; De Angelis Campos et al. 2011).

Wang e colaboradores (2010) propuseram que o EGFR trafega pelo sistema de membranas do retículo endoplasmático com contiguidade à membrana externa do envelope nuclear até encontrar o complexo de poros nucleares, quando é transportado à membrana interna do envelope nuclear, via que foi denominada de INTERNET (*integral trafficking from the ER to the nuclear envelope transport*). Os pesquisadores apresentaram também a participação da Sec61 na translocação do EGFR da membrana interna do envelope nuclear para o nucleoplasma (Wang et al. 2010c). Em 2018, Faraco e colaboradores apontaram a existência de uma possível região subnuclear onde os receptores direcionados ao núcleo se aglomeram e, com isso, especularam uma possível relação da localização com sua função nuclear. Confirmaram também que esse aglomerado de receptores é visível na membrana interna do envelope nuclear (Faraco et al. 2018). A observação da presença do EGFR na membrana interna do envelope nuclear corrobora a hipótese de que o transporte desses receptores pode acontecer via INTERNET (Wang et al. 2010b). A figura 2 resume as possíveis vias teorizadas de transporte do EGFR para o núcleo.

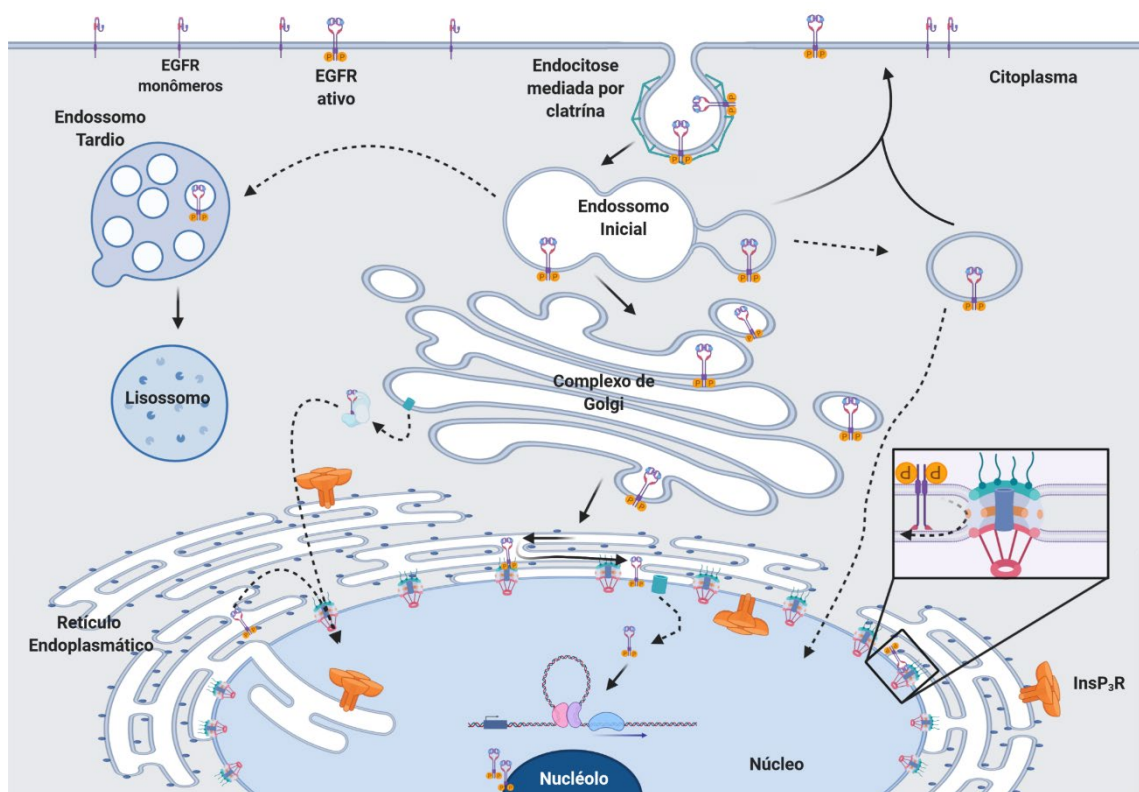


Figura 2 - Vias de transporte do EGFR para o compartimento nuclear. Após interação com o ligante, o receptor pode ser endocitado por vesículas que dependem ou não da mediação por clatrina. As vesículas endossômicas são direcionadas ao endossomo inicial, de onde podem ser redirecionadas ao endossomo tardio (ET). O ET pode se fundir ao lisossomo, causando degradação do receptor ou ser transportado para o núcleo. O endossomo de recuperação pode transportar o receptor novamente à membrana plasmática, onde poderá realizar nova interação com um ligante ou transportar o EGFR para o núcleo. Do endossomo, vesículas contendo o receptor podem ser direcionadas para o complexo de Golgi ou para o núcleo. Do complexo de Golgi, o receptor é direcionado ao retículo endoplasmático onde, por contiguidade às membranas nucleares,

*pode interagir com proteínas do complexo de poro nuclear ou com Sec61-beta e ser direcionado ao núcleo.* (Wang et al. 2010b Adaptado)

Uma vez no núcleo, evidências apontam que a RNA helicase A se associa ao EGFR e esse complexo é capaz de ativar a transcrição de ciclina D1 (Huo et al. 2010). De forma semelhante, a proteína mucina 1 (MUC1) se associa ao EGFR e juntos estimulam a transcrição de ciclina D1 (Bitler et al. 2010). O EGFR nuclear pode funcionar também como coativador da transcrição pela interação com motivos de sequência de resposta rica em AT (ATRS). Essa interação culmina na transcrição dos genes *MYBB*, *NOS2*, *PTGS2* e *AURKA*, por contato direto com os fatores de transcrição E2F1, STAT3 e STAT5 (Lin et al. 2001; Lo et al. 2005, 2010; Hanada et al. 2006; Hung et al. 2008). O EGFR nuclear também está envolvido na geração de resistência terapêutica ao câncer mediado por diferentes mecanismos, como a indução direta da produção de timidilato sintase (Kim et al. 2009; Huang et al. 2011). Chou e colaboradores (2014) elucidaram que esses receptores nucleares fosforilados (Tyr72) recrutam as metiltransferases SET8 e SUV4-20H e promovem mono e dimetilação da lisina 20 da histona 4, necessárias para a síntese e reparo de DNA (Chou et al. 2014). É necessário complementar que várias proteínas nucleares sofrem regulação pela presença de cálcio e existem evidências de que receptores da família tirosina cinase, como o c-MET e o receptor de insulina, estimulam a liberação de cálcio intranuclear (Senatore and Spafford 2008; Gomes et al. 2008; Rodrigues et al. 2008). Ainda assim, embora bem elucidado o papel do EGFR nas vias citoplasmáticas, nenhum grupo, até o nosso conhecimento, apresentou evidências que o EGFR no núcleo é capaz de mediar sinalização nuclear dependente de cálcio.

## EGFR e a sinalização mediada por cálcio

A ativação do EGFR induz aumento transiente na concentração de cálcio e esse fenômeno é precedido pelo aumento na concentração de cálcio nuclear livre (Pandiella et al. 1988; Elliget et al. 1996). Tais aumentos nas concentrações de cálcio induzidos por EGFR ocorrem devido à liberação de cálcio de compartimentos intracelulares e ao influxo de cálcio extracelular (Tinhofer et al. 1996). É importante acrescentar que a origem desse cálcio medeia diferentes tipos de sinalização como, por exemplo, a inibição da sinalização EGFR-RAS pelo influxo de cálcio extracelular (Medema et al. 1994). O EGFR ativa a fosfolipase C gama (PLC gama) que permite o aumento da concentração de cálcio livre, sendo esse o principal mecanismo já descrito para esse receptor (Vega et al. 1992). A PLC gama é fosforilada ao se ligar à tirosina fosforilada (Tyr992) do EGFR ativado via seu domínio SH2 (Vega et al. 1992). Uma vez ativada, essa fosfolipase hidrolisa o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PI(4,5)P<sub>2</sub>) em inositol-1,4,5-trifosfato (InsP<sub>3</sub>) e 1,2-diacilglicerol (DAG). O InsP<sub>3</sub> atua no retículo endoplasmático, nos receptores para InsP<sub>3</sub> (InsP<sub>3</sub>R), causando a liberação de cálcio do lúmen dessa organela para o citosol (Mikoshiba 1993). Esse aumento da concentração citoplasmática de cálcio auxilia o DAG a ativar inúmeras isoformas das proteínas cinases C (PKC) (Newton 1995; Li et al. 2011a). A PKC, por

sua vez, pode ativar as vias de ERK1/2, c-JUN, NF-kappa-B, STAT e mTOR, estimulando a transcrição e, conseqüentemente, promovendo diferentes efeitos celulares. Adicionalmente, os InsP3R são encontrados nas membranas nuclear externa e interna e o seu estímulo pode ser responsável por aumentar as concentrações de cálcio nesse compartimento (Stehno-Bittel et al. 1995; Subramanian and Meyer 1997; Malhas et al. 2011). Dessa forma, é hipotetizado que o InsP3 gerado no citoplasma é capaz de alcançar o compartimento nuclear ou pode ser também gerado diretamente na membrana interna do envelope nuclear e, assim, sensibilizar InsP3R ali presentes. Martelli e colaboradores (1992) acrescentam ainda que PLC nucleares são ativadas pelo receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGFR-1), com geração de InsP3 e DAG, que precede a indução da translocação de PKC citoplasmática para o núcleo (Martelli et al. 1992). Contudo, não foi ainda elucidado se a ativação da PLC nuclear pode acontecer por meio de EGFR translocado para o núcleo. A figura 3 apresenta as possíveis vias de sinalização nuclear mediadas por cálcio após ativação de receptores tirosina cinase.

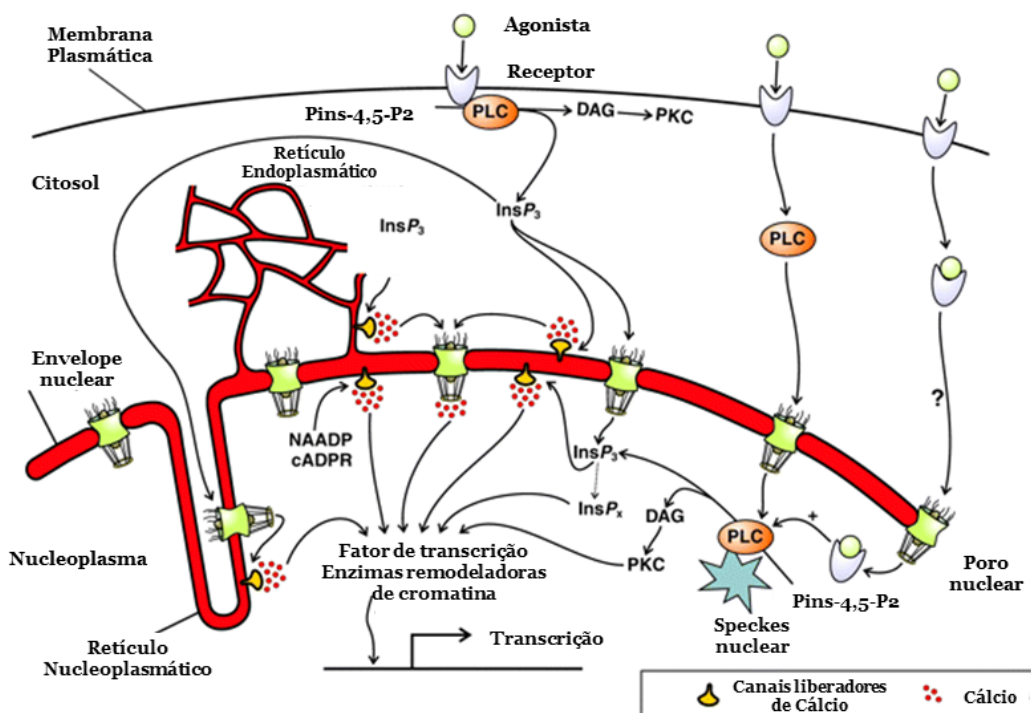


Figura 3 – Sinalização nuclear mediada por cálcio via receptores tirosina cinase. A interação dos agonistas dos receptores do tipo tirosina cinase causa transativação desses receptores, possibilitando a interação da PLC, a qual hidrolisa PIns-4,5-P2 em PIns-1,4,5-P3 (InsP<sub>3</sub>) e DAG. InsP<sub>3</sub> ativa canais nos compartimentos de estoque, como retículo endoplasmático e nucleoplasmático, promovendo a liberação de íons cálcio. O aumento na concentração de cálcio citoplasmático, juntamente com o DAG, ativa PKC, que medeia a ativação de vias geradoras de modificações celulares. Receptores tirosina cinase podem ser translocados para o núcleo, onde poderiam ativar PLC nucleares, gerando InsP<sub>3</sub> e, conseqüentemente, cálcio, além de ativar PKC transportadas para o núcleo. O aumento da concentração de cálcio nuclear permite a ação de fatores de transcrição e de enzimas modificadoras de cromatina e ativa a transcrição. Adaptado de Bootman e colaboradores (2009) (Bootman et al. 2009).

## Fosfolipases C

Em mamíferos, foram descritas treze isoformas de fosfolipases C (PLC) que estão distribuídas em seis grandes grupos baseados nos mecanismos regulatórios da sua ativação e na sua estrutura (Rebecchi and Pentylala 2000; Kadamur and Ross 2013). Aparentemente, as PLC apresentam um mecanismo comum de regulação, onde uma sequência polipeptídica de carga negativa é inserida no sítio catalítico das enzimas, impedindo a sua função. Uma vez a ativação enzimática ocorre, essa sequência é deslocada do sítio catalítico, o que alivia a autoinibição (Hicks et al. 2008). Entretanto, diferentes isoformas apresentam mecanismos secundários de regulação (Bunney and Katan 2011). Estruturalmente, as PLC apresentam um sítio catalítico conservado, localizado em um domínio TIM em barril (X e Y). Apresentam também um domínio de homologia Pleckstrin (PH, exceto a isozima zeta), um domínio EF e um motivo C2 (figura 4) (Rebecchi and Pentylala 2000). O domínio PH permite que as PLC sejam direcionadas aos lipídeos de membrana. O domínio EF junto ao X/Y e C2 formam o núcleo catalítico dessas enzimas. O domínio EF pode sofrer modificações estruturais em presença de cálcio o que permite a completa ativação da enzima. Por sua vez, o domínio C2 apresenta afinidade ao íon cálcio, permitindo a regulação positiva ou negativa da atividade enzimática, dependendo da concentração iônica. Dessa forma, foi possível dividir as PLC em Beta ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ ), Gama ( $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ), Delta ( $\delta 1$ ,  $\delta 3$ ,  $\delta 4$ ), Épsilon ( $\epsilon$ ), Zeta ( $\zeta$ ) e Éta ( $\eta 1$  e  $\eta 2$ ).

Das quatro isoformas da PLC beta, as  $\beta 1$  e  $\beta 3$  são expressas em inúmeros tecidos, enquanto as  $\beta 2$  e  $\beta 4$  estão em sua maioria em tecido hematopoiético e neuronal, respectivamente. As isoformas beta apresentam a capacidade de funcionar como ativadores de proteínas GTPase (GAP) (Lyon and Tesmer 2013). Essas enzimas são ativadas pelas proteínas G $\alpha_q$ , G $\beta\gamma$  e pequenas GTPases da família Rho, como Rac e Cdc42 (Lyon and Tesmer 2013). Diversas funções fisiológicas são atribuídas às isoformas beta. A PLC $\beta 3$  é necessária para a ativação de mastócitos, mediada por FC $\epsilon$ RI, formando um complexo com as proteínas Lyn e SHP-1 e, dessa forma, impedindo que Lyn regule negativamente a ativação desse receptor (Xiao et al. 2011). Essa mesma isoforma é também capaz de inativar a hiperativação de STAT5 por meio da formação de um complexo STAT5-SHP-1-PLC $\beta 3$ . A redução da expressão de  $\beta 3$  leva ao aumento da proliferação de mastócitos, ocasionando reações semelhantes à dermatite atópica (Ando et al. 2014). A isoforma  $\beta 1$  está presente tanto no compartimento citoplasmático quanto no nuclear. Quando no citoplasma, ela está associada à membrana plasmática. No núcleo, apresenta papel no crescimento e diferenciação celular, levando à manifestação de síndromes mielodisplásicas (Cocco et al. 2011; Mongiorgi et al. 2012). A isoforma  $\beta 2$  está envolvida na regulação da função de neutrófilos e quando ela não é expressa nota-se um aumento na produção de superóxidos e liberação de quimioatrativos induzidos por cálcio (Jiang et al. 1997; Li et al. 2000).

As PLC gama apresentam duas isoformas das quais a  $\gamma 1$  é ubiquamente expressa e a  $\gamma 2$  é, na maior parte, expressa em tecido hematopoiético. As PLC gama interagem com resíduos fosforilados nos

receptores tirosina cinase utilizando o domínio SH2 (Kim et al. 1991). A isoforma  $\gamma_2$ , mas não  $\gamma_1$ , pode interagir com a proteína Rac por meio do domínio PH, levando a sua ativação na membrana plasmática (Piechulek et al. 2005). Assim, a PLC gama apresenta grande importância fisiológica. A sua perda leva a defeitos na formação de vasos e de células hematopoiéticas (Liao et al. 2002). Camundongos deficientes nessa enzima morrem em estágio embrionário (Ji et al. 1997). A isoforma  $\gamma_1$  está envolvida na sinalização de células T e alteração na sua expressão foi relacionada à deficiência na geração de células T regulatórias (Fu et al. 2010). Camundongos deficientes em PLC $\gamma_2$  apresentam irregularidades na maturação de células B e falhas na sinalização mediada por receptor ativador da ligação do fator nuclear kappa-B (RANKL), ocasionando erros durante a diferenciação de osteoblasto e a organogênese de linfonodos (Chen et al. 2008). É importante mencionar que ambas as isoformas de PLC gama são ativadas por PIns-3,4,5-P3, o que pode acontecer de forma independente da ativação de receptores de tirosina cinase (Bae et al. 1998).

Foram descritas três isoformas para PLC delta, distribuídas por todos os tecidos. Os domínios PH da PLC delta, em especial a PLC $\delta_1$ , apresentam alta afinidade por PIns-4,5-P2. A afinidade dessas enzimas ao fosfoinosítido leva a sua translocação para a membrana plasmática e subsequente ativação (Lemmon et al. 1997). É importante apontar que essa isoforma é sensível ao cálcio que, em baixas concentrações, leva à translocação das enzimas para a membrana plasmática e à sua ativação (Allen et al. 1997; Lomasney et al. 1999). As PLC delta estão diferencialmente distribuídas no citoplasma e núcleo, o que tem sido relacionado à regulação do ciclo celular. Liu e colaboradores (1996) demonstraram que a PLC $\delta_4$  é uma proteína com grande expressão nuclear e que regula a transição entre as fases G1-S do ciclo celular (Liu et al. 1996). De forma semelhante, Kunhath-lima e colaboradores (2018) confirmaram que essa enzima é expressa no núcleo e que a redução da sua expressão em células-tronco derivadas de tecido adiposo promove diminuição da proliferação celular, com aumento de células na fase G1 do ciclo, e senescência celular, com aumento da transcrição para p16<sup>INK4A</sup> e p21<sup>CIP1</sup> (Kunrath-Lima et al. 2018). De forma pioneira, Stallings e colaboradores (2005) demonstraram que a PLC $\delta_1$  é capaz de ser translocada para o núcleo, de mediar a sinalização dependente de cálcio e, ao término do sinal, ser devolvida à membrana plasmática com auxílio de exportinas (Stallings et al. 2005). Fukami e colaboradores (2001) demonstraram que animais deficientes em PLC $\delta_4$  apresentam redução na fertilização, devido ao impedimento do aumento da concentração de cálcio celular, sendo essa enzima importante na reação acrossomal (Fukami et al. 2001). Por sua vez, a perda simultânea das PLC $\delta_1$  e  $\delta_3$  levam ao aumento de trofoblastos em apoptose e à alteração vascular na placenta (Nakamura et al. 2005). Cardiomiócitos com duplo *knockout* de  $\delta_1/3$  apresentam impedimento na sinalização via AKT e PKC $\theta$ , importantes para a sobrevivência celular (Nakamura et al. 2014). A perda de  $\delta_1$  também está associada às falhas na diferenciação de queratinócitos e animais com essa deficiência apresentam estrutura anormal dos folículos capilares (Nakamura et al. 2008). De forma semelhante, pessoas com desordens na formação das unhas apresentam mutações em PLC $\delta_1$  (Kiuru et al. 2011). Kanemaru e

colaboradores (2012) mostraram que a falta de PLC $\delta$ 1 também está envolvida com o aumento da inflamação cutânea, com granulocitose e elevação de interleucina-17, gerando o fenótipo semelhante a psoríase em animais (Kanemaru et al. 2012).

A PLC $\epsilon$  apresenta somente um representante e tem maior expressão no tecido cardíaco. Ela apresenta um domínio homólogo ao CDC25 capaz de se ligar a Ras e Rap, promovendo a ativação da PLC (Smrcka et al. 2012). A ativação da PLC $\epsilon$  por essas GTPases leva a diferentes localizações celulares; Ras induz a ativação da enzima na membrana plasmática, enquanto Rap induz a uma formação perinuclear. O fator trocador de guanina (GEF), RhoA, também se liga à PLC $\epsilon$ , resultando na sua ativação (Seifert et al. 2004). Devido à sua elevada expressão no coração, foi demonstrando que essa PLC tem participação na formação de hipertrofia cardíaca (Zhang et al. 2013). A sua superexpressão é também ligada a produção de citocinas inflamatórias com geração de dermatite com acantose (Takenaka et al. 2011).

O subtipo PLC $\zeta$  está restrito aos espermatozoides, não apresenta domínio PH e é sensível a baixas alterações na concentração de cálcio (Saunders et al. 2002). Em humanos, espermatozoides sem expressão dessa enzima são incapazes de fertilizar oócitos, mesmo com injeção intracitoplasmática (Yoon et al. 2008).

Finalmente, a PLC $\eta$  apresenta duas isoformas altamente expressas no cérebro que são sensíveis ao cálcio e cuja ativação parece estar ligada ao aumento intracelular desse íon (Stewart et al. 2005; Kim et al. 2011; Popovics et al. 2011). O papel fisiológico dessas enzimas ainda não é bem esclarecido. Kanemaru e colaboradores (2010) produziram animais deficientes em PLC $\eta$ 2 e nenhum fenótipo claro foi observado (Kanemaru et al. 2010). Os pesquisadores creditam o achado a um possível efeito compensatório da PLC $\eta$ 1 e levantam a necessidade da formação de duplo *knockout* para a compreensão dessas enzimas no contexto fisiológico.

Por meio do exposto é possível concluir que, apesar de ainda muito pouco explorado, as evidências existentes apontam que as PLC $\beta$ 1 e PLC $\delta$ 4 estão presentes nos núcleos das células e são capazes de dar continuidade a uma sinalização celular nesse compartimento. Nesse contexto, ambas são atrativas na possível sinalização mediada pela via nuclear do EGFR.

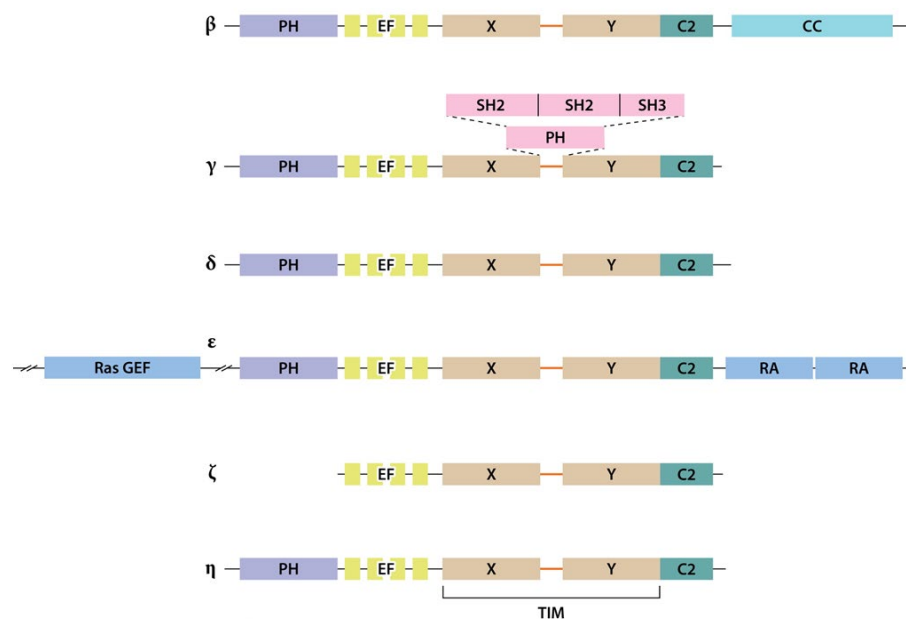


Figura 4 - Estrutura esquemática dos domínios das isoformas das PLC. As diferentes apresentações estruturais permitem caracterizar as PLC em distintos subtipos. Os domínios estão abreviados como: PH – homologia pleckstrin, EF – mão EF, CC – domínio coiled-coil, SH2/SH3 – homologia Src 2 e 3, RA – associação com Ras, Ras GEF – fator Ras trocador de GTP/GDP, X-Y – terminos N- e C- do motivo barril TIM. (Kadamur and Ross 2013)

## Proteína cinase C e a sinalização nuclear

A fosfocinase C, proteína cinase C ou PKC é um grupo de enzimas inseridas na família serina/treonina fosfotransferases e apresenta papel central em diversos processos celulares, como proliferação, diferenciação e tumorigênese (Dempsey et al. 2000). Atualmente, onze isoformas foram identificadas em mamíferos. Elas foram, então, divididas em três subgrupos que apresentam o mesmo fosfolípide como ativador, mas se diferenciam em estrutura e na necessidade de outros ativadores (Hug and Sarre 1993).

As PKC clássicas são dependentes de cálcio e lipídeos (fosfatidilserina e diacilglicerol ou forbol éster) e são divididas nos subtipos alfa, betaI, betaII e gama (Hug and Sarre 1993). As novas PKC, apesar de dependerem dos mesmos lipídeos para a sua ativação, são independentes da presença de cálcio. Essas foram subdivididas em delta, épsilon, éta, teta e mi ou proteína cinase D. Já as PKC atípicas independem de fosfatidilserina, lipídeos inositol, ácido fosfatídico ou íons cálcio para a sua ativação (Dempsey et al. 2000). Elas foram divididas em zeta, iota e lambda.

As PKC apresentam regiões conservadas (C1-C4) que são interrompidas por regiões variáveis (V1-V5). Possuem ainda dois módulos de direcionamento à membrana (C1 e C2) e uma região amino terminal que contém uma porção autoinibitória (Hug and Sarre 1993). Na região carboxila terminal há um domínio catalítico que contém a região C3, ligante de ATP, e a região C4, com a região catalítica. Nas PKC clássicas, a região C2 confere a dependência de cálcio, não estando presente nas PKC cálcio

independentes (novas e atípicas). O domínio C1 apresenta um sítio ligante de éster forbol com dois subdomínios ligantes de zinco e que são ricos em cisteínas. As PKC atípicas não apresentam um desses subdomínios e, dessa forma, não são ativadas por éster forbol (figura 5) (Hug and Sarre 1993).

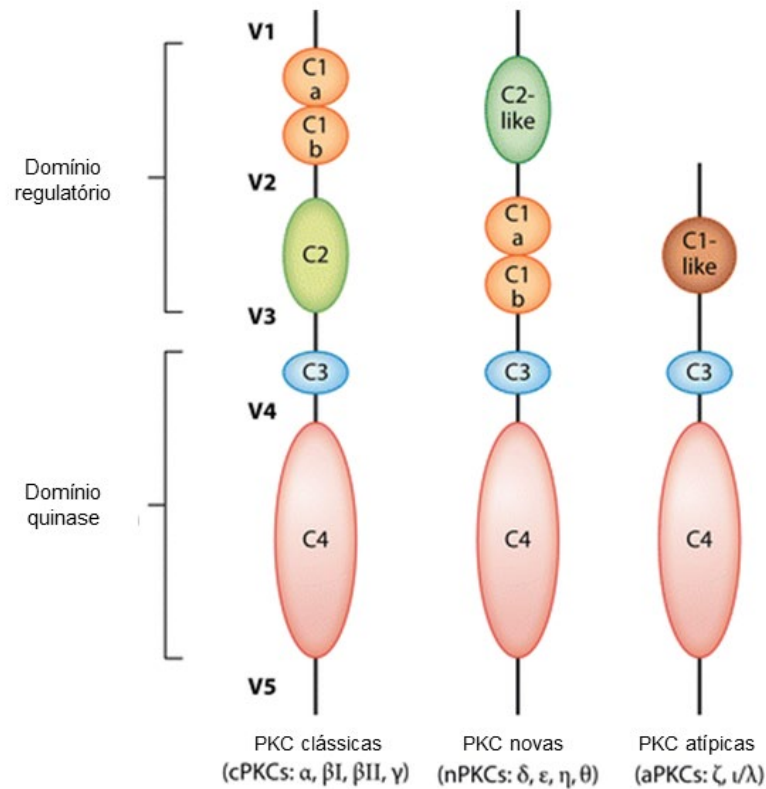


Figura 5 - Organização estrutural das PKC. As PKC foram divididas em clássicas, novas e atípicas. As clássicas ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ) apresentam cinco regiões variáveis (V1, V2, V3, V4, V5) e quatro conservadas (C1 – a/b –, C2, C3, C4). As novas ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ) se diferenciam pela substituição da uma região C2 por uma semelhante (C2-like), localizada antes de C1. Já nas atípicas ( $\zeta$ ,  $\iota$ ,  $\lambda$ ) as regiões C1 e C2 não estão presentes e apresentam uma região semelhante à C1 (C1-like). Apresentam em comum o domínio cinase (C3-V4-C4-V5) e os domínios regulatórios se diferenciam devido às alterações descritas anteriormente. Figura adaptada de Altman e Kong (2016) (Altman and Kong 2016).

É bem conhecido que as PKC exercem a sua atividade no citoplasma e na membrana plasmática. A PKC inativa encontra-se associada ao citoesqueleto e após a fosforilação ela é recrutada às membranas plasmática e das organelas, local onde será completamente ativada na presença de cofatores (Newton 2001). Contudo, é importante ressaltar que várias isoformas de PKC foram encontradas no núcleo sob condições específicas, seja como consequência da translocação a partir citoplasma ou como proteína nuclear (Martelli et al. 1999). Reforçando a hipótese da translocação dessas enzimas para o núcleo, Divecha, Banfic e Irvini demonstraram que a ativação de IGF leva ao aumento da concentração de segundos mensageiros (DAG) com possível translocação de PKC $\alpha$  para o núcleo (Divecha et al. 1991).

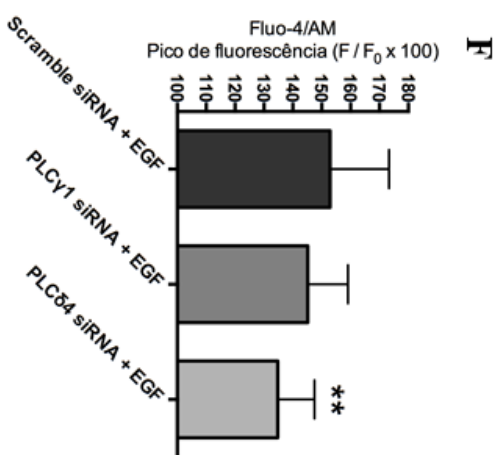
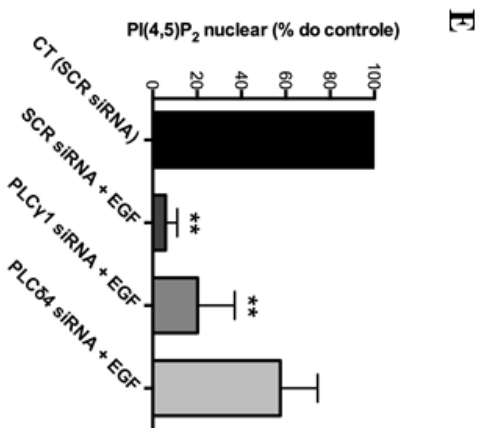
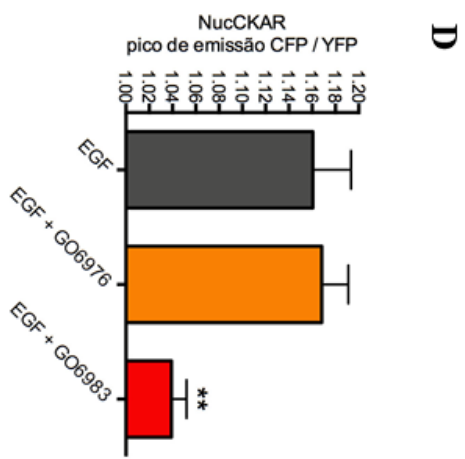
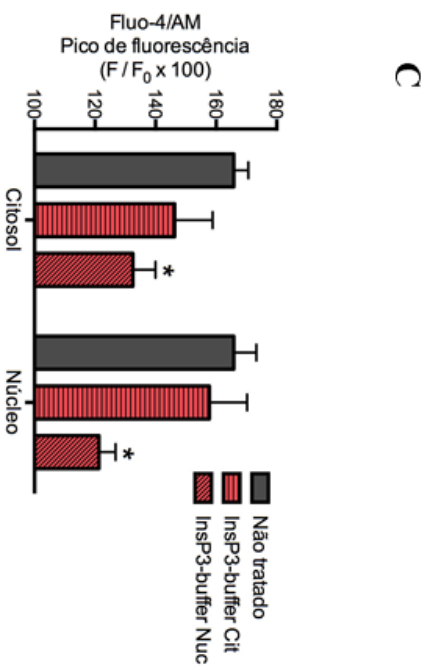
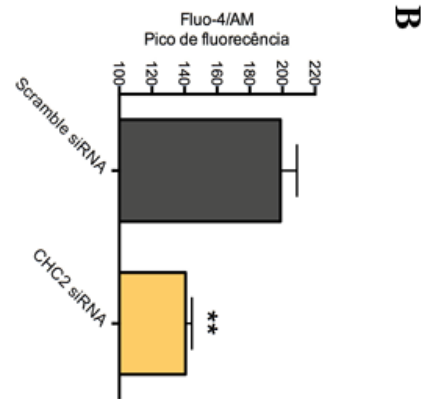
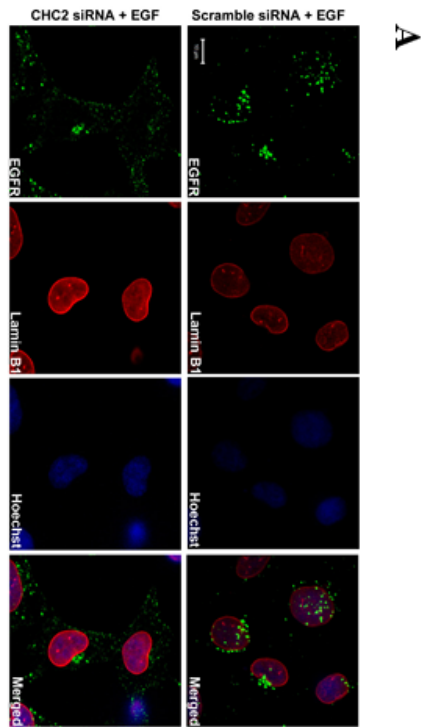
De forma semelhante, Deacon e colaboradores (2002) mostraram que a PKC $\beta$ II é translocada para o núcleo após indução mitótica (Deacon et al. 2002). Neri e colaboradores (1999) demonstraram que não apenas as PKC clássicas são translocadas para o núcleo. Esses pesquisadores, ao estimularem linhagem celular de carcinoma de próstata com fator de crescimento para nervo, demonstraram que a PKC $\zeta$  era direcionada ao núcleo de maneira dependente de fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) (NERI et al. 1999). De forma semelhante, em hepatócitos de ratos tratados com C2-ceramida, a isoforma zeta também é translocada ao núcleo mediada por PI3K (Calcerrada et al. 2002). Já Sutcliffe e colaboradores (2011) observaram que a PKC $\theta$  pode ser encontrada residente no núcleo e regula a expressão de micro RNA pela formação de complexo com a RNA polimerase II, com a cinase de histona MSK-I e com a molécula adaptadora 14-3-3 $\zeta$  (Sutcliffe et al. 2011).

O reconhecimento das PCK no núcleo levou diferentes grupos à tentativa de identificar os alvos e proteínas acessórias nesse compartimento. Em 2002, Tabellini e Martelli, com seus respectivos colaboradores, demonstraram que a PKC $\alpha$  nuclear é capaz de se ligar e modificar as proteínas laminina A/C e B (Martelli et al. 2002; Tabellini et al. 2002). No mesmo ano, Rosenberger e colaboradores relataram que a isoforma alfa nuclear se liga também ao fator de *splicing* associado à PTB (PSF), à RNA helicase p68 e às ribonucleoproteínas nucleares heterólogas A3 e L, demonstrando a função dessa proteína no processamento de RNA (Rosenberger et al. 2002). De maneira análoga, foi atribuída à PKC $\epsilon$  o envolvimento na transcrição e no processamento de RNA pelo grupos de Xu, Rumsby e Zhao e colaboradores (Xu and Rumsby 2004; Zhao et al. 2004). As PKC nucleares foram também identificadas como participantes na replicação celular, expressão gênica e modificação da estrutura de cromatina (Sahyoun et al. 1986; Pommier et al. 1990; Abate et al. 1991; Bauer et al. 1992; Zhou et al. 1997; Xiao et al. 2000; Huang et al. 2004).

Com o exposto acima, hipotetizamos que o EGFR nuclear poderia gerar sinalização mediada por PLC/PKC. Assim, uma busca por PLC nucleares foi realizada, onde confirmou-se a presença da PLC $\delta$ 4 como uma proteína nuclear (De Angelis Campos and Gomes 2014; Kunrath-Lima et al. 2018). Dessa forma, nós restringimos a compreensão da possível participação de PLC $\delta$ 4 na sinalização nuclear mediado por EGFR. Para isso, foi utilizada como modelo a linhagem celular SK-Hep-1, célula isolada de líquido ascítico de paciente diagnosticado com adenocarcinoma hepático. Essa célula foi originalmente classificada como de origem endotelial (Heffelfinger et al. 1992); entretanto, evidências recentes apontam uma provável característica de célula-tronco mesenquimal após transformação maligna (Eun et al. 2014; Faraco et al. 2018). Nos nossos estudos, essa linhagem apresenta expressão elevada de EGFR com notória translocação nuclear após estímulo com EGF, facilitando, dessa forma, a visualização dos efeitos mediados por esse receptor (Faraco et al. 2018).

Estudos preliminares conduzidos por Ana Carolina de Angelis Campos e pelo Professor Dawidson Gomes (dados não publicados) deram início à compreensão do efeito da translocação do

EGFR na sinalização nuclear. De Angelis Campos e colaboradores (2014) demonstraram que a translocação do EGFR para o núcleo depende de endocitose mediada por clatrina (Figura 6a). Além disso, dados preliminares demonstraram que a redução da expressão de PLC $\delta$ 4 promove uma diminuição da liberação de cálcio no compartimento nuclear em decorrência da redução de sinalização do EGFR nesse compartimento (Figura 6). Com o bloqueio funcional de InsP3 nuclear, o que não acontece no citosol, foram capazes de identificar a redução da sinalização de cálcio nuclear, após estímulo com EGF. Além disso, bloqueando a função de PKC de amplo espectro, demonstraram a redução da atividade de PKC nuclear não clássica. Finalmente, observaram que a PLC $\delta$ 4 está envolvida na formação de InsP3 e no aumento da concentração de cálcio (Figura 6) (De Angelis Campos and Gomes 2014).



*Figura 6 - EGF regula cálcio nuclear mediado por PLC delta 4 e PKC não clássicas. A – O silenciamento, com a utilização de siRNA, da clatrina reduz a translocação de EGFR para o núcleo. Verde EGF-Alexa 488; vermelho- lâmina B1; azul- DNA. B – O silenciamento da clatrina reduz o estímulo de cálcio mediado por EGFR. C – O bloqueio funcional de InsP3 nuclear, mas não do citosólico, reduz a indução de cálcio mediante estímulo com EGF. D – A inibição de PKC de amplo espectro, mas não das PKC clássicas, reduz a atividade enzimática após estímulo com EGF. E – O silenciamento da PLCδ4 reduz a utilização de PI(4,5)P2 no núcleo após estímulo com EGF. F – A indução de cálcio mediada por EGF/EGFR é reduzida após silenciamento de PLCδ4. (De Angelis Campos and Gomes 2014)*

Trabalhando com a mesma isoforma de PLC, Kunrath-Lima e colaboradores (2018) demonstraram que, em células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo, a redução da expressão dessa PLC ocasionava a indução de senescência, com parada do ciclo celular em G1, redução da captação de análogos de timina e aumento da transcrição de genes para p21 e p16 (Figura 7) (Kunrath-Lima et al. 2018). Assim, nós postulamos que a sinalização de EGF/EGFR promove a translocação nuclear mediada por vesículas dependentes de clatrina e, no núcleo, o EGFR sinaliza via PLCδ4/PKC não clássicas, levando à formação de InsP3 nuclear e ao aumento da concentração de cálcio, possibilitando a continuidade da sinalização para progressão do ciclo celular.

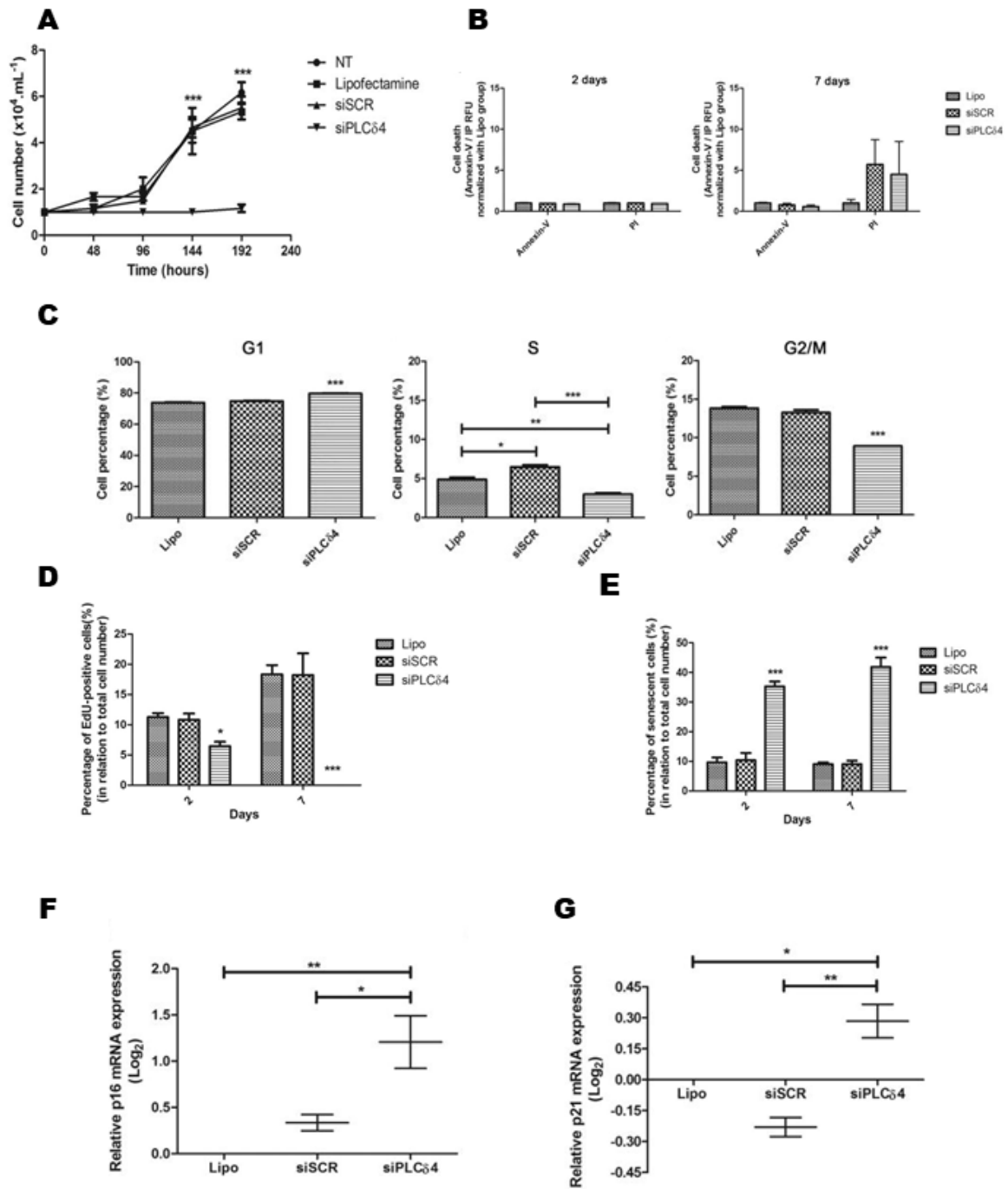


Figura 7 - A redução da expressão de PLC $\delta 4$  causa parada de ciclo celular e senescência. A – A curva de crescimento mostra que o silenciamento da PLC causa redução do número de células quando comparado aos demais grupos. B – A análise de morte mostra que o silenciamento da PLC não leva à redução de viabilidade comparado às células transfectadas. C – A análise de ciclo celular mostra aumento em fase G1 com redução de fase S e G2/M. D – A captação de EdU é reduzida nas células com baixa expressão de PLCdelta4. E – Aumento do número de células em senescência é observado naquelas PLCdelta4 silenciadas. F-G – Aumento da expressão do transcrito para p16 e p21 em células PLCdelta4 deficientes. Adaptado de Kunrath-Lima e colaboradores (Kunrath-Lima et al. 2018).

## Justificativa

O câncer é um conjunto de doenças que apresenta em comum um grande índice de mortalidade e morbidade. Somente no Brasil foi estimado, aproximadamente, 600 mil novos casos para 2019 (Instituto Nacional de Câncer and Ministério da Saúde 2019). Em 2017, cerca de 219 mil pessoas vieram a óbito como consequência da doença (Instituto Nacional de Câncer and Ministério da Saúde 2019). Isso acarreta grande gasto público, perda de força de trabalho e estigma social.

Atualmente, evidências mostram que em diferentes tumores malignos o EGFR apresenta modificações que permitem mediar a sinalização com baixa ou nenhuma participação dos ligantes ou apresenta aumento de expressão capaz de sensibilizar um grande número de receptores (Seshacharyulu et al. 2012). Terapias direcionadas ao tratamento do câncer envolvendo bloqueio da sinalização citoplasmática de EGFR têm apresentado casos de resistência (Zhao et al. 2017). Uma explicação para esse efeito é a mediação da sinalização via receptores nucleares. Isso levou à identificação de EGFR nucleares e sua correlação a um pior prognóstico clínico (Traynor et al. 2013; Brand et al. 2013). Dessa forma, esse trabalho se propôs a iniciar a elucidação dos mecanismos pelo qual o EGFR é capaz de manter a sinalização nuclear, assim como compreender os efeitos dessa sinalização. O entendimento aprofundado dos mecanismos de sinalização do EGFR nuclear pode permitir, em um futuro, a formulação de bloqueadores específicos de forma a facilitar a terapia com EGFR nuclear contra os tumores.

# Objetivos

## Objetivo Geral

Compreender a ação da fosfolipase C delta 4 na proliferação celular via sinalização nuclear mediada por EGF/EGFR.

## Objetivos Específicos

- 1 – Demonstrar a capacidade de translocação do EGFR para o núcleo em células SK-Hep-1 e em hepatócitos isolados de ratos após estímulo com EGF.
- 2 – Confirmar a dependência de clatrina na translocação de EGFR para o núcleo para a continuidade da sinalização celular em células SK-Hep-1.
- 3 – Avaliar a participação do EGFR e da PLC $\delta$ 4 na utilização de Ins-4,5-P2 no compartimento nuclear em células SK-Hep-1.
- 4 – Observar a capacidade do EGFR e PLC $\delta$ 4 em promover sinalização via a geração de InsP3 e de cálcio nuclear em células SK-Hep-1.
- 5 – Avaliar a ativação de PKC nuclear, após estímulo de EGFR por EGF, e de PLC $\delta$ 4 em células SK-Hep-1.
- 6 – Avaliar o envolvimento da PLC $\delta$ 4 na sinalização de promoção do ciclo celular em células SK-Hep-1.

# Materiais e métodos

## Cultura Celular

As células SK-Hep-1 foram adquiridas na *American Type Culture Collection* (ATCC) e mantidas em meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Life Technologies), contendo 10% soro fetal bovino (Life Technologies), 1 mM de piruvato de sódio (Life Technologies), 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Life Technologies), aqui denominado de DMEM para simplificação. As células foram mantidas em estufa úmida a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub> (ThermoFisher) em garrafas para cultura celular T75 (USA Scientific). As subculturas foram realizadas quando a confluência celular atingia 80%. Para isso, as garrafas foram lavadas duas vezes com tampão fosfato salino na concentração de 10 mM, pH=7,4 (PBS) (Gibco) e adicionado tripsina-EDTA 0,25% (Gibco) que permanecia por 5 minutos para o desprendimento das células. Centrifugou-se as células por 5 min para remoção da tripsina e posteriormente, adiciona-se DMEM e as células eram transferidas para o novo recipiente de cultura.

Os hepatócitos foram isolados de ratos adultos Sprague Dawley saudáveis, pesando entre 190 e 200 g. Os animais foram adquiridos no laboratório Charles River e mantido em ambiente controlado, sob a supervisão de um técnico e um médico veterinário. Esse estudo obteve a aprovação do comitê de ética para uso e manejo de animais da Universidade de Yale (protocolo número 2018-07602). As células foram extraídas dos fígados após a dissecação da árvore biliar e tratamento enzimático do parênquima com colagenase 0,05% (Life Technologies) (Boyer et al. 1990). Essas células foram mantidas em meio E de William (Life Technologies), contendo 10% de soro fetal bovino, 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Life Technologies), em lamínulas tratadas com colágeno na concentração de 50 µg/mL (BD Biosciences). Os hepatócitos foram utilizados dentro de 24 horas após a extração para garantir que as suas propriedades morfológicas e funcionais não fossem perdidas.

## Estímulo com EGF

As células SK-HEP-1 e os hepatócitos foram privados de soro por 14-16 horas, quando então eram adicionados 100 ng/mL de EGF humano recombinante (Life Technologies) ou a mesma concentração de EGF recombinante de rato (R&D Systems) (De Angelis Campos et al. 2011; Faria et al. 2016). As células foram mantidas em estufa úmida a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> até o momento da sua utilização.

## Fracionamento celular para extração de proteínas

As células foram lavadas com PBS, raspadas e lisadas em tampão contendo 20 mM de ácido etanosulfônico 4-(2-hidroxietilenoil)-1-piperazino pH=7,0, 10 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub> e 0,5% Nonidet P-

40. Foi realizada uma incubação de 10 minutos em gelo, seguida de centrifugação a  $1.500 \times g$  por 5 minutos para a separação da fração nuclear. O sobrenadante contendo a fração não nuclear foi recuperado e centrifugado a  $16.100 \times g$  por 20 minutos e o novo sobrenadante foi recolhido para uso. O precipitado formado na fração nuclear foi lavado três vezes com tampão de lise para remover qualquer vestígio de proteínas não nucleares. Em seguida, foi adicionado tampão NETN (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH=8 e 0,5% Nonidet P40) e a mistura foi sonicada. Os lisados contendo as proteínas nucleares foram centrifugados a  $16.100 \times g$  por 20 minutos e o sobrenadante foi recuperado para utilização (Gomes et al. 2008). As proteínas totais foram extraídas após lavagem com PBS e raspagem com tampão NETN. Após 1 minuto no *vórtex*, a mistura foi sonicada e mantida em gelo por 10 minutos. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a  $16.100 \times g$  por 20 minutos e o sobrenadante foi recuperado. As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford 1976).

## Western Blot

Para a realização do *western blot*, foi adicionado tampão de carregamento com agente redutor às proteínas quantificadas (Pierce Lane Marker Reducing Sample Buffer – ThermoFisher). A solução foi carregada em gel desnaturante de SDS-poliacrilamida 4-20% (Mini-Protean TGX – Biorad), utilizando o sistema Mini-Protean (BioRad). O gel foi resolvido utilizando o tampão Tris-HCl-Glicina com dodecilsulfato de sódio 0,1% (SDS) (TBS) (BioRad) em voltagem constante (80V por 10 minutos seguido por 100V por 60 minutos). O gel resolvido foi transferido para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Immun-Blot PVDF Membrane, BioRad), previamente hidratada (metanol e tampão de transferência), utilizando o sistema Trans-Blot SD Semi-Dry transfer cell (BioRad). Para isso, a membrana e o gel foram colocados no interior de uma camada de papel filtro absorvente embebidos em tampão de transferência (Tris-HCl-Glicina-0,1% SDS-20% metanol) e transferido por 50 minutos sob voltagem constante (20V). Então, a membrana foi bloqueada em leite 5% em TBS com tween-20 0,1% (leite 5% em TBST) por uma hora. Após esse período a membrana foi incubada com os respectivos anticorpos (tabela 1) diluídos em albumina sérica bovina 1% em TBST (BSA-TBST) ou leite 5% em TBST e mantida a 4°C por aproximadamente 16 horas. Então a membrana foi lavada três vezes em solução de TBST por 5 minutos cada lavagem e incubada com anticorpo secundário por uma 1 hora. Para a identificação das proteínas, a membrana foi lavada três vezes em TBST por 5 minutos cada lavagem, mantida em ECL Plus (GE Healthcare Life Sciences) por 5 minutos e revelada em filmes (Kodak) (Rodrigues et al. 2008). Posteriormente, os filmes foram analisados no software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) e os dados transferidos para o software GraphPad Prism 6 (GraphPad) para análise estatística. Os anticorpos utilizados identificaram os pesos moleculares esperados para as proteínas testadas e para as PLCδ4/γ1, a validação com dois siRNA foi realizada.

Tabela 1 - Anticorpos utilizados nos ensaios Western Blot

<b>Anticorpo</b>	<b>Fabricante/catálogo</b>	<b>Diluição de trabalho</b>
Anti-EGFR coelho policlonal	Santa Cruz Biotechnology/SC3	1:500
Anti-EGFR camundongo monoclonal	Millipore-Sigma-Aldrich/05-1047	1:500
Anti-alfa-tubulina camundongo monoclonal	Sigma-Aldrich/T6199	1:2000
Anti-lâmina-B1 coelho policlonal	Abcam/ab16048	1:2000
Anti-Clatrina coelho policlonal	Abcam/ab21679	1:3000
Anti-PLCgama1 camundongo monoclonal	Cell Signaling/I2822	1:1000
Anti-PLCdelta4 coelho policlonal	Santa Cruz Biotechnology/H250	1:500
Anti-Ciclina A2 camundongo monoclonal	Cell Signaling/4656	1:500
Anti-Ciclina B1 coelho policlonal	Cell Signaling/4138	1:250
Anti-Ciclina D1 coelho monoclonal	Cell Signaling/2978	1:500
Anti-Ciclina D2 coelho monoclonal	Cell Signaling/3741	1:500
Anti-Ciclina D3 camundongo monoclonal	Cell Signaling/2936	1:500
Anti-Ciclina E1 camundongo monoclonal	Cell Singnaling/4129	1:500
Anti-Ciclina E2 coelho policlonal	Cell Signaling/4132	1:500
Anti-Ciclina H coelho policlonal	Cell Signaling/2927	1:250
Anti-camundongo IgG HRP cabra	ThermoFisher/A28177	1:1000
Anti-coelho IgG HRP cabra	ThermoFisher/A27036	1:1000

## Imunofluorescência

Imagem em superresolução para imunofluorescência foi realizada para a identificação de EGFR nuclear. Para isso, as células foram tratadas ou não com EGF, como anteriormente mencionado, após semeadas em lamínulas. As células foram fixadas com formaldeído tamponado 3,7% (Sigma-Aldrich) por 30 minutos, lavadas com PBS, permeabilizadas com em Triton-X 100 0,5% PBS por 5 minutos, lavadas novamente com PBS, bloqueadas com BSA 1% em PBS por 1 hora e incubadas também em BSA 1%-PBS com o anticorpo anti-EGFR (1:200; camundongo monoclonal clone 8G6.2; Millipore/Sigma-Aldrich; catálogo 05-1047) e anti-lâmina B1 (1:200; coelho policlonal; Abcam; catálogo ab16048) por 16 horas a 4°C. Após esse período, as células foram lavadas com PBS, incubadas com anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa-Fluor 488 (1:1000, Life Technologies), anti-IgG de coelho conjugado com Alexa-Fluor 546 (1:1000, Life Technologies) e Hoeschst 33342 (1 µg/mL, Life Technologies) por 1 hora (Faraco et al. 2018). Então, as lamínulas foram montadas em lâminas de vidro com Prolong Gold antifade (Life Technologies) e as imagens foram adquiridas no microscópio Leica SP8 Gated STED com a objetiva de 100×; 1,4 NA.

## Transfecção do siRNA

As células foram transfectadas usando o reagente RNAiMAX (Life Technologies) de acordo com o protocolo do fabricante e os lipossomos com siRNA foram incubados em OptMEM (Life Technologies). Para isso, 50 nM de siRNA foram usados para o silenciamento da clatrina, 25 nM para o silenciamento da PLC $\gamma$ 1 e 50 nM para o silenciamento da PLC $\delta$ 4. Como controle de transfecção, 50 nM do Silencer Select Negative Control number 2 siRNA e 50 nM do IDT Scrambled negative control siRNA (NGC) foram utilizados (tabela 2). As células foram transfectadas em suspensão em meio DMEM e, após 16 horas, o meio foi substituído por um novo DMEM. As células foram utilizadas para experimentação após 48 horas da transfecção.

## Experimento de observação de cálcio por microscopia

A análise da resposta de cálcio intracelular foi realizada por microscopia confocal, utilizando o microscópio Zeiss LSM 710 DUO NLO. As células foram privadas de soro por 16 horas, incubadas com 5 µM de Fluo-4/AM (Life Technologies) por 30 minutos e as lamínulas foram transferidas para uma câmara de perfusão. Em seguida, as células foram levadas ao microscópio e perfundidas por 5 minutos com tampão HEPES para adaptação das células. A aquisição temporal foi realizada por 1 minuto sem estímulo e por 15 ou 30 minutos com estímulo de 100 ng/mL de EGF. As imagens foram analisadas no ZEN black (Zeiss) e os valores de intensidade de fluorescência e tempo transferidos ao GraphPad Prism para análise estatística.

Tabela 2 - Sequências dos oligonucleotídios utilizados como siRNA

Alvo	Sequência 1	Sequência 2
Clatrina	5'- GCAAUUAUUAAGGCUGACCGU ATT-3'/ Life Technologies, cat. S223263	5'- AGGUGGCUUCUAAAUAUCAUGAA CA-3'/ IDT, cat. hs.Ri.CLTC.13.1
PLC $\gamma$ 1	5'- GAAUCGUGAGGAUCGUAUATT- 3'/ Life Technologies, cat. S10632	5'- GACUCAUCAGCUACUAUGAGAAA C - 3'/ IDT, cat. hs.Ri.PLCG1.13.1
PLC $\delta$ 4	5'- CAAGAAGUUCAGCGGUUAU- 3' 5'- GACCAAUGGCUGAGCGAUU- 3' / ON-TARGETplus SMARTpool Darmacon	5'- AAGGCAGGUUGCAACUAGAAAUU CA-3'/ IDT, cat. hs.Ri.PLCD4.13.3
NGC	Sequência não disponível/ control siRNA1, Life Technologies, cat. 4390846	5'- CUUCCUCUCUUUCUCUCCUUGUG A - 3'/IDT, cat. 51-01-19-08

## Tamponamento de InsP3

Os vetores de expressão para o tamponamento de InsP3 foram geradas por Gomes e colaboradores (2008) (Gomes et al. 2008). Essa construção apresenta o domínio de ligação de InsP3 (resíduos 224-605), proveniente da isoforma I do InsP3R humano, conjugado à proteína mRFP e a um sinal de localização (InsP3-NLS) ou de exclusão nuclear (InsP3-NES) que permite à construção permanecer no núcleo ou citoplasma, respectivamente. A construção foi modificada para ser expressa por meio da utilização de adenovírus e a células foram utilizadas após 48 horas de infecção com 10 unidades de multiplicidade de infecção (MOI).

## Extração e detecção de PIns-4,5-P2

Para a extração e quantificação do PIns-4,5-P2 foi utilizado o kit para realização ELISA da Echelon Biosciences onde seguimos o protocolo do fabricante. Para isso, as células foram estimuladas por 5 minutos com 100 ng/mL de EGF e os núcleos isolados com tampão de lise, como descrito na subseção sobre *western blot*. Os núcleos foram lavados três vezes com PBS e a extração do PIns-4,5-P2 foi realizada utilizando o protocolo do fabricante. Inicialmente, os núcleos foram lavados com ácido tricloroacético 0,5 M e centrifugados a  $1.000 \times g$  por 7 minutos a 4°C. A seguir, os núcleos foram lavados duas vezes em ácido tricloroacético 5%, contendo EDTA 1 mM, homogeneizados utilizando

vortex por 30 segundos e centrifugados a  $1.000 \times g$  por 7 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Para a extração de lipídeos neutros, foi adicionada uma solução (2:1) de metanol/clorofórmio, agitada em vortex por 10 minutos, centrifugada a  $1.000 \times g$  por 5 minutos, seguido de descarte do sobrenadante. Para a extração dos lipídeos ácidos, utilizou-se uma solução de metanol/clorofórmio/ácido clorídrico (80:40:1), seguido de agitação em vortex por 25 minutos e centrifugação por 5 minutos a  $1.000 \times g$ . O sobrenadante foi transferido para um tubo de microcentrífuga de 2 mL. Para a recuperação de PIns-4,5-P2, ao tubo anterior foram adicionados clorofórmio e ácido clorídrico. Essa solução foi misturada em vortex por 30 segundos e centrifugada por 5 minutos a  $1.000 \times g$ . A fase orgânica foi recuperada, transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e seca em uma secadora à vácuo por 12 horas. As amostras foram reconstituídas em tampão estabilizador e, para isso, foram agitadas em vortex por 1 minuto. Posteriormente, foram transferidas, junto ao padrão e aos controles, para a placa de incubação, seguido da adição do detector, selagem e incubação por 1 hora. Após esse período, o conteúdo da placa foi transferido a uma placa de detecção onde permaneceu por 1 hora. Então, o conteúdo líquido dessa placa foi desprezado e o detector secundário adicionado e incubado por 1 hora. A placa de detecção foi lavada com PBST três vezes e revelada com solução de TMB por 30 minutos no escuro. A revelação foi estabilizada com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M, a absorbância lida a 450 nm e os dados levados para análise e comparados à curva padrão.

## Experimento utilizando a Transferência de Energia Ressonante em Fluorescência (FRET) para detecção de InsP3 nuclear e PKC nuclear

A construção do biosensor para InsP3 nuclear baseado em FRET (FIRE-1nuc) foi gentilmente cedido pelo Dr. Gregory Mignery (Kapoor et al. 2014). Para PKC, a construção NucCKAR foi adquirida na Addgene (número 14869) (Gallegos et al. 2006). A transfecção da construção foi realizada utilizando Fugene6 (Promega) de acordo com recomendações do fabricante. Para isso, os lipossomos incubados em OptMEM, com a razão de  $3 \mu\text{L}$  de Fugene para  $1 \mu\text{g}$  de DNA plasmidial, foram transferidos para as células após prévio silenciamento (24 horas) e controles em meio DMEM. Após 16 horas, o meio foi removido e um novo meio DMEM foi adicionado. Para completar as 48 horas, as células foram privadas de soro por 16 horas e, posteriormente, as lamínulas foram transferidas para uma câmara de perfusão. As células foram observadas no microscópio Zeiss LSM 710 DUO NLO e, utilizando uma objetiva de 63X (1,4 NA), a intensidade da emissão das proteínas fluorescentes ciano e amarela (CFP e YFP respectivamente) ao longo do tempo foi adquirida com e sem estímulo de EGF 100 ng/mL. As intensidades de fluorescência no decorrer do tempo foram analisadas no software ZEN black (Zeiss) e os dados correspondentes à razão YFP/CPF e ao tempo foram transferidos para o GraphPad Prism para análise estatística.

## Ensaio de captação e quantificação de BrdU

Para a avaliação da proliferação celular, as células foram cultivadas em placas de 96 poços (Corning) e o kit Cell Proliferation Elisa Kit (Roche) foi utilizado segundo informações do fabricante. Após 48 horas da transfecção para silenciamento da expressão de PLC $\delta$ 4, as células foram cultivadas com 0,2  $\mu$ M de BrdU por 2 horas em DMEM sem soro fetal bovino. As células foram lavadas com PBS, fixadas por 30 minutos em agente fixador e incubadas com anti-BrdU-POD por 90 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, foram lavadas três vezes com PBS, seguido da adição de TMB e a absorbância nos comprimentos de onda 370 e 492 nm foram medidas utilizando o Synergy 2 (Biotek). Os valores das absorbâncias em 370 nm foram subtraídos dos valores obtidos em 492 nm e esse resultado foi, em seguida, subtraído do branco (reação em células sem a adição do BrdU). Os valores obtidos foram transferidos ao GraphPad Prism para posterior análise.

## Ensaio de recuperação fenotípica da PLC $\delta$ 4

Para a confecção do plasmídeo contendo shRNA sob controle de promotor induzido por doxíciclina, o plasmídeo Tet-pLKO-neo foi adquirido a partir da Addgene (número 21916) (Wiederschain et al. 2009). As sequências para os shRNA direcionadas à PLC $\delta$ 4 foram obtidas a partir do consórcio de coleção de RNAi (<http://portals.broadinstitute.org/gpp/public/>). As sequências foram clonadas de acordo com a instrução da Addgene. Em resumo, as sequências foram clonadas em Tet-pLKO-neo após digestão com as enzimas AgeI e EcoRI. As sequências usadas foram: sequência 1 (5'-AGAGCAGCGTCGAGGGATATA-3') e sequência 2 (5'-ACTACCACTTCTACGAGATAT-3'). Duas sequências foram utilizadas como controle: controle 1 (5'-CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCG-3') e controle 2 (5'-CUUCCUCUCUUUCUCUCCCUUGUGA-3'). As células SK-Hep-1 foram transfectadas utilizando Lipofectamina2000 (Life Technologies) de acordo com recomendações do fabricante. Os lipossomos foram estabilizados em OptMEM e transferidos às células em suspensão cultivadas em DMEM. Após 16 horas, o meio foi trocado por um novo DMEM. Vinte e quatro horas depois, DMEM contendo 500 ng/mL de G418 foi utilizado para selecionar células resistentes. Para a expressão do shRNA, as células estáveis foram tratadas com 1  $\mu$ g/mL de doxíciclina por 48 horas. As sequências foram validadas por *western blot*.

Para o ensaio de recuperação fenotípica, as células estáveis foram tratadas por 48 horas com 1  $\mu$ g/mL de doxíciclina e, após esse período, mantidas em DMEM por 48 horas adicionais. O ensaio de captação de BrdU foi realizado como anteriormente descrito.

## Ensaio de morte celular

Células transfectadas para PLC $\delta$ 4 e células controles foram avaliadas para apoptose e necrose, utilizando anexina-V-FITC e iodeto de propídeo (Life Technologies), segundo recomendações do

fabricante. As células foram mantidas em placa escura de 96 poços com fundo de vidro (Corning), lavadas três vezes com PBS seguido de lavagem com tampão para ligação de anexina. Então, as células foram incubadas com 5  $\mu$ L de anexina-V-FITC e 10  $\mu$ g/mL de iodeto de propídeo por 15 minutos. As células foram lavadas com tampão para ligação de anexina e levadas ao microscópio Zeiss Axio Observer para análise. A somatória do número de células marcadas (tanto para anexina-V quanto para iodeto de propídeo) foram divididas pelo número total de células no campo para gerar a porcentagem de células mortas. Três campos de três experimentos independentes foram analisados e a média desses três experimentos foram transferidas ao GraphPad Prism para análise.

## Localização subcelular das PLC humanas

Para a análise da localização subcelular das PLC humanas, as sequências peptídicas para cada subtipo e isoformas anotadas e curadas pela agência americana *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) foram avaliadas utilizando o software DeepLoc (Almagro Armenteros et al. 2017). Esse software utiliza o método de aprendizado de máquinas, comparando sequências de proteínas com localização conhecida e validada, assim como a presença de sequências sinal. O algoritmo resulta na formação de uma pontuação de probabilidade da proteína arguida estar nos locais: citoplasma, núcleo, membrana plasmática, complexo de Golgi, lisossomo/vacúolo, peroxissomo, retículo endoplasmático, mitocôndria e exportação extracelular. Libera também uma pontuação de probabilidade de solubilidade e acoplamento nas membranas. Cada pontuação varia de 0 a 1, sendo 0 – 0% e 1 – 100% de probabilidade, distribuído entre as regiões analisadas ou perfil de solubilidade (Apêndice A).

## Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram feitas utilizando o software GraphPad Prism 6. Quando dois grupos foram comparados, foi realizado o teste de normalidade de D'Agostino-Pearson seguido do teste t de Student não pareado. Quando análise envolvia três ou mais grupos, os testes de normalidade foram realizados, seguido da análise de variância (*one-way* ANOVA) e, quando necessário, do pós-teste de Turkey para comparações múltiplas. Para as amostras que não apresentaram distribuição normal, foram realizados o teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn-Bonferroni para comparações múltiplas. Quando o teste utilizado foi diferente daqueles mencionados acima, ele estará descrito na sessão de resultados. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. O nível de significância ( $\alpha$ ) adotado para esse estudo foi de 0,05.

## Resultados

### O EGFR transloca para o núcleo em SK-Hep-1 e em hepatócitos de rato após estímulo com EGF

Para confirmar a translocação nuclear do EGFR, as células SK-Hep-1 e hepatócitos isolados de rato (célula não tumoral) foram estimulados com 100 ng/mL de EGF nos tempos de 2,5; 5; 10 e 20 minutos. É possível observar que em ambas as células houve translocação do receptor de EGFR para o núcleo (Figura 8A e B). Para a linhagem SK-Hep-1, observou-se uma maior concentração do receptor nuclear entre os tempos de 5 e 10 minutos de estímulo, o que coincide com a redução da concentração do receptor na fração não nuclear. Para os hepatócitos, o pico de translocação do EGFR para o núcleo ocorreu entre 2,5 e 5 minutos após o estímulo. Uma pequena redução na concentração do receptor na fração não nuclear também foi observada para o mesmo intervalo.

Para verificar se a aglomeração do EGFR era maior após o estímulo com EGF, células SK-Hep-1 foram estimuladas com EGF por 10 minutos e a presença dos receptores no núcleo foi avaliada utilizando o microscópio Leica gated STED SP8, que permite uma melhor resolução – aproximadamente 50 nm. Foi possível observar que, após o estímulo com EGF, o receptor se acumula no núcleo (Figura 8C). O estímulo com EGF causa também a indução de maiores grupos de receptores por toda a célula. Esses dados confirmam os resultados de *western blot* demonstrando que o EGF induz translocação do EGFR para o núcleo da célula.

### A translocação do EGFR para o núcleo e a sinalização por cálcio nuclear são dependentes de endocitose mediada por clatrina

Sabe-se que a internalização do EGFR é mediada por endocitose dependente de clatrina (Wang et al. 2010b; De Angelis Campos et al. 2011). Para confirmar a dependência da internalização de EGFR na sinalização mediada por cálcio, foi realizado o silenciamento da cadeia pesada 2 da clatrina (CHC2) usando siRNA. O tratamento com siRNA reduziu, aproximadamente,  $94 \pm 3\%$  e  $87 \pm 8\%$  a expressão de clatrina com a utilização das sequências 1 e 2, respectivamente, quando comparado ao controle (Figura 9A). Quando as células controle foram estimuladas com EGF, um aumento gradual da concentração de cálcio foi observado. Entretanto, quando a expressão de clatrina foi reduzida, verificou-se uma diminuição de  $85 \pm 2\%$  e  $100 \pm 2\%$  do pico da concentração de cálcio mediado por EGF para as sequências 1 e 2, respectivamente, quando comparado ao controle (Figura 9B). Esses resultados indicam que grande parte da sinalização de cálcio induzida por EGF em células SK-HEP-1 é dependente da internalização de EGFR.

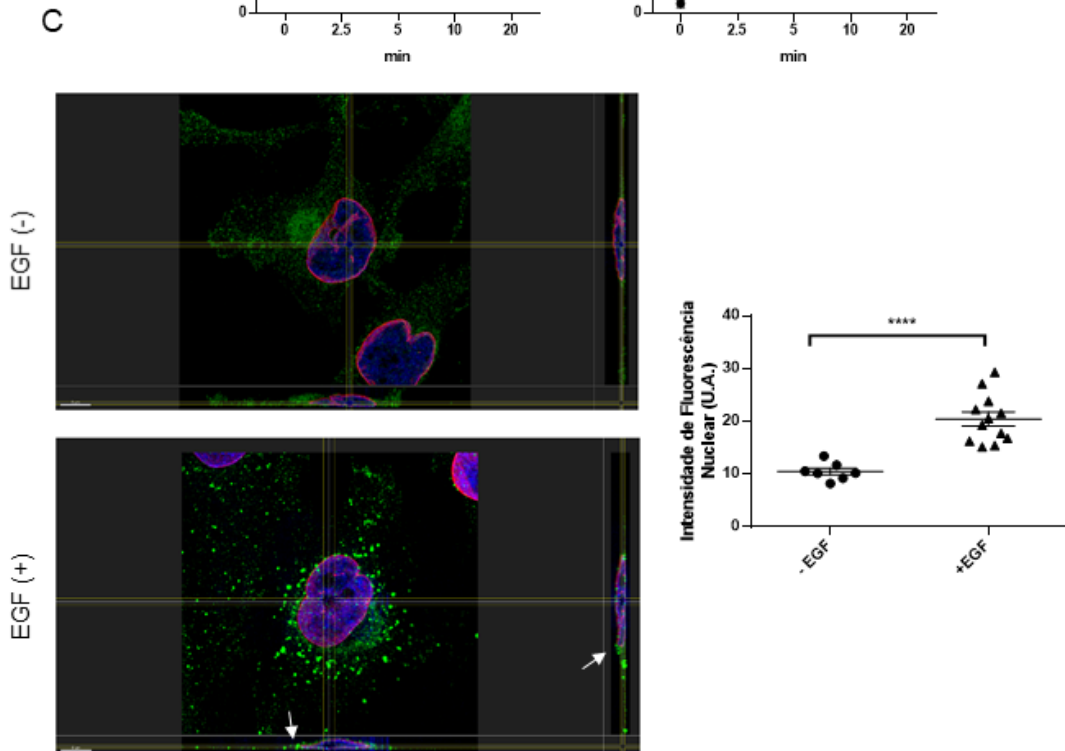
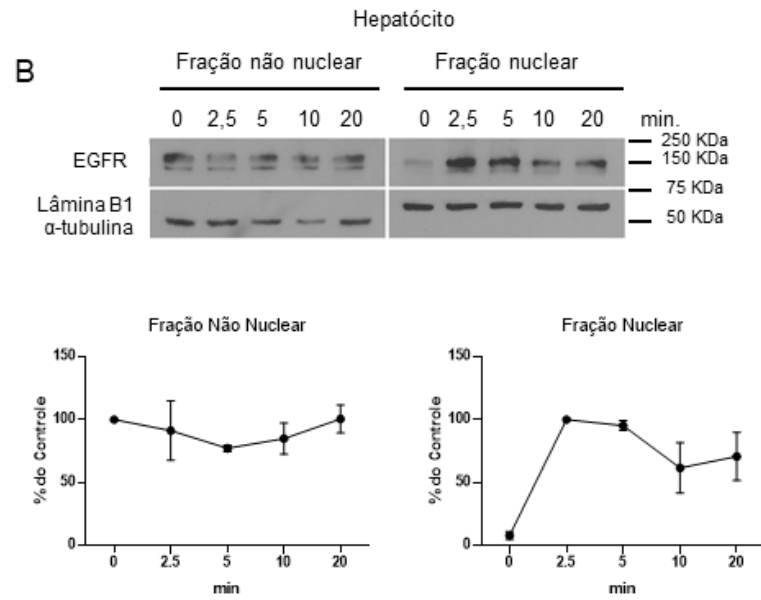
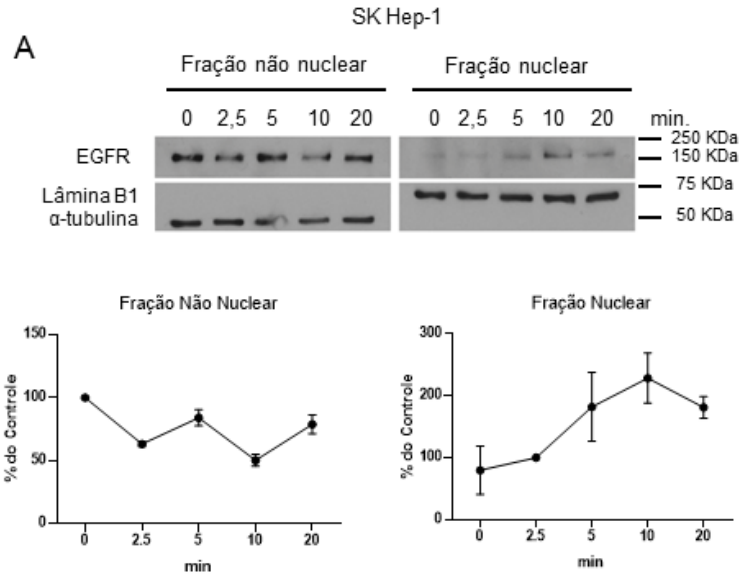


Figura 8 - O EGF induz translocação do EGFR para o núcleo. A/B – Western blot das frações não nuclear e nuclear de células SK-Hep-1 (A) e hepatócitos (B) estimulados e não estimulados (controle) com EGF. As proteínas  $\alpha$ -tubulina e lâmina B1 atestam a pureza das frações não nucleares e nucleares, respectivamente. A análise das frações nucleares mostra um pico de EGFR em 10 minutos de estímulo para a célula SK-Hep-1 e entre 2,5 e 5 minutos para o hepatócito. A redução do conteúdo de EGFR é também observado nesse mesmo intervalo de tempo para ambas as células. Os valores indicam a porcentagem relativa ao conteúdo inicial na fração não nuclear e ao tempo de 2,5 minutos na fração nuclear. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  D.E. (SKHep-1 nuclear - One-Way ANOVA,  $F(4,10)=3.215$ ;  $p=0,0611$ / hepatócito nuclear - One-Way ANOVA,  $F(4,10)=8.530$ ,  $p=0,0029$ ) C – Imagem de superresolução nas SK-Hep-1 sem estímulo (imagem superior) e após 10 minutos de estímulo (imagem inferior). A reconstrução tridimensional foi realizada e apresentada na lateral direita e no campo inferior da imagem. O EGF é representado em verde, a lâmina B1 em vermelho e o compartimento nuclear em azul. Note que o EGFR se redistribui no envelope nuclear e no interior do nucleoplasma (setas brancas). Barra = 10 micrômetros. O gráfico apresenta a quantificação do EGFR que colocaliza com o núcleo antes e após o estímulo com EGF. ( $n=7$  e  $12$ ). A configuração de aquisição foi realizada para o grupo EGFR para evitar a saturação dos pixels nos grupamentos de EGFR. (Teste Mann-Whitney,  $***p<0,0001$ ).

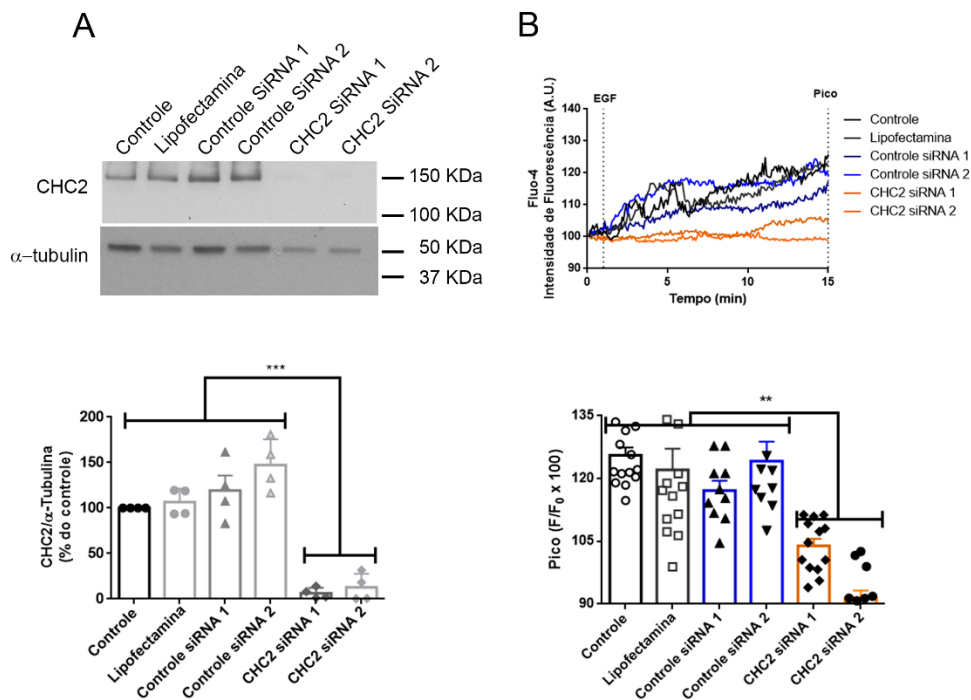


Figura 9 - EGF induz sinalização de cálcio dependente de endocitose mediada por clatrina. A – Análise da expressão da cadeia 2 pesada de clatrina em células SK-Hep-1 controle e tratadas somente com lipofectamina, com os controles de siRNA e com siRNA para clatrina. A proteína  $\alpha$ -tubulina foi usada como controle de carregamento. O gráfico mostra a análise densitométrica dos western blot ( $n=4$ ).  $***p<0,001$  (One-Way ANOVA,  $F(5,18)=34.41$ ;  $P<0,0001$ ). B – Traçados representativos da alteração da intensidade de fluorescência do Fluo-4/AM normalizada pela linha de base até o estímulo por EGF. O gráfico representa os máximos da fluorescência após estímulo com EGF no tempo de 15 minutos, controle ( $n=15$ ), lipofectamina ( $n=14$ ), controle siRNA1 ( $n=10$ ), controle siRNA2 ( $n=10$ ), CHC2 siRNA1 ( $n=13$ ), CHC2 siRNA2 ( $n=13$ ). A alteração da fluorescência por tempo foi normalizada e representada como intensidade de fluorescência (F) dividida pela linha de base ( $F_0$ ) multiplicada por 100.  $**p<0,01$ . (One-Way ANOVA,  $F(5,69)=18.78$ ;  $p<0,0001$ ).

## O EGF promove hidrólise de Ins-4,5-P2 nuclear e induz sinalização de cálcio por meio da formação de InsP3

Para investigar se a formação de InsP3 e por conseguinte sinalização de cálcio nuclear induzida por EGF é responsável pelo aumento da concentração de cálcio nuclear nas SK-Hep-1, as células foram transfectadas com uma construção que permite o tamponamento do InsP3 citoplasmático ou nuclear. A proteína monomérica fluorescente vermelha (mRFP) expressa na construção foi usada para a confirmação da localização subcelular das construções. Para monitorar a liberação de cálcio em resposta ao estímulo por EGF nesses compartimentos, a sonda Fluo-4/AM foi utilizada. O tamponamento de InsP3 citosólico reduziu a reposta de cálcio em  $50,5 \pm 6,1\%$  no núcleo e  $53,8 \pm 4,5\%$  no citoplasma quando comparado ao controle (Figura 10C). Quando o tamponamento de InsP3 foi nuclear, uma redução de  $86 \pm 2,7\%$  no núcleo e  $96 \pm 3,9\%$  no citoplasma foi observada. Esses resultados sugerem que o EGF causa sinalização de cálcio nuclear por indução de InsP3 no núcleo. Para investigar se o EGF induz hidrólise de Ins-4,5-P2 nuclear, para produzir InsP3, o Ins-4,5-P2 foi mensurado nas frações nucleares das células SK-Hep-1. Os núcleos após estímulo com EGF apresentaram  $28 \pm 0,08\%$  menos Ins-4,5-P2 nuclear (Figura 10D). Esses dados evidenciam que o EGF induz a liberação de InsP3 no núcleo por meio da hidrólise de Ins-4,5-P2 nuclear que culmina no aumento da concentração de cálcio também nesse compartimento celular.

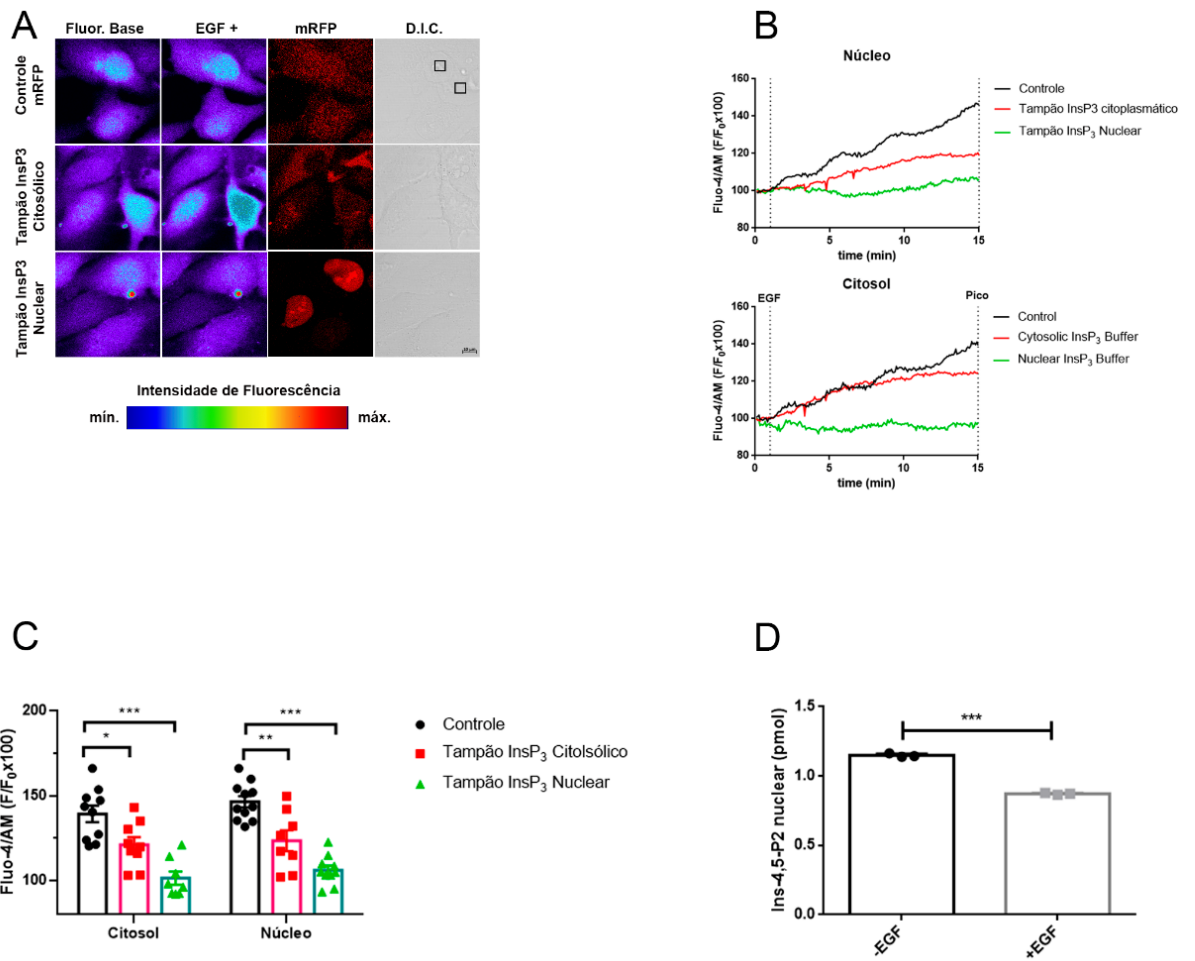


Figura 10 - O EGF induz a liberação de cálcio por meio da hidrólise de Ins-4,5-P2 no núcleo e geração de InsP<sub>3</sub> nuclear. A – Imagem de microscopia confocal das células SK-Hep-1 incubadas com Fluo-4/AM expressando o tampão de InsP<sub>3</sub> citoplasmático, nuclear e com somente a mRFP (controle). A fluorescência basal (1 min) e o máximo de fluorescência (15 min) após estímulo de EGF são evidenciadas na imagem. A expressão da construção foi avaliada pela mRFP. Barra = 10 micrômetros. B – Traçados das células expressando os tampões citoplasmático e nuclear, assim como do controle. C – Pico da intensidade de fluorescência citoplasmática e nuclear para os controles (n=11), tampão citoplasmático (n=9) e nuclear (n=10) após estímulo com EGF. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. (Citosol – One-Way ANOVA, F(2,24)=17.17; p<0,0001; Núcleo – One-Way ANOVA, F(2,26)=28.03; p<0,0001). D – Gráfico representativo da quantidade de Ins-4,5-P2 isolado em SK-Hep-1 após estímulo com EGF por 5 minutos com redução de 28 ± 0,08%. (n=3), \*\*\*p<0,001.

A PLC $\delta$ 4 nuclear participa da hidrólise de Ins-4,5-P2, da formação de InsP<sub>3</sub> e contribui para a ativação de PKC nucleares por meio da sinalização de cálcio

De Angelis Campos e Gomes, na busca por PLC nucleares, mostraram que nas SK-HEP-1 a PLC $\gamma$ 1 é majoritariamente citoplasmática e a PLC $\delta$ 4 é, em sua maioria, nuclear, dados corroborados por Kunrath-Lima e colaboradores (2018) (De Angelis Campos and Gomes 2014; Kunrath-Lima et al.

2018). É bem relatado na literatura a ativação da isoforma gama da PLC via o EGFR na membrana plasmática (Vega et al. 1992). Entretanto, ainda não foi esclarecido se o EGFR também participa da ativação de outras isoformas de PLC no núcleo. Dessa forma, para compreender o papel da PLC $\delta$ 4 na sinalização nuclear via EGFR foi utilizada a redução da expressão das isoformas delta4 e gama1. Quando as células foram transfectadas com siRNA, observou-se uma redução de  $90 \pm 14\%$  e  $91 \pm 27\%$  para a PLC $\gamma$ 1 e de  $75 \pm 7\%$  e  $86 \pm 5\%$  para a PLC $\delta$ 4, considerando as suas respectivas sequências 1 e 2 (Figura 11A). É importante mencionar que não houve interferência na expressão de gama1 no silenciamento de delta4, assim como não houve interferência na expressão de delta4 quando gama1 foi silenciada. Para compreender se a PLC $\delta$ 4 e PLC $\gamma$ 1 participam da hidrólise de Ins-4,5-P2 nuclear, esse lipídeo foi quantificado após redução da expressão das enzimas citadas. O EGF aumenta a hidrólise de Ins-4,5-P2 nuclear nos controles e essa hidrólise não é bloqueada após silenciamento da PLC $\gamma$ 1. Entretanto, a hidrólise foi inibida após tratamento das células com o siRNA da PLC $\delta$ 4 (Figura 11B). Esses resultados sugerem que o silenciamento do subtipo delta4, mas não de gama1, pode ser capaz de reduzir a produção de InsP3 e de cálcio no núcleo. Dessa forma, a geração de InsP3 nuclear foi avaliada, e demonstrou-se que somente o bloqueio da expressão PLC $\delta$ 4 foi capaz de reduzir a geração de InsP3 no núcleo (Figura 11C). Quando essas células foram testadas para a atividade de PKC nucleares foi observado que a redução da expressão de PLC $\delta$ 4, mas não de PLC $\gamma$ 1, foi capaz de reduzir a ativação das PKC no compartimento nuclear (Figura 11C). Finalmente, o silenciamento de delta4 reduziu a participação do cálcio nuclear quando comparado aos controles, o que não foi observado para o silenciamento de PLC $\gamma$ 1 (Figura 11D). Esses resultados sugerem que a PLC $\delta$ 4, mas não PLC $\gamma$ 1, participa da hidrólise de Ins-4,5-P2 nuclear, com geração de InsP3, ativação de PKC nesse compartimento celular e aumento da concentração de cálcio após ativação por EGF.

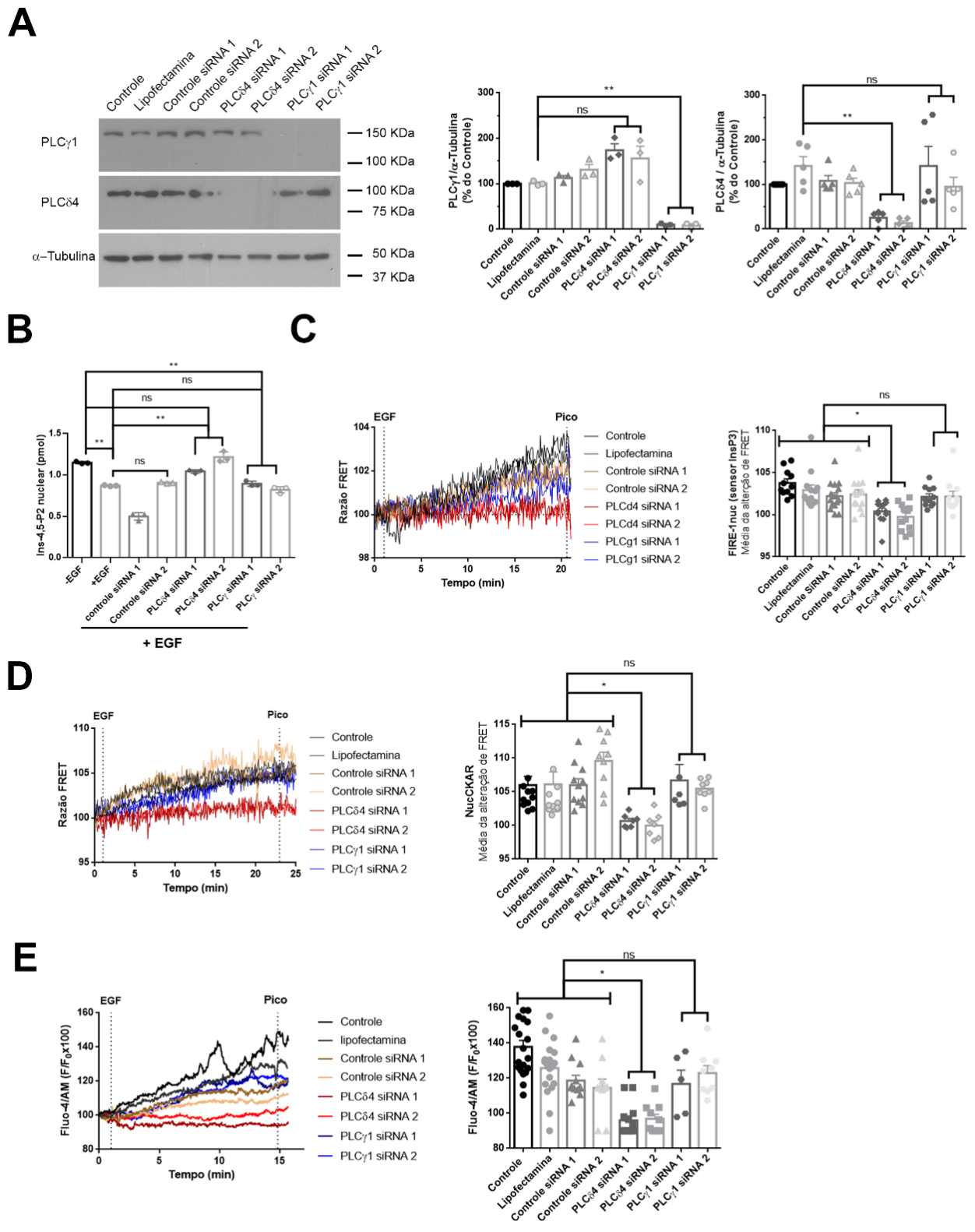


Figura 11 - PLCδ4 nuclear medeia a hidrólise de Ins-4,5-P2, geração de InsP3 e sinalização de cálcio induzida por EGF. A – Western Blot da expressão de PLCδ4 e PLCδ1 em células SK-Hep-1. A proteína α-tubulina foi usada como controle de carregamento. Os siRNA para PLCγ1 reduziram em  $90 \pm 14\%$  e  $91 \pm 27\%$  a expressão dessa enzima (One-Way ANOVA,

$F(7,16)=26.60$ ;  $p<0,001$ ). A expressão de PLC $\delta$ 4 foi reduzida em  $75 \pm 7\%$  e  $86 \pm 5\%$  quando silenciada por siRNA (OneWay ANOVA,  $F(7,32)=5.808$ ;  $p=0,0002$ ),  $n=3$ ;  $**p<0,01$ . B – A hidrólise de Ins-4,5-P2 nuclear foi reduzida após silenciamento de PLC $\delta$ 4, mas não de PLC $\delta$ 1, quando comparado aos controles nos núcleos das células tratadas com EGF por 10 minutos.  $n=3$ ;  $**p<0,01$ . (One-Way ANOVA  $F(8,18)=88.26$ ;  $p<0,0001$ ). C – Traçados representativos do sensor nuclear de InsP3 (FIRE-1nuc) apresentando a alteração da intensidade de fluorescência YFP/CFP normalizada pelo tempo de base. Em células SK-Hep-1, a produção de InsP3 nuclear é significativamente reduzida quando a PLC $\delta$ 4 é silenciada, mas não para PLC $\delta$ 1 (One-Way ANOVA,  $F(7,93)=6.717$ ;  $p<0,0001$ ),  $*p<0,05$ , controle ( $n=11$ ), lipofectamina ( $n=11$ ), controle siRNA 1/2( $n=13/13$ ), PLC $\delta$ 4 siRNA 1/2 ( $n=11/12$ ), PLC $\gamma$ 1 siRNA 1/2 ( $n=11/11$ ). D – Traçados representativos do sensor nuclear de PKC (NucCKAR), apresentando a alteração da intensidade de fluorescência YFP/CFP normalizada pelo tempo de base. Em células SK-Hep-1, a ativação de PKC nuclear é significativamente reduzida quando a PLC $\delta$ 4 é silenciada, mas não para PLC $\delta$ 1 (Kruskal-Wallis,  $H=37.85$ ,  $df=7$ ,  $p<0,0001$ ; teste de Dunn para múltiplas comparações),  $*p<0,05$ , controle ( $n=12$ ), lipofectamina ( $n=10$ ), controle siRNA 1/2( $n=11/9$ ), PLC $\delta$ 4 siRNA 1/2 ( $n=7/7$ ), PLC $\gamma$ 1 siRNA 1/2 ( $n=6/8$ ). E – Traçados representativos da alteração da intensidade de fluorescência do Fluo-4/AM normalizada pela linha de base até o estímulo por EGF. A alteração da fluorescência por tempo foi normalizada e representada como intensidade de fluorescência (F) dividida pela linha de base ( $F_0$ ) multiplicada por 100. A concentração nuclear de cálcio foi significativamente reduzida após redução da expressão da PLC $\delta$ 4, mas não da PLC $\gamma$ 1, quando comparado aos controles (OneWay ANOVA,  $F(7,92)=15.66$ ;  $p<0,0001$ ),  $*p<0,05$ .

## A PLC $\delta$ 4 está envolvida na progressão do ciclo celular

O cálcio celular é um importante componente na proliferação celular (Bootman et al. 2009). Kunrath-lima e colaboradores (2018) demonstraram uma possível interferência da PLC $\delta$ 4 no ciclo celular (Kunrath-Lima et al. 2018). Assim, decidimos investigar o papel dessa enzima na progressão do ciclo celular. Para isso, realizamos o ensaio de captação de BrdU após a redução da expressão da PLC $\delta$ 4. O silenciamento da expressão dessa enzima levou a uma redução de aproximadamente 67% na captação de BrdU quando comparado aos controles. Essa variação é independente da presença da suplementação de EGF e da presença de fatores mitogênicos do soro (Figura 12A). Para compreender se a diminuição no número de células em proliferação poderia ser consequência da perda de viabilidade celular após a redução da expressão de PLC $\delta$ 4, um ensaio de morte celular foi realizado. Quando comparado aos controles, a redução da expressão dessa PLC não aumentou a indução de morte celular (Figura 12B). Para compreender o papel dessa enzima no ciclo celular foi realizada a quantificação da expressão das ciclinas. As ciclinas B1 e A, responsáveis pela progressão das fases G2/M e S do ciclo celular, respectivamente, apresentaram quantidades reduzidas nas células com diminuição de expressão de PLC $\delta$ 4 quando comparada aos controles (Figura 12C). Para compreender se a via de sinalização por cálcio induzida pela PLC $\delta$ 4 era responsável pela redução na expressão das ciclinas, o tamponamento de InsP3 nuclear foi realizado. O tampão reduziu tanto a expressão de ciclina A quanto de ciclina B1 (Figura 12D). Esses resultados sugerem que a PLC $\delta$ 4 afeta o ciclo celular, em parte por interferir na expressão das ciclinas A e B1.

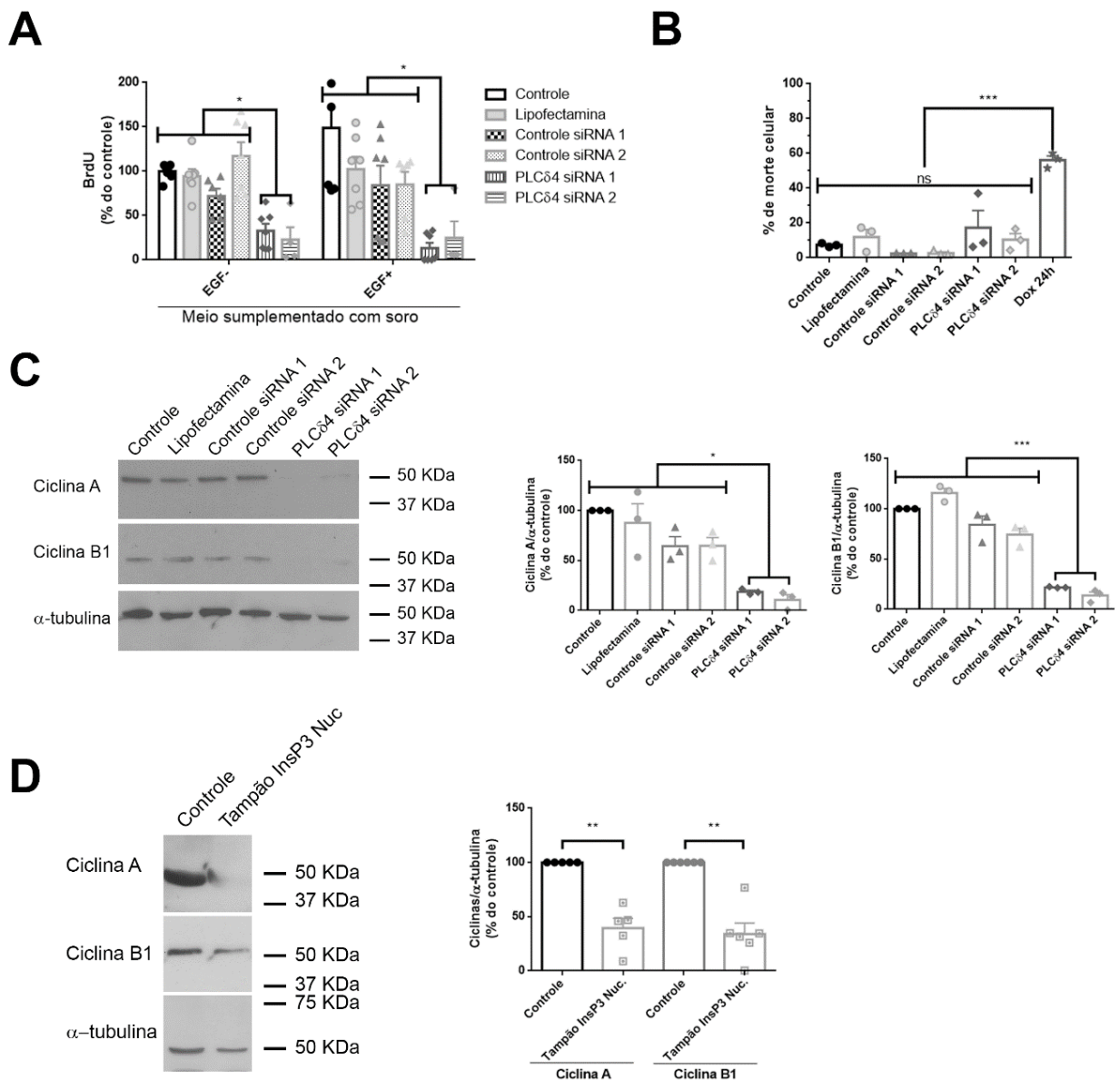


Figura 12 - O silenciamento da *PLCδ4* diminui o crescimento celular e as expressões de ciclina A e B1 sem afetar a morte celular. A – A captação de BrdU é reduzida nas células com diminuição da expressão de *PLCδ4* comparado aos controles.  $n=6$ ;  $*p<0,05$  (EGF- One-Way ANOVA,  $F(5,35)=8.042$ ;  $p<0,0001$ ; EGF+ One-Way ANOVA,  $F(5,35)=9.570$ ;  $p<0,0001$ ) B – Quantificação das células marcadas com anexina-V-FITC e iodeto de propídeo. O gráfico apresenta o somatório das células marcadas com anexina-V, iodeto de propídeo e duplo marcadas. Nenhuma diferença na viabilidade celular foi encontrada quando comparada à célula controle. A doxorrubicina (Dox) 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  foi usada como controle positivo.  $n=3$ ;  $***p<0,001$ ; ns – não significativo (One-Way ANOVA,  $F(6,71)=20.64$ ;  $p<0,0001$ ). C – Western blot da expressão das ciclinas A e B1 após silenciamento de *PLCδ4*. A proteína  $\alpha$ -tubulina foi utilizada como controle de carregamento. A redução da expressão de *PLCdelta4* reduz também as quantidades de ciclina A e B1.  $n=3$ ;  $*p<0,05$ ;  $***p<0,001$  (Cyclin A– One-Way ANOVA,  $F(6,14)=17.92$ ;  $p<0,0001$ ; Cyclin B1 – One-Way ANOVA,  $F(5,12)=69.17$ ;  $p<0,0001$ ). D – Western blot para o efeito do tamponamento de InsP3 nuclear na expressão das ciclinas A e B1. O tamponamento de InsP3 leva à redução da expressão das ciclinas A e B1. A proteína  $\alpha$ -tubulina foi utilizada como controle de carregamento.  $n=5$ ;  $**p<0,001$

## Discussão e Conclusão

O EGFR é um receptor tirosina cinase que tem sido extensivamente estudado e, por isso, a sua maquinaria de sinalização citoplasmática é bem caracterizada (Pandiella et al. 1988; Tinhofer et al. 1996; Johannessen et al. 2001; Zhang et al. 2006). O EGFR está relacionado a diferentes estados patológicos (Brand et al. 2013; Stolarczyk and Scholte 2018; De Pasquale et al. 2018). No câncer, por exemplo, ele possibilita a sobrevivência celular e auxilia na formação de novos vasos sanguíneos, permitindo a progressão do tumor (Markman et al. 2010; Brand et al. 2011; Han and Lo 2012; Minder et al. 2015). Da última década até o momento atual, pesquisas têm apresentado o EGFR nuclear como marcador de pior prognóstico em tumores malignos (Markman et al. 2010; Brand et al. 2013). Alguns tumores que apresentam uma maior concentração desse receptor nuclear exibem também resistência terapêutica tanto à quimioterapia quanto à radioterapia (Wheeler et al. 2008; Cuneo et al. 2015; Zhao et al. 2017). Nesse sentido, diferentes estudos buscaram evidenciar o papel desse receptor no núcleo (Lin et al. 2001; Hanada et al. 2006; Hung et al. 2008; De Angelis Campos et al. 2011; Brand et al. 2013; Faraco et al. 2018). Assim, o nosso trabalho auxilia na elucidação dos mecanismos pelos quais o EGFR nuclear pode exercer suas funções.

A ativação do EGFR ocorre por meio da interação com seus ligantes. Contudo, alguns estímulos como irradiação, choque térmico e cisplatina também foram descritos como desencadeadores dessa sinalização (Lin et al. 2001; Dittmann et al. 2005, 2010). Faria e colaboradores (2016) demonstraram que nem todos os ligantes de EGFR apresentam a capacidade de desencadear translocação do receptor (Faria et al. 2016). Em células SK-Hep-1, o EGF, TGF- $\alpha$ ,  $\beta$ -celulina e HB-EGF são os que apresentam afinidade suficiente para promover a translocação nuclear do receptor (Faria et al. 2016). O EGF tem um papel importante na fisiologia celular e pode ser sintetizado por diferentes células em diversos tecidos. No tumor, ele pode ser proveniente tanto das células tumorais quanto do estroma associado. Diferentes estudos demonstram que no ambiente tumoral essa proteína é mais expressa e pode ser um dos motivos para a superestimulação do EGFR e, conseqüentemente, para a sua presença no núcleo (Kamaruddin 1993; Kalyankrishna and Grandis 2006; Zeng and Harris 2014). Assim, a escolha do ligante EGF como modelo para a translocação do receptor e para o estudo da atividade nuclear possibilita uma possível translação com fisiopatologia do EGFR no câncer.

O EGFR apresenta diversos efeitos diretos por meio de sinalização nuclear, como interação com fatores de transcrição e promoção de fosforilação (Lin et al. 2001; Hung et al. 2008; Lo et al. 2010; Shi et al. 2012). Nesse trabalho, demonstramos que o EGFR transloca para o núcleo, gera InsP3 e aumento da concentração de cálcio nuclear.

Dois mecanismos de translocação do EGFR para o núcleo têm sido propostos (Huo et al. 2010; Wang and Hung 2012). Em ambos, sugere-se que a internalização inicial do EGFR apresenta

características semelhantes à endocitose mediada por clatrina, onde a translocação é dependente de clatrina e dinamina (Wang et al. 2010c; De Angelis Campos et al. 2011). Assim, no primeiro mecanismo, o EGFR destinado ao núcleo é direcionado a endossomos, onde pode ser transportado para o compartimento nuclear. Essa hipótese tem o suporte da colocalização de marcadores endossomais com o EGFR nuclear (Lo et al. 2006). Entretanto, não foi descrito o mecanismo de transporte do EGFR do endossomo para o núcleo. Diante disso, novas evidências foram propostas e suportaram o mecanismo do INTERNET, onde o EGFR carregado por vesículas é levado ao complexo de Golgi, onde por transporte retrógrado é carregado ao retículo endoplasmático de onde é transportado pelos compartimentos membranares até a membrana externa do envelope nuclear. O transporte retrógrado da membrana plasmática até o núcleo é conhecido para vírus e toxinas, o que fortalece o mecanismo proposto (Sandvig and Van Deurs 2002; Marsh and Helenius 2006).

Notavelmente, a família ErbB recebeu essa denominação pela sua homologia com o produto do gene viral *v-ERBB* do vírus da eritroblastose aviária (Downward et al. 1984). O EGFR pode ainda ser carregado do retículo endoplasmático para o citoplasma via Sec61, onde se associa com HSP70, importina alfa e beta e é direcionado ao núcleo (Liao and Carpenter 2007). Adicionalmente, diferentes receptores tirosina cinase já foram descritos como sendo translocados para o núcleo (Gomes et al. 2008; Carpenter and Liao 2009). Gomes e colaboradores demonstraram que o receptor c-Met, após estímulo com HGF, é recuperado no compartimento nuclear após a biotinylation desse receptor na membrana plasmática (Gomes et al. 2008). Resultados semelhantes foram obtidos quando células estimuladas com EGF marcado, mostrando que ele trafega da membrana plasmática para o núcleo em um período de 10 minutos (Faraco et al. 2018). Além disso, acúmulos de agrupamentos de EGF/EGFR foram encontrados no núcleo, utilizando técnicas de microscopia de superresolução (Faraco et al. 2018). É importante ressaltar que, no presente trabalho, observamos que o pico da translocação dos receptores coincide com o pico da concentração de cálcio (figura 8).

De Angelis Campos e colaboradores mostraram que a internalização do EGFR é dependente de endocitose mediada por dinamina e clatrina (De Angelis Campos et al. 2011; De Angelis Campos and Gomes 2014). Os pesquisadores, utilizando a expressão transiente do dominante negativo da dinamina, mutada no sítio de ligação de GTP (K44A), observaram o bloqueio da translocação do EGFR para o núcleo, semelhante ao observado por outros grupos (Orth et al. 2006; Lo et al. 2006). Por outro lado, a manipulação da expressão de clatrina permitiu uma redução expressiva na translocação; porém, translocação nuclear ainda pôde ser observada. Esses resultados nos permitiram reduzir a translocação de EGFR para o núcleo por meio da diminuição da expressão de clatrina e, dessa forma, confirmar a necessidade da translocação do EGFR para o núcleo para a manutenção da sinalização mediada por cálcio nesse compartimento (figura 9). Assim, esse conjunto de resultados sugere que a produção de cálcio nuclear é dependente da translocação do receptor para o núcleo, de forma semelhante ao apresentado também para o receptor c-Met (Gomes et al. 2008).

O aumento da concentração nuclear do cálcio é um importante sinalizador para a proliferação celular, assim como está envolvido com o crescimento de tumores (Rodrigues et al. 2007; Bootman et al. 2009). Adicionalmente, o cálcio nuclear regula a expressão de determinados genes (Hanada et al. 2006; Senatore and Spafford 2008; Bitler et al. 2010; Shi et al. 2012). Hardingham e colaboradores (1997), após sequestrar o cálcio nuclear utilizando BAPTA, observaram uma redução da atividade de CREB em células AtT-20, sem significativa interferência em SER. Em contrapartida, a sinalização via SER foi ativada com o aumento da concentração de cálcio citoplasmático (Hardingham et al. 1997). Isso demonstra a importância do compartimento celular na sinalização por cálcio. Dolmetsch e colaboradores (1997) relataram a importância da duração e da amplitude da sinalização por cálcio na ativação de fatores de transcrição (Dolmetsch et al. 1997). Esses pesquisadores, manipulando o pico e a duração do aumento da concentração de cálcio em linfócitos B, observaram que os fatores de transcrição JNK e NFkB eram seletivamente ativados por um aumento rápido e transiente na concentração de cálcio. Já o fator de transcrição NFAT necessitou de uma menor concentração de cálcio para ser ativado, porém requereu um tempo maior de duração para a sua ativação. Em 2003, Thompson e colaboradores demonstraram que em células CHO a interrupção da sinalização de cálcio nuclear ativa o fator de transcrição TEAD (Thompson et al. 2003). Em conjunto, esses dados suportam a complexa regulação da sinalização mediada por cálcio e seus efeitos na célula. Assim, o aumento de cálcio nuclear pode ser um dos mecanismos induzidos por EGFR na alteração da fisiologia celular.

É bem conhecido que o núcleo apresenta toda a maquinaria necessária para a liberação de cálcio mediada por receptor para InsP3 (Echevarria et al. 2003; Gomes et al. 2008; Rodrigues et al. 2008; Bootman et al. 2009). Apesar da formação de DAG e InsP3 no citoplasma a partir da ativação de PLC ter sido bem estudada, poucos são os estudos que conectam a hidrólise de PIns-4,5-P2 nuclear à formação de segundos mensageiros (Rodrigues et al. 2008; Berridge 2016). Nós mostramos que o EGFR ativado por EGF é capaz de hidrolisar PIns-4,5-P2 nuclear e promover aumento de InsP3 nesse mesmo compartimento (figura 9 e 11). Mecanismo semelhante foi observado no receptor c-Met após estímulo com HGF e insulina (Gomes et al. 2008; Rodrigues et al. 2008).

As PLC nucleares ainda carecem de muitos estudos; entretanto, tem sido demonstrado que a transdução de sinal mediada por essas enzimas nucleares é diferente das suas isoformas citoplasmáticas (Kanemaru et al. 2010; Takenaka et al. 2011; Mongiorgi et al. 2012; Kadamur and Ross 2013). É bem esclarecido que as isoformas beta e gama são ativadas via receptores acoplados a proteínas G e receptores tirosina cinase, respectivamente (Kim et al. 1991; Jiang et al. 1997; Bae et al. 1998). As isoformas épsilon, por sua vez, são ativadas por proteínas recrutadas tanto por receptores acoplados à proteína G quanto por receptores tirosina cinase (Kim et al. 1999b, 2011; Yang et al. 2013). Para as isoformas delta e éta, as evidências apontam que são reguladas por cálcio por um mecanismo de retroalimentação positiva às atividades de outras PLC (Stewart et al. 2005; Nakamura et al. 2005; Kanemaru et al. 2010).

Nossas evidências comprovam que o EGFR nuclear induz hidrólise de PI<sub>3</sub>-4,5-P<sub>2</sub> via PLC $\delta$ 4, e não PLC $\gamma$ 1 (figura 11). Entretanto, ainda é incerto se a interação entre EGFR e PLC $\delta$ 4 é direta ou indireta. Resultados de imunoprecipitação de PLC $\delta$ 4 e EGFR aliado à modelagem de interação *in silico* nos faz hipotetizar que há uma ativação indireta entre o receptor e essa enzima nuclear (dados não mostrados). Isso está de acordo com os grupos que demonstram que a PLC $\delta$ 4 atua como um amplificador de sinal mediado por cálcio. Estudos de interação de larga escala poderão esclarecer melhor os componentes dessa sinalização. Pode ser especulado que a translocação de PLC $\gamma$ 1 ou a presença de PLC $\gamma$ 2 nuclear (Apêndice A) favoreceriam a interação direta entre a calda C-terminal fosforilada do EGFR com os domínios SH2 e SH3 para a sua ativação e geração de cálcio, isso regularia positivamente a PLC $\delta$ 4. As PLC da família beta também apresentam membros nucleares, contudo, apenas formas ativadas e translocadas ao núcleo poderiam retroalimentar a PLC $\delta$ 4. Entretanto, os papéis do EGF/EGFR na ativação direta dessas enzimas parecem ser improváveis pela falta de domínios que permitiram a interação entre as enzimas. Por conseguinte, a ativação indireta de PLC $\beta$ 1 foi sugerida após ativação de IGF1R e PDGFR com translocação dessa PLC ao núcleo e aumento da hidrólise de Ins-4,5-P<sub>2</sub> nuclear com geração de InsP<sub>3</sub> (Martelli et al. 1992; Manzoli et al. 1997)

A ativação das vias mediadas por PLC produzem diferentes fenótipos celulares (Kadamur and Ross 2013). As evidências apontam que a sua localização nuclear origina distintas funções. Alguns sugerem que essas PLC permitem a continuidade do ciclo celular.

A enzima PLC $\beta$ 1 regula o gene para o fator de crescimento semelhante à insulina-1 e a sua superexpressão leva à indução de mitose mesmo na ausência de fatores mitogênicos (Faenza et al. 2007). Essa enzima nuclear pode ainda regular a ativação de c-Jun e a transcrição de ciclina D3 em células de músculo esquelético (Faenza et al. 2007; Ramazzotti et al. 2008).

A PLC $\delta$ 4 nuclear pode induzir senescência em células-tronco mesenquimais com aumento de transcritos para proteínas de regulação de ciclo celular p16<sup>INK4A</sup> e p21<sup>Cip1</sup> (Kunrath-Lima et al. 2018). Em ratos e linhagem celular humana, a expressão da PLC $\delta$ 4 aumenta durante a transição G1/S do ciclo celular e permanece estável até a mitose; então, quando a célula entra em G1, a sua expressão é consideravelmente reduzida (Liu et al. 1996). Em animais hepatectomizados, um aumento na expressão de PLC $\delta$ 4, PKC $\alpha$  e PKC $\epsilon$  foi observada na transição G1/S do ciclo celular (Akutagawa et al. 2006). De forma semelhante, a superexpressão de PLC $\delta$ 4 em células derivadas de câncer de mama, levou essas células a assumirem uma maior capacidade de divisão celular em meio sem fatores mitogênicos (Leung et al. 2004). Uma superexpressão dessa enzima foi também observada em tumores malignos de mama e testículo, (Leung et al. 2004). No presente estudo, nós demonstramos que a PLC $\delta$ 4 participa da regulação do ciclo celular em células da linhagem SK-Hep-1. A redução da expressão dessa enzima foi capaz de reduzir o número de células na fase S, sem indução de morte celular (figura 12). Esse fenômeno veio associado à redução na expressão das ciclinas A e B1, sem alteração na expressão da ciclina D1.

Schulze e colaboradores (1995) demonstraram que a transcrição da ciclina A pode ser regulada negativamente pela expressão de p16<sup>INK4</sup> (Schulze et al. 1995). Como apontado anteriormente, Kunrath-Lima e colaboradores (2018) demonstraram que a inibição da expressão de PLC $\delta$ 4 leva ao aumento de p16<sup>INK4</sup> (Kunrath-Lima et al. 2018). A transcrição de p16, por sua vez, depende de múltiplos níveis de controle; AP1, PPAR, MYB, p300/CBP, MYC e ETS são alguns dos fatores de transcrição conhecidos capazes de regular p16 (Li et al. 2011b; He and Sharpless 2017). Adicionalmente, Hwang e colaboradores (1995) observaram que a transcrição da ciclina B1 tem início durante a fase S do ciclo celular, com pico em G2/M (Hwang et al. 1995). Complementarmente, p16<sup>INK4</sup> regula o complexo pRB-E2F que sequestra a ciclina B1, aumentando a sua degradação (Li et al. 2011b). De forma semelhante, a p21<sup>CIP1</sup> também aumentada após o silenciamento de PLC $\delta$ 4 medeia a degradação de ciclina B1 (Henglein et al. 1994; Kunrath-Lima et al. 2018). Por tudo isso, supomos que a redução na expressão de PLC $\delta$ 4 não permite a amplificação do sinal mediada por cálcio e isso se traduz na indução da expressão de p16<sup>INK4</sup> e p21<sup>CIP1</sup>. Dessa forma, essas proteínas seriam capazes de inibir a progressão do ciclo celular por meio da redução da transcrição de ciclina A e a falta dessa ciclina reduziria a transcrição da ciclina B1. Essa última, sendo ainda regulada pelo aumento da sua degradação mediada por p16 e p21. Entretanto, novos experimentos são necessários para confirmar essa hipótese. Embora diferentes autores atribuam a sinalização EGF/EGFR ao aumento da transcrição da ciclina D1, nenhuma diferença foi observada na expressão dessa ciclina após silenciamento de PLC $\delta$ 4 (Lin et al. 2001; Bitler et al. 2010; Huo et al. 2010; Shi et al. 2012). Postulamos que isso ocorra devido à atuação direta na transcrição da ciclina D1 pelo EGFR independente da necessidade de amplificação do sinal mediada por PLC $\delta$ 4.

As PLC são capazes de promover ativação de fosfolipases C por meio da produção de DAG e InsP3 (Dempsey et al. 2000). De Angelis Campos e Gomes mostraram que a inibição de amplo espectro, mas não das PKC clássicas, foi capaz de reduzir a sua ativação nuclear após estímulo EGF/EGFR (De Angelis Campos and Gomes 2014). Sabe-se que as PKC clássicas necessitam tanto de DAG quanto do íon cálcio para a sua atividade (Hug and Sarre 1993). Já as demais PKC podem necessitar ou da presença de DAG e são independentes da concentração de cálcio para a sua atividade (Dempsey et al. 2000). É interessante notar que Leung e colaboradores (2004) observaram aumento da ativação de PKC $\phi$  (nova) com a superexpressão de PLC $\delta$ 4 (Leung et al. 2004). Isso sugere que PKC não clássicas sejam responsáveis pelos efeitos mediados por EGF/EGFR nuclear. Entretanto, a isoforma específica ativada por PLC $\delta$ 4 ainda não foi elucidada. Conhecer qual PKC permite tal sinalização é importante para a compreensão global da sinalização EGF-EGFR-PLC $\delta$ 4 e seus efeitos na fisiologia celular. Para isso, uma busca ativa dessas isoformas deve ser realizada.

Assim, esse trabalho foi capaz de demonstrar que o EGF induz a translocação de EGFR para o núcleo em hepatócitos de rato e SK-Hep-1, comprovando que esse fenômeno ocorre tanto em células tumorais quanto em células não tumorais. Além disso, mostramos que o EGF induz a liberação de InsP3 nuclear por meio da hidrólise de PInsp-4,5-P2 pela PLC $\delta$ 4 e não PLC $\gamma$ 1. Esse segundo mensageiro libera

cálcio e ativa uma PKC nuclear, subtipo ainda não identificado. Essa via medeia a expressão das ciclinas A e B1, de forma cálcio dependente, que regulam o ciclo celular e promovem a progressão das células SK-Hep-1 na fase G1/S (Figura 13). Esse trabalho abre caminhos para a identificação da ação dessa sinalização no contexto da doença, em especial no câncer. Aqui também, carecemos de compreender se o EGFR ativa de forma direta ou indireta a PLC $\delta$ 4, assim como identificar e caracterizar a atividade da PKC estimulada por essa PLC. Além disso, este trabalho abre perspectiva para a hipótese do EGFR ativar uma enzima ou proteína acessória, possivelmente nuclear, com capacidade de estimular a PLC $\delta$ 4 e, com isso, mediar a sinalização aqui descrita.

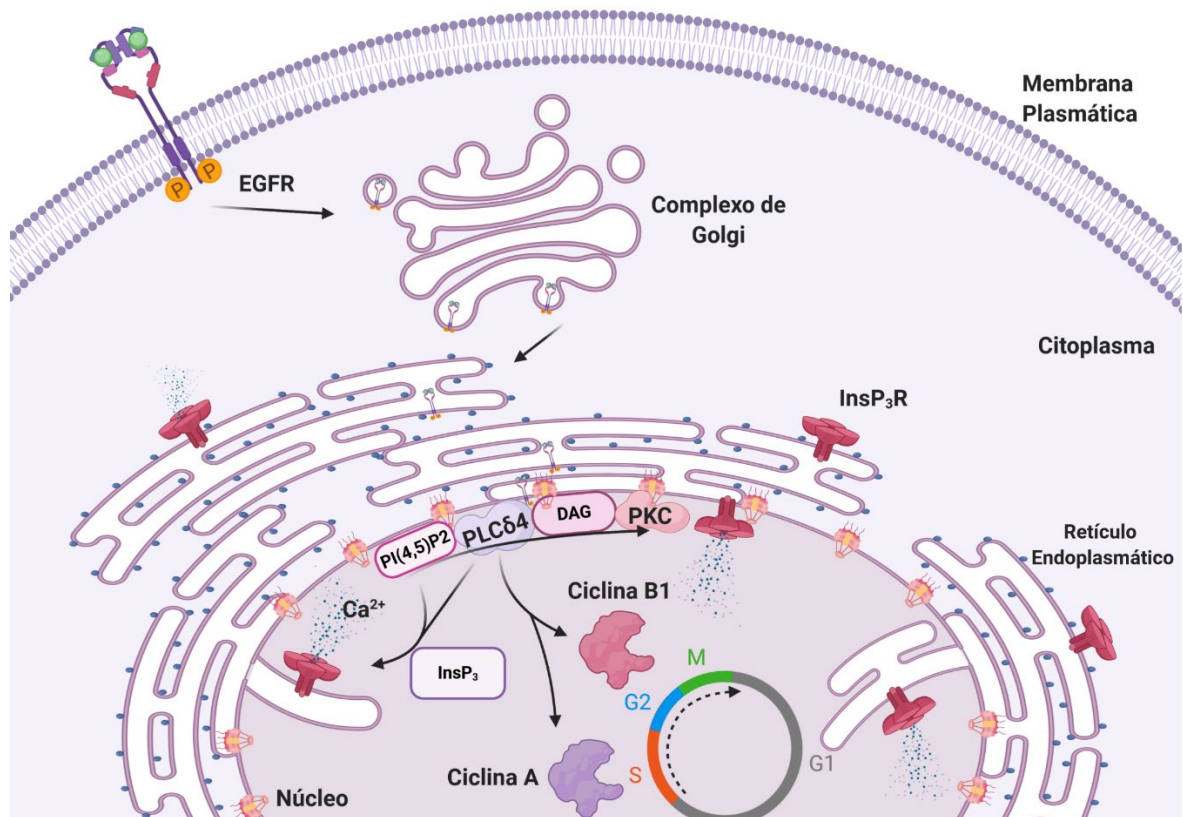


Figura 13 - EGF induz a hidrólise de Ins(4,5)P<sub>2</sub>, produção de InsP<sub>3</sub> local e liberação de cálcio no interior do nucleoplasma que media a proliferação celular. Esquema para o modelo proposto para a sinalização de cálcio nuclear. Após ligação do EGF, o EGFR é ativado e inicia a cascata de transdução de sinal. O EGFR é levado para o núcleo via INTERNET que induz a ativação de PLC $\delta$ 4 nuclear a hidrolisar Ins(4,5)P<sub>2</sub>, gerando InsP<sub>3</sub> e DAG. O InsP<sub>3</sub> estimula IP<sub>3</sub>R a liberação de cálcio que estimula a expressão das ciclinas A e B1.

## Referências Bibliográficas

- Abate C, Marshak DR, Curran T (1991) Fos is phosphorylated by p34(cdc2) cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C at multiple sites clustered within regulatory regions. *Oncogene* 6:2179–2185
- Agustoni F, Suda K, Yu H, et al (2019) EGFR-directed monoclonal antibodies in combination with chemotherapy for treatment of non-small-cell lung cancer: an updated review of clinical trials and new perspectives in biomarkers analysis. *Cancer Treat. Rev.* 72:15–27
- Akutagawa A, Fukami K, Banno Y, et al (2006) Disruption of phospholipase C $\delta$  gene modulates the liver regeneration in cooperation with nuclear protein kinase C. *J Biochem* 140:619–625 . doi: 10.1093/jb/mvj194
- Allen V, Swigart P, Cheung R, et al (1997) Regulation of inositol lipid-specific phospholipase C $\delta$  by changes in Ca<sup>2+</sup> ion concentrations. *Biochem J* 327:545–552 . doi: 10.1042/bj3270545
- Almagro Armenteros JJ, Sønderby CK, Sønderby SK, et al (2017) DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. *Bioinformatics* 33:3387–3395 . doi: 10.1093/bioinformatics/btx431
- Altman A, Kong K-F (2016) Protein Kinase C Enzymes in the Hematopoietic and Immune Systems. *Annu Rev Immunol* 34:511–538 . doi: 10.1146/annurev-immunol-041015-055347
- Ando T, Xiao W, Gao P, et al (2014) critical role for mast cell Stat5 activity in skin inflammation. *Cell Rep* 6:366–376 . doi: 10.1016/j.celrep.2013.12.029
- Asano M, Tamiya-Koizumi K, Homma Y, et al (1994) Purification and characterization of nuclear phospholipase C specific for phosphoinositides. *J Biol Chem* 269:12360–12366
- Bae YS, Cantley LG, Chen CS, et al (1998) Activation of phospholipase C- $\gamma$  by phosphatidylinositol 3,4,5- trisphosphate. *J Biol Chem* 273:4465–4469 . doi: 10.1074/jbc.273.8.4465
- Bauer NC, Doetsch PW, Corbett AH (2015) Mechanisms Regulating Protein Localization. *Traffic* 16:1039–1061
- Bauer PI, Farkas G, Buday L, et al (1992) Inhibition of DNA binding by the phosphorylation of poly ADP-ribose polymerase protein catalysed by protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 187:730–736 . doi: 10.1016/0006-291X(92)91256-P
- Berridge MJ (2016) The inositol trisphosphate/calcium signaling pathway in health and disease.

- Physiol Rev 96:1261–1296 . doi: 10.1152/physrev.00006.2016
- Bitler BG, Goverdhan A, Schroeder JA (2010) MUC1 regulates nuclear localization and function of the epidermal growth factor receptor. *J Cell Sci* 123:1716–1723 . doi: 10.1242/jcs.062661
- Bootman MD, Fearnley C, Smyrniak I, et al (2009) An update on nuclear calcium signalling. *J Cell Sci* 122:2337–2350 . doi: 10.1242/jcs.028100
- Boyer JL, Phillips JM, Graf J (1990) Preparation and specific applications of isolated hepatocyte couplets. *Methods Enzymol* 192:501–516 . doi: 10.1016/0076-6879(90)92090-Z
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254 . doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brand TM, Iida M, Li C, Wheeler DL (2011) The nuclear epidermal growth factor receptor signaling network and its role in cancer. *Discov Med* 12:419–432
- Brand TM, Iida M, Luthar N, et al (2013) Nuclear EGFR as a molecular target in cancer. *Radiother. Oncol.* 108:370–377
- Bunney TD, Katan M (2011) PLC regulation: Emerging pictures for molecular mechanisms. *Trends Biochem. Sci.* 36:88–96
- Calcerrada MC, Miguel BG, Martín L, et al (2002) Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in nuclear translocation of protein kinase C  $\zeta$  induced by C2-ceramide in rat hepatocytes. *FEBS Lett* 514:361–365 . doi: 10.1016/S0014-5793(02)02401-8
- Carpenter G, Liao HJ (2009) Trafficking of receptor tyrosine kinases to the nucleus. *Exp Cell Res* 315:1556–1566 . doi: 10.1016/j.yexcr.2008.09.027
- Chen Y, Wang X, Di L, et al (2008) Phospholipase C $\gamma$ 2 mediates RANKL-stimulated lymph node organogenesis and osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 283:29593–29601 . doi: 10.1074/jbc.M802493200
- Chou RH, Wang YN, Hsieh YH, et al (2014) EGFR Modulates DNA Synthesis and Repair through Tyrosine Phosphorylation of Histone H4. *Dev Cell* 30:224–237 . doi: 10.1016/j.devcel.2014.06.008
- Clayton AHAA, Walker F, Orchard SG, et al (2005) Ligand-induced dimer-tetramer transition during the activation of the cell surface epidermal growth factor receptor-A multidimensional microscopy analysis. *J Biol Chem* 280:30392–30399 . doi: 10.1074/jbc.M504770200

- Cocco L, Follo MY, Faenza I, et al (2011) Physiology and pathology of nuclear phospholipase C  $\beta$ 1. *Adv. Enzyme Regul.* 51:2–12
- Cuneo KC, Nyati MK, Ray D, Lawrence TS (2015) EGFR targeted therapies and radiation: Optimizing efficacy by appropriate drug scheduling and patient selection. *Pharmacol. Ther.* 154:67–77
- De Angelis Campos AC, Gomes DA (2014) REGULAÇÃO DO CÁLCIO NUCLEAR PELO RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL (EGFR). Universidade Federal de Minas Gerais
- De Angelis Campos AC, Rodrigues MA, de Andrade C, et al (2011) Epidermal growth factor receptors destined for the nucleus are internalized via a clathrin-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 412:341–346 . doi: 10.1016/j.bbrc.2011.07.100
- De Pasquale V, Pezone A, Sarogni P, et al (2018) EGFR activation triggers cellular hypertrophy and lysosomal disease in NAGLU-depleted cardiomyoblasts, mimicking the hallmarks of mucopolysaccharidosis IIIB. *Cell Death Dis* 9: . doi: 10.1038/s41419-017-0187-0
- Deacon EM, Pettitt TR, Webb P, et al (2002) Generation of diacylglycerol molecular species through the cell cycle: A role for 1-stearoyl, 2-arachidonyl glycerol in the activation of nuclear protein kinase C- $\beta$ II at G2/M. *J Cell Sci* 115:983–989
- Demory ML, Boerner JL, Davidson R, et al (2009) Epidermal growth factor receptor translocation to the mitochondria. *J Biol Chem* 284:36592–36604 . doi: 10.1074/jbc.M109.000760
- Dempsey EC, Newton AC, Mochly-Rosen D, et al (2000) Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. In: *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. pp L429–L438
- Dittmann K, Mayer C, Fehrenbacher B, et al (2005) Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 280:31182–31189 . doi: 10.1074/jbc.M506591200
- Dittmann K, Mayer C, Fehrenbacher B, et al (2010) Nuclear EGFR shuttling induced by ionizing radiation is regulated by phosphorylation at residue Thr654. *FEBS Lett* 584:3878–3884 . doi: 10.1016/j.febslet.2010.08.005
- Divecha N, Banfić H, Irvine RF (1991) The polyphosphoinositide cycle exists in the nuclei of Swiss 3T3 cells under the control of a receptor (for IGF-I) in the plasma membrane, and stimulation of the cycle increases nuclear diacylglycerol and apparently induces translocation of protein kinase. *EMBO J* 10:3207–3214 . doi: 10.1002/j.1460-2075.1991.tb04883.x

- Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JI (1997) Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration. *Nature* 386:855–858 . doi: 10.1038/386855a0
- Downward J, Parker P, Waterfield MD (1984) Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor. *Nature* 311:483–485 . doi: 10.1038/311483a0
- Echevarria W, Leite MF, Guerra MT, et al (2003) Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol* 5:440–446 . doi: 10.1038/ncb980
- Elliget KA, Phelps PC, Smith MW (1996) Transforming growth factor  $\beta$  modulation of the epidermal growth factor Ca<sup>2+</sup> signal and c-fos oncoprotein levels in A431 human epidermoid carcinoma cells. *Cell Growth Differ* 7:461–468
- Eun JR, Jung YJ, Zhang Y, et al (2014) Hepatoma SK Hep-1 cells exhibit characteristics of oncogenic mesenchymal stem cells with highly metastatic capacity. *PLoS One* 9:e110744 . doi: 10.1371/journal.pone.0110744
- Faenza I, Fiume R, Piazzini M, et al (2013) Nuclear inositide specific phospholipase C signalling - Interactions and activity. *FEBS J.* 280:6311–6321
- Faenza I, Ramazzotti G, Bavelloni A, et al (2007) Inositide-dependent phospholipase C signaling mimics insulin in skeletal muscle differentiation by affecting specific regions of the cyclin D3 promoter. *Endocrinology* 148:1108–1117 . doi: 10.1210/en.2006-1003
- Faraco CCF, Faria JAQA, Kunrath-Lima M, et al (2018) Translocation of Epidermal Growth Factor (EGF) to the nucleus has distinct kinetics between adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and a mesenchymal cancer cell lineage. *J Struct Biol* 202:61–69 . doi: 10.1016/j.jsb.2017.12.007
- Faria JAQA, de Andrade C, Goes AM, et al (2016) Effects of different ligands on epidermal growth factor receptor (EGFR) nuclear translocation. *Biochem Biophys Res Commun* 478:39–45 . doi: 10.1016/j.bbrc.2016.07.097
- Fima E, Shtutman M, Libros P, et al (2001) PKC $\eta$  enhances cell cycle progression, the expression of G1 cyclins and p21 in MCF-7 cells. *Oncogene* 20:6794–6804 . doi: 10.1038/sj.onc.1204885
- Fiume R, Ramazzotti G, Teti G, et al (2009) Involvement of nuclear PLC $\beta$ 1 in lamin B1 phosphorylation and G<sub>2</sub>/M cell cycle progression . *FASEB J* 23:957–966 . doi: 10.1096/fj.08-121244
- Follo MY, Finelli C, Mongiorgi S, et al (2009) Reduction of phosphoinositide-phospholipase C beta1

- methylation predicts the responsiveness to azacitidine in high-risk MDS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:16811–16816 . doi: 10.1073/pnas.0907109106
- Freitas N, Cunha C (2009) Mechanisms and Signals for the Nuclear Import of Proteins. *Curr Genomics* 10:550–557 . doi: 10.2174/138920209789503941
- Fu G, Chen Y, Yu M, et al (2010) Phospholipase Cy1 is essential for T cell development, activation, and tolerance. *J Exp Med* 207:309–318 . doi: 10.1084/jem.20090880
- Fukami K, Nakao K, Inoue T, et al (2001) Requirement of phospholipase C $\delta$ 4 for the zona pellucida-induced acrosome reaction. *Science* (80- ) 292:920–923 . doi: 10.1126/science.1059042
- Furuuchi K, Berezov A, Kumagai T, Greene MI (2007) Targeted Antireceptor Therapy with Monoclonal Antibodies Leads to the Formation of Inactivated Tetrameric Forms of ErbB Receptors. *J Immunol* 178:1021–1029 . doi: 10.4049/jimmunol.178.2.1021
- Gallegos LL, Kunkel MT, Newton AC (2006) Targeting protein kinase C activity reporter to discrete intracellular regions reveals spatiotemporal differences in agonist-dependent signaling. *J Biol Chem* 281:30947–30956 . doi: 10.1074/jbc.M603741200
- Garrett TPJ, McKern NM, Lou M, et al (2002) Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor  $\alpha$ . *Cell* 110:763–773 . doi: 10.1016/S0092-8674(02)00940-6
- Giri DK, Ali-Seyed M, Li L-Y, et al (2005) Endosomal Transport of ErbB-2: Mechanism for Nuclear Entry of the Cell Surface Receptor. *Mol Cell Biol* 25:11005–11018 . doi: 10.1128/mcb.25.24.11005-11018.2005
- Gomes DA, Leite MF, Bennett AM, Nathanson MH (2006) Calcium signaling in the nucleus. *Can J Physiol Pharmacol* 84:325–332 . doi: 10.1139/Y05-117
- Gomes DA, Rodrigues MA, Leite MF, et al (2008) c-Met must translocate to the nucleus to initiate calcium signals. *J Biol Chem* 283:4344–4351 . doi: 10.1074/jbc.M706550200
- Görlich D (1997) Nuclear protein import. *Curr Opin Cell Biol* 9:412–419 . doi: 10.1016/S0955-0674(97)80015-4
- Görlich D, Kutay U (1999) Transport Between the Cell Nucleus and the Cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:607–660 . doi: 10.1146/annurev.cellbio.15.1.607
- Haigler HT, McKanna JA, Cohen S (1979) Direct visualization of the binding and internalization of a ferritin conjugate of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431. *J Cell Biol*

81:382–395 . doi: 10.1083/jcb.81.2.382

- Han W, Lo HW (2012) Landscape of EGFR signaling network in human cancers: Biology and therapeutic response in relation to receptor subcellular locations. *Cancer Lett.* 318:124–134
- Hanada N, Lo HW, Day CP, et al (2006) Co-regulation of B-Myb expression by E2F1 and EGF receptor. *Mol Carcinog* 45:10–17 . doi: 10.1002/mc.20147
- Hardingham GE, Chawla S, Johnson CM, Bading H (1997) Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature* 385:260–265 . doi: 10.1038/385260a0
- He S, Sharpless NE (2017) Senescence in Health and Disease. *Cell* 169:1000–1011
- Heffelfinger SC, Hawkins HH, Barrish J, et al (1992) SK HEP-1: A human cell line of endothelial origin. *Vitr Cell Dev Biol - Anim* 28:136–142 . doi: 10.1007/BF02631017
- Henglein B, Chenivresse X, Wang J, et al (1994) Structure and cell cycle-regulated transcription of the human cyclin A gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:5490–5494 . doi: 10.1073/pnas.91.12.5490
- Hicks SN, Jezyk MR, Gershburg S, et al (2008) General and Versatile Autoinhibition of PLC Isozymes. *Mol Cell* 31:383–394 . doi: 10.1016/j.molcel.2008.06.018
- Hsu SC, Hung MC (2007) Characterization of a novel tripartite nuclear localization sequence in the EGFR family. *J Biol Chem* 282:10432–10440 . doi: 10.1074/jbc.M610014200
- Huang W, Mishra V, Batra S, et al (2004) Phorbol ester promotes histone H3-Ser10 phosphorylation at the LDL receptor promoter in a protein kinase C-dependent manner. *J Lipid Res* 45:1519–1527 . doi: 10.1194/jlr.M400088-JLR200
- Huang WC, Chen YJ, Li LY, et al (2011) Nuclear translocation of epidermal growth factor receptor by Akt-dependent phosphorylation enhances breast cancer-resistant protein expression in gefitinib-resistant cells. *J Biol Chem* 286:20558–20568 . doi: 10.1074/jbc.M111.240796
- Hug H, Sarre TF (1993) Protein kinase C isoenzymes: Divergence in signal transduction? *Biochem. J.* 291:329–343
- Hung LY, Tseng JT, Lee YC, et al (2008) Nuclear epidermal growth factor receptor (EGFR) interacts with signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) in activating Aurora-A gene expression. *Nucleic Acids Res* 36:4337–4351 . doi: 10.1093/nar/gkn417
- Huo L, Wang YN, Xia W, et al (2010) RNA helicase A is a DNA-binding partner for EGFR-mediated

- transcriptional activation in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:16125–16130 . doi: 10.1073/pnas.1000743107
- Hwang A, Maity A, McKenna WG, Muschel RJ (1995) Cell cycle-dependent regulation of the cyclin B1 promoter. *J Biol Chem* 270:28419–28424 . doi: 10.1074/jbc.270.47.28419
- Instituto Nacional de Câncer, Ministério da Saúde (2019) Estatísticas de Câncer. In: Estatísticas de câncer. <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>
- Ji QS, Winnier GE, Niswender KD, et al (1997) Essential role of the tyrosine kinase substrate phospholipase C- $\gamma$ 1 in mammalian growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2999–3003 . doi: 10.1073/pnas.94.7.2999
- Jiang H, Kuang Y, Wu Y, et al (1997) Roles of phospholipase C  $\beta$ 2 in chemoattractant-elicited responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7971–7975 . doi: 10.1073/pnas.94.15.7971
- Johannessen LE, Haugen KE, Østfold AC, et al (2001) Heterodimerization of the epidermal-growth-factor (EGF) receptor and ErbB2 and the affinity of EGF binding are regulated by different mechanisms. *Biochem J* 356:87–96 . doi: 10.1042/0264-6021:3560087
- Kadamur G, Ross EM (2013) Mammalian Phospholipase C. *Annu Rev Physiol* 75:127–154 . doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183750
- Kalyankrishna S, Grandis JR (2006) Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J. Clin. Oncol.* 24:2666–2672
- Kamaruddin MS (1993) The despairing and the hopeful : a Malay fishing community in Kuala Kedah
- Kanemaru K, Nakahara M, Nakamura Y, et al (2010) Phospholipase C- $\epsilon$ 2 is highly expressed in the habenula and retina. *Gene Expr Patterns* 10:119–126 . doi: 10.1016/j.gep.2009.12.004
- Kanemaru K, Nakamura Y, Sato K, et al (2012) Epidermal phospholipase C $\delta$ 1 regulates granulocyte counts and systemic interleukin-17 levels in mice. *Nat Commun* 3:963 . doi: 10.1038/ncomms1960
- Kapoor N, Maxwell JT, Mignery GA, et al (2014) Spatially defined InsP 3-mediated signaling in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *PLoS One* 9:e83715 . doi: 10.1371/journal.pone.0083715
- Kim H, Suh PG, Ryu SH, Park SH (1999a) Assignment of the human PLC  $\delta$ 4 gene (PLCD4) to human chromosome band 2q35 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 87:254–255 . doi: 10.1159/000015437

- Kim HK, Kim JW, Zilberstein A, et al (1991) PDGF stimulation of inositol phospholipid hydrolysis requires PLC- $\gamma$ 1 phosphorylation on tyrosine residues 783 and 1254. *Cell* 65:435–441 . doi: 10.1016/0092-8674(91)90461-7
- Kim HP, Yoon YK, Kim JW, et al (2009) Lapatinib, a dual EGFR and HER2 tyrosine kinase inhibitor, downregulates thymidylate synthase by inhibiting the nuclear translocation of EGFR and HER2. *PLoS One* 4:e5933 . doi: 10.1371/journal.pone.0005933
- Kim JK, Choi JW, Lim S, et al (2011) Phospholipase C- $\eta$ 1 is activated by intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and enhances GPCRs/PLC/Ca<sup>2+</sup> signaling. *Cell Signal* 23:1022–1029 . doi: 10.1016/j.cellsig.2011.01.017
- Kim YH, Park TJ, Lee YH, et al (1999b) Phospholipase C- $\delta$ 1 is activated by capacitative calcium entry that follows phospholipase C- $\beta$  activation upon bradykinin stimulation. *J Biol Chem* 274:26127–26134 . doi: 10.1074/jbc.274.37.26127
- Kiuru M, Kurban M, Itoh M, et al (2011) Hereditary leukonychia, or porcelain nails, resulting from mutations in PLCD1. *Am J Hum Genet* 88:839–844 . doi: 10.1016/j.ajhg.2011.05.014
- Kosugi S, Hasebe M, Tomita M, Yanagawa H (2009) Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:10171–10176 . doi: 10.1073/pnas.0900604106
- Kumar V, Jong YJI, O'Malley KL (2008) Activated nuclear metabotropic glutamate receptor mGlu5 couples to nuclear Gq/11 proteins to generate inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated nuclear Ca<sup>2+</sup> release. *J Biol Chem* 283:14072–14083 . doi: 10.1074/jbc.M708551200
- Kunrath-Lima M, de Miranda MC, Ferreira A da F, et al (2018) Phospholipase C delta 4 (PLC $\delta$ 4) is a nuclear protein involved in cell proliferation and senescence in mesenchymal stromal stem cells. *Cell Signal* 49:59–67 . doi: 10.1016/j.cellsig.2018.05.011
- Kutay U, Güttinger S (2005) Leucine-rich nuclear-export signals: Born to be weak. *Trends Cell Biol.* 15:121–124
- La Cour T, Kiemer L, Mølgaard A, et al (2004) Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel* 17:527–536 . doi: 10.1093/protein/gzh062
- Lee SB, Rhee SG (1996) Molecular cloning, splice variants, expression, and purification of phospholipase C- $\delta$ 4. *J Biol Chem* 271:25–31 . doi: 10.1074/jbc.271.1.25
- Lemmon MA, Falasca M, Schlessinger J (1997) Regulatory recruitment of signalling molecules to the

- cell membrane by pleckstrin-homology domains. *Trends Cell Biol.* 7:237–242
- Leung DW, Tompkins C, Brewer J, et al (2004) Phospholipase C delta-4 overexpression upregulates ErbB1/2 expression, Erk signaling pathway, and proliferation in MCF-7 cells. *Mol Cancer* 3: . doi: 10.1186/1476-4598-3-15
- Li C, Iida M, Dunn EF, et al (2009) Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab. *Oncogene* 28:3801–3813 . doi: 10.1038/onc.2009.234
- Li G, Deng X, Wu C, et al (2011a) Distinct kinetic and spatial patterns of protein kinase C (PKC)- and epidermal growth factor receptor (EGFR)- dependent activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 by human nicotinic acid receptor GPR109A. *J Biol Chem* 286:31199–31212 . doi: 10.1074/jbc.M111.241372
- Li J, Poi MJ, Tsai MD (2011b) Regulatory mechanisms of tumor suppressor P16INK4A and their relevance to cancer. *Biochemistry* 50:5566–5582 . doi: 10.1021/bi200642e
- Li Z, Jiang H, Xie W, et al (2000) Roles of PLC- $\beta$ 2 and - $\beta$ 3 and PI3ky in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science* (80- ) 287:1046–1049 . doi: 10.1126/science.287.5455.1046
- Liao HJ, Carpenter G (2007) Role of the Sec61 translocon in EGF receptor trafficking to the nucleus and gene expression. *Mol Biol Cell* 18:1064–1072 . doi: 10.1091/mbc.E06-09-0802
- Liao HJ, Kume T, McKay C, et al (2002) Absence of erythropoiesis and vasculogenesis in Plcg1-deficient mice. *J Biol Chem* 277:9335–9341 . doi: 10.1074/jbc.M109955200
- Liccardi G, Hartley JA, Hochhauser D (2011) EGFR nuclear translocation modulates DNA repair following cisplatin and ionizing radiation treatment. *Cancer Res* 71:1103–1114 . doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2384
- Lin J, Rong, Hu J (2013) SeqNLS: nuclear localization signal prediction based on frequent pattern mining and linear motif scoring. *PLoS One* 8: . doi: 10.1371/journal.pone.0076864
- Lin SY, Makino K, Xia W, et al (2001) Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* 3:802–808 . doi: 10.1038/ncb0901-802
- Liu N, Fukami K, Yu H, Takenawa T (1996) A new phospholipase C delta 4 is induced at S-phase of the cell cycle and appears in the nucleus. *J Biol Chem* 271:355–60 . doi: 10.1074/jbc.271.1.355
- Lo HW, Ali-Seyed M, Wu Y, et al (2006) Nuclear-cytoplasmic transport of EGFR involves receptor endocytosis, importin  $\beta$ 1 and CRM1. *J Cell Biochem* 98:1570–1583 . doi: 10.1002/jcb.20876

- Lo HW, Cao X, Zhu H, Ali-Osman F (2010) Cyclooxygenase-2 is a novel transcriptional target of the nuclear EGFR-STAT3 and EGFRvIII-STAT3 signaling axes. *Mol Cancer Res* 8:232–245 . doi: 10.1158/1541-7786.MCR-09-0391
- Lo HW, Hsu SC, Ali-Seyed M, et al (2005) Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. *Cancer Cell* 7:575–589 . doi: 10.1016/j.ccr.2005.05.007
- Lomasney JW, Cheng HF, Roffler SR, King K (1999) Activation of phospholipase C  $\delta$ 1 through C2 domain by a Ca<sup>2+</sup>-enzyme- phosphatidylserine ternary complex. *J Biol Chem* 274:21995–22001 . doi: 10.1074/jbc.274.31.21995
- Lyon AM, Tesmer JGG (2013) Structural insights into phospholipase C- $\beta$  function. *Mol. Pharmacol.* 84:488–500
- Malhas A, Goulbourne C, Vaux DJ (2011) The nucleoplasmic reticulum: Form and function. *Trends Cell Biol.* 21:362–373
- Manzoli L, Billi AM, Rubbini S, et al (1997) Essential role for nuclear phospholipase C  $\beta$ 1 in insulin-like growth factor I-induced mitogenesis. *Cancer Res* 57:2137–2139
- Markman B, Javier Ramos F, Capdevila J, Tabernero J (2010) EGFR and KRAS in Colorectal Cancer
- Marsh M, Helenius A (2006) Virus entry: Open sesame. *Cell* 124:729–740
- Martelli AM, Bortul R, Tabellini G, et al (2002) Molecular characterization of protein kinase C- $\alpha$  binding to lamin A. *J Cell Biochem* 86:320–330 . doi: 10.1002/jcb.10227
- Martelli AM, Evangelisti C, Nyakern M, Manzoli FA (2006) Nuclear protein kinase C. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 1761:542–551 . doi: 10.1016/j.bbalip.2006.02.009
- Martelli AM, Gilmour RS, Bertagnolo V, et al (1992) Nuclear localization and signalling activity of phosphoinositidase C $\beta$  in Swiss 3T3 cells. *Nature* 358:242–245 . doi: 10.1038/358242a0
- Martelli AM, Sang N, Borgatti P, et al (1999) Multiple biological responses activated by nuclear protein kinase C. *J. Cell. Biochem.* 74:499–521
- Marti U, Burwen SJ, Wells A, et al (1991) Localization of epidermal growth factor receptor in hepatocyte nuclei. *Hepatology* 13:15–20 . doi: 10.1002/hep.1840130104
- Marti U, Wells A (2000) The nuclear accumulation of a variant epidermal growth factor receptor (EGFR) lacking the transmembrane domain requires coexpression of a full-length EGFR. *Mol Cell Biol Res Commun* 3:8–14 . doi: 10.1006/mcbr.2000.0177

- Masuda H, Zhang D, Bartholomeusz C, et al (2012) Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 136:331–345
- Matter N, Ritz MF, Freyermuth S, et al (1993) Stimulation of nuclear protein kinase C leads to phosphorylation of nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and accelerated calcium release by inositol 1,4,5-trisphosphate from isolated rat liver nuclei. *J Biol Chem* 268:732–736
- Medema JP, Sark MW, Backendorf C, Bos JL (1994) Calcium inhibits epidermal growth factor-induced activation of p21ras in human primary keratinocytes. *Mol Cell Biol* 14:7078–7085 . doi: 10.1128/mcb.14.11.7078
- Michalopoulos GK (2017) Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance. *Hepatology* 65:1384–1392 . doi: 10.1002/hep.28988
- Mikoshiba K (1993) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Trends Pharmacol Sci* 14:86–89 . doi: 10.1016/0165-6147(93)90069-V
- Minder P, Zajac E, Quigley JP, Deryugina EI (2015) EGFR Regulates the Development and Microarchitecture of Intratumoral Angiogenic Vasculature Capable of Sustaining Cancer Cell Intravasation. *Neoplasia* 17:634–649 . doi: 10.1016/j.neo.2015.08.002
- Moccia F, Berra-Romani R, Tritto S, et al (2003) Epidermal growth factor induces intracellular Ca<sup>2+</sup> oscillations in microvascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 194:139–150 . doi: 10.1002/jcp.10198
- Mongiorgi S, Follo MY, Clissa C, et al (2012) Nuclear PI-PLC  $\beta$ 1 and Myelodysplastic Syndromes: From Bench to Clinics. In: *Current topics in microbiology and immunology*. pp 235–245
- Morgillo F, Woo JK, Kim ES, et al (2006) Heterodimerization of insulin-like growth factor receptor/epidermal growth factor receptor and induction of survivin expression counteract the antitumor action of erlotinib. *Cancer Res* 66:10100–10111 . doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1684
- Nagano K, Fukami K, Minagawa T, et al (1999) A novel phospholipase C  $\delta$ 4 (PLC $\delta$ 4) splice variant as a negative regulator of plc. *J Biol Chem* 274:2872–2879 . doi: 10.1074/jbc.274.5.2872
- Nair R, Carter P, Rost B (2003) NLSdb: Database of nuclear localization signals. *Nucleic Acids Res* 31:397–399 . doi: 10.1093/nar/gkg001
- Nakai K, Horton P (1999) PSORT: A program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem. Sci.* 24:34–35

- Nakai K, Hung MC, Yamaguchi H (2016) A perspective on anti-EGFR therapies targeting triple-negative breast cancer. *Am. J. Cancer Res.* 6:1609–1623
- Nakamura Y, Fukami K (2017) Regulation and physiological functions of mammalian phospholipase C. *J Biochem* 161:315–321 . doi: 10.1093/jb/mvw094
- Nakamura Y, Hamada Y, Fujiwara T, et al (2005) Phospholipase C- $\delta$ 1 and - $\delta$ 3 Are Essential in the Trophoblast for Placental Development. *Mol Cell Biol* 25:10979–10988 . doi: 10.1128/mcb.25.24.10979-10988.2005
- Nakamura Y, Ichinohe M, Hirata M, et al (2008) Phospholipase C- $\delta$ 1 is an essential molecule downstream of Foxnl, the gene responsible for the nude mutation, in normal hair development. *FASEB J* 22:841–849 . doi: 10.1096/fj.07-9239com
- Nakamura Y, Kanemaru K, Kojima R, et al (2014) Simultaneous loss of phospholipase C $\delta$ 1 and phospholipase C $\delta$ 3 causes cardiomyocyte apoptosis and cardiomyopathy. *Cell Death Dis* 5:e1215–e1215 . doi: 10.1038/cddis.2014.181
- Needham SR, Roberts SK, Arkhipov A, et al (2016) EGFR oligomerization organizes kinase-active dimers into competent signalling platforms. *Nat Commun* 7:13307 . doi: 10.1038/ncomms13307
- NERI LM, MARTELLI AM, BORGATTI P, et al (1999) Increase in nuclear phosphatidylinositol 3-kinase activity and phosphatidylinositol (3,4,5) trisphosphate synthesis precede PKC- $\zeta$  translocation to the nucleus of NGF-treated PC12 cells. *FASEB J* 13:2299–2310 . doi: 10.1096/fasebj.13.15.2299
- Newton AC (1995) Protein kinase C: Structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem.* 270:28495–28498
- Newton AC (2001) Protein kinase C: Structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev* 101:2353–2364 . doi: 10.1021/cr0002801
- Nguyen Ba AN, Pogoutse A, Provart N, Moses AM (2009) NLStradamus: A simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics* 10:202 . doi: 10.1186/1471-2105-10-202
- Nishibe S, Wahl MI, Hernández-Sotomayor SMT, et al (1990) Increase of the catalytic activity of phospholipase C- $\gamma$ 1 by tyrosine phosphorylation. *Science* (80- ) 250:1253–1256 . doi: 10.1126/science.1700866
- Orth JD, Krueger EW, Weller SG, McNiven MA (2006) A novel endocytic mechanism of epidermal

- growth factor receptor sequestration and internalization. *Cancer Res* 66:3603–3610 . doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2916
- Ortiz-Zapater E, Lee RW, Owen W, et al (2017) MET-EGFR dimerization in lung adenocarcinoma is dependent on EGFR mutations and altered by MET kinase inhibition. *PLoS One* 12:e0170798 . doi: 10.1371/journal.pone.0170798
- Pandiella A, Beguinot L, Velu TJ, Meldolesi J (1988) Transmembrane signalling at epidermal growth factor receptors overexpressed in NIH 3T3 cells. Phosphoinositide hydrolysis, cytosolic Ca<sup>2+</sup> increase and alkalization correlate with epidermal-growth-factor-induced cell proliferation. *Biochem J* 254:223–228 . doi: 10.1042/bj2540223
- Parekh DB, Ziegler W, Parker PJ (2000) Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J* 19:496–503 . doi: 10.1093/emboj/19.4.496
- Piechulek T, Rehlen T, Walliser C, et al (2005) Isozyme-specific stimulation of phospholipase C- $\gamma$ 2 by Rac GTPases. *J Biol Chem* 280:38923–38931 . doi: 10.1074/jbc.M509396200
- Poli A, Faenza I, Chiarini F, et al (2013) K562 cell proliferation is modulated by PLC $\beta$ 1 through a PKC $\alpha$ -mediated pathway. *Cell Cycle* 12:1713–1721 . doi: 10.4161/cc.24806
- Poli A, Ramazzotti G, Matteucci A, et al (2014) A novel DAG-dependent mechanism links PKC $\alpha$  and Cyclin B1 regulating cell cycle progression. *Oncotarget* 5:11526–11540 . doi: 10.18632/oncotarget.2578
- Pommier Y, Kerrigan D, Hartman KD, Glazer RI (1990) Phosphorylation of mammalian DNA topoisomerase I and activation by protein kinase C. *J Biol Chem* 265:9418–9422
- Popovics P, Beswick W, Guild SB, et al (2011) Phospholipase C- $\eta$ 2 is activated by elevated intracellular Ca<sup>2+</sup> levels. *Cell Signal* 23:1777–1784 . doi: 10.1016/j.cellsig.2011.06.012
- Prabhakar CN (2015) Epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer. *Transl. Lung Cancer Res.* 4:110–118
- Pusl T, Wu JJ, Zimmerman TL, et al (2002) Epidermal growth factor-mediated activation of the ETS domain transcription factor Elk-1 requires nuclear calcium. *J Biol Chem* 277:27517–27527 . doi: 10.1074/jbc.M203002200
- Qian X, Levea CM, Freeman JK, et al (1994) Heterodimerization of epidermal growth factor receptor and wild-type or kinase-deficient Neu: A mechanism of interreceptor kinase activation and transphosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1500–1504 . doi: 10.1073/pnas.91.4.1500

- Ramazzotti G, Faenza I, Gaboardi GC, et al (2008) Catalytic activity of nuclear PLC- $\beta$ 1 is required for its signalling function during C2C12 differentiation. *Cell Signal* 20:2013–2021 . doi: 10.1016/j.cellsig.2008.07.009
- Ratti S, Mongiorgi S, Ramazzotti G, et al (2017) Nuclear Inositide Signaling Via Phospholipase C. *J Cell Biochem* 118:1969–1978 . doi: 10.1002/jcb.25894
- Rebecchi MJ, Pentylala SN (2000) Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol. Rev.* 80:1291–1335
- Rodrigues MA, Gomes DA, Andrade VA, et al (2008) Insulin induces calcium signals in the nucleus of rat hepatocytes. *Hepatology* 48:1621–1631 . doi: 10.1002/hep.22424
- Rodrigues MA, Gomes DA, Leite MF, et al (2007) Nucleoplasmic calcium is required for cell proliferation. *J Biol Chem* 282:17061–17068 . doi: 10.1074/jbc.M700490200
- Rosenberger U, Lehmann I, Weise C, et al (2002) Identification of PSF as a protein kinase C $\alpha$ -binding protein in the cell nucleus. *J Cell Biochem* 86:394–402 . doi: 10.1002/jcb.10233
- Sahyoun N, Wolf M, Besterman J, et al (1986) Protein kinase C phosphorylates topoisomerase II: Topoisomerase activation and its possible role in phorbol ester-induced differentiation of HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:1603–1607 . doi: 10.1073/pnas.83.6.1603
- Sandvig K, Van Deurs B (2002) Transport of protein toxins into cells: Pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. *FEBS Lett.* 529:49–53
- Saunders CM, Larman MG, Parrington J, et al (2002) PLC $\zeta$ : A sperm-specific trigger of Ca<sup>2+</sup> oscillations in eggs and embryo development. *Development* 129:3533–3544
- Schulze A, Zerfass K, Spitkovsky D, et al (1995) Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11264–11268 . doi: 10.1073/pnas.92.24.11264
- Scott MS, Troshin P V., Barton GJ (2011) NoD: A Nucleolar localization sequence detector for eukaryotic and viral proteins. *BMC Bioinformatics* 12: . doi: 10.1186/1471-2105-12-317
- Seifert JP, Wing MR, Snyder JT, et al (2004) RhoA activates purified phospholipase C- $\epsilon$  by a guanine nucleotide-dependent mechanism. *J Biol Chem* 279:47992–47997 . doi: 10.1074/jbc.M407111200
- Senatore A, Spafford JD (2008) Calcium Channels: Regulation of Gene Transcription. In: *Encyclopedia of Neuroscience*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 550–554

- Seshacharyulu P, Ponnusamy MP, Haridas D, et al (2012) Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* 16:15–31
- Shi Y, Tao YG, Jiang Y, et al (2012) Nuclear epidermal growth factor receptor interacts with transcriptional intermediary factor 2 to activate cyclin D1 gene expression triggered by the oncoprotein latent membrane protein 1. *Carcinogenesis* 33:1468–1478 . doi: 10.1093/carcin/bgs171
- Smrcka A V, Brown JH, Holz GG (2012) Role of phospholipase C $\epsilon$  in physiological phosphoinositide signaling networks. *Cell. Signal.* 24:1333–1343
- Stallings JD, Tall EG, Pentyala S, Rebecchi MJ (2005) Nuclear translocation of phospholipase C- $\delta$ 1 is linked to the cell cycle and nuclear phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem* 280:22060–22069 . doi: 10.1074/jbc.M413813200
- Stehno-Bittel L, Lückhoff A, Clapham DE (1995) Calcium release from the nucleus by InsP3 receptor channels. *Neuron* 14:163–167 . doi: 10.1016/0896-6273(95)90250-3
- Stewart AJ, Mukherjee J, Roberts SJ, et al (2005) Identification of a novel class of mammalian phosphoinositol-specific phospholipase C enzymes. *Int J Mol Med* 15:117–121 . doi: 10.3892/ijmm.15.1.117
- Stolarczyk M, Scholte BJ (2018) The EGFR-ADAM17 Axis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Cystic Fibrosis Lung Pathology. *Mediators Inflamm.* 2018
- Subramanian K, Meyer T (1997) Calcium-induced restructuring of nuclear envelope and endoplasmic reticulum calcium stores. *Cell* 89:963–971 . doi: 10.1016/S0092-8674(00)80281-0
- Sutcliffe EL, Bunting KL, He YQ, et al (2011) Chromatin-Associated Protein Kinase C- $\theta$  Regulates an Inducible Gene Expression Program and MicroRNAs in Human T Lymphocytes. *Mol Cell* 41:704–719 . doi: 10.1016/j.molcel.2011.02.030
- Tabellini G, Bortul R, Aluigi M, et al (2002) Binding of elements of protein kinase C- $\alpha$  regulatory domain to lamin B1. *Cell Signal* 14:819–827 . doi: 10.1016/S0898-6568(02)00021-9
- Takenaka N, Edamatsu H, Suzuki N, et al (2011) Overexpression of phospholipase C $\epsilon$  in keratinocytes upregulates cytokine expression and causes dermatitis with acanthosis and T-cell infiltration. *Eur J Immunol* 41:202–213 . doi: 10.1002/eji.201040675
- Thompson M, Andrade VA, Andrade SJ, et al (2003) Inhibition of the TEF/TEAD transcription factor activity by nuclear calcium and distinct kinase pathways. *Biochem Biophys Res Commun*

301:267–274 . doi: 10.1016/S0006-291X(02)03024-3

- Tinhofer I, Maly K, Dietl P, et al (1996) Differential Ca<sup>2+</sup> signaling induced by activation of the epidermal growth factor and nerve growth factor receptors. *J Biol Chem* 271:30505–30509 . doi: 10.1074/jbc.271.48.30505
- Traynor AM, Weigel TL, Oettel KR, et al (2013) Nuclear EGFR protein expression predicts poor survival in early stage non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 81:138–141 . doi: 10.1016/j.lungcan.2013.03.020
- Ullrich A, Schlessinger J (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61:203–212
- Vega QC, Cochet C, Filhol O, et al (1992) A site of tyrosine phosphorylation in the C terminus of the epidermal growth factor receptor is required to activate phospholipase C. *Mol Cell Biol* 12:128–135 . doi: 10.1128/mcb.12.1.128
- Wang SC, Nakajima Y, Yu YL, et al (2006) Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability. *Nat Cell Biol* 8:1359–1368 . doi: 10.1038/ncb1501
- Wang YN, Hung MC (2012) Nuclear functions and subcellular trafficking mechanisms of the epidermal growth factor receptor family. *Cell Biosci* 2:13 . doi: 10.1186/2045-3701-2-13
- Wang YN, Wang H, Yamaguchi H, et al (2010a) COPI-mediated retrograde trafficking from the Golgi to the ER regulates EGFR nuclear transport. *Biochem Biophys Res Commun* 399:498–504 . doi: 10.1016/j.bbrc.2010.07.096
- Wang YN, Yamaguchi H, Hsu JM, Hung MC (2010b) Nuclear trafficking of the epidermal growth factor receptor family membrane proteins. *Oncogene* 29:3997–4006
- Wang YN, Yamaguchi H, Huo L, et al (2010c) The translocon Sec61 $\beta$  localized in the inner nuclear membrane transports membrane-embedded EGF receptor to the nucleus. *J Biol Chem* 285:38720–38729 . doi: 10.1074/jbc.M110.158659
- Wheeler DL, Huang S, Kruser TJ, et al (2008) Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: Role of HER (ErbB) family members. *Oncogene* 27:3944–3956 . doi: 10.1038/onc.2008.19
- Wiederschain D, Wee S, Chen L, et al (2009) Single-vector inducible lentiviral RNAi system for oncology target validation. *Cell Cycle* 8:498–504 . doi: 10.4161/cc.8.3.7701
- Xiao DM, Jhang Ho P, Wang X, et al (2000) Phosphorylation of HMG-I by protein kinase C attenuates its binding affinity to the promoter regions of protein kinase C  $\gamma$  and neurogranin/RC3 genes. *J*

- Neurochem 74:392–399 . doi: 10.1046/j.1471-4159.2000.0740392.x
- Xiao W, Kashiwakura J, Ichi, Hong H, et al (2011) Phospholipase C- $\beta$ 3 Regulates Fc $\epsilon$ RI-Mediated Mast Cell Activation by Recruiting the Protein Phosphatase SHP-1. *Immunity* 34:893–904 . doi: 10.1016/j.immuni.2011.04.010
- Xu D, Marquis K, Pei J, et al (2015) LocNES: A computational tool for locating classical NESs in CRM1 cargo proteins. *Bioinformatics* 31:1357–1365 . doi: 10.1093/bioinformatics/btu826
- Xu TR, Rumsby MG (2004) Phorbol ester-induced translocation of PKC epsilon to the nucleus in fibroblasts: Identification of nuclear PKC epsilon-associating proteins. *FEBS Lett* 570:20–24 . doi: 10.1016/j.febslet.2004.05.080
- Yang YR, Follo MY, Cocco L, Suh PG (2013) The physiological roles of primary phospholipase C. *Adv. Biol. Regul.* 53:232–241
- Yarden Y, Sliwkowski MX (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:127–137
- Yoon SY, Jellerette T, Salicioni AM, et al (2008) Human sperm devoid of PLC, zeta 1 fail to induce Ca<sup>2+</sup> release and are unable to initiate the first step of embryo development. *J Clin Invest* 118:3671–3681 . doi: 10.1172/JCI36942
- Zanetti-Domingues LC, Korovesis D, Needham SR, et al (2018) The architecture of EGFR's basal complexes reveals autoinhibition mechanisms in dimers and oligomers. *Nat Commun* 9:4325 . doi: 10.1038/s41467-018-06632-0
- Zeng F, Harris RC (2014) Epidermal growth factor, from gene organization to bedside. *Semin. Cell Dev. Biol.* 28:2–11
- Zhang L, Malik S, Pang J, et al (2013) Phospholipase C $\epsilon$  Hydrolyzes Perinuclear Phosphatidylinositol 4-Phosphate to Regulate Cardiac Hypertrophy. *Cell* 153:216–227 . doi: 10.1016/j.cell.2013.02.047
- Zhang X, Gureasko J, Shen K, et al (2006) An Allosteric Mechanism for Activation of the Kinase Domain of Epidermal Growth Factor Receptor. *Cell* 125:1137–1149 . doi: 10.1016/j.cell.2006.05.013
- Zhao B, Wang L, Qiu H, et al (2017) Mechanisms of resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Oncotarget* 8:3980–4000 . doi: 10.18632/oncotarget.14012
- Zhao M, Sutherland C, Wilson DP, et al (2004) Identification of the linker histone H1 as a protein kinase C $\epsilon$ -binding protein in vascular smooth muscle. *Biochem Cell Biol* 82:538–546 . doi:

10.1139/o04-053

Zhou G, Seibenhener ML, Wooten MW (1997) Nucleolin is a protein kinase C- $\zeta$  substrate: Connection between cell surface signaling and nucleus in PC12 cells. *J Biol Chem* 272:31130–31137 . doi:

10.1074/jbc.272.49.31130

## Apêndice

### Apêndice A – Localização subcelular das PLC humanas

Para compreender a localização subcelular das PLC humanas, com sequências peptídicas depositadas e curada pela agência *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), foi utilizado o software DeepLoc (Almagro Armenteros et al. 2017). O DeepLoc usa o método de aprendizado de máquinas para comparar as sequências de proteínas eucarióticas conhecidas e de localização específica, assim como as sequências sinais para a decisão da probabilidade de se encontrar a proteína investigada em um determinado local na célula. Esse método apresenta 77% de acurácia na predição da localização subcelular. As tabelas 3 e 4 resumizam a probabilidade das PLC humanas serem encontradas em uma determinada localização subcelular e acoplada ou não à membrana celular respectivamente.

É possível inferir que a PLC $\gamma$ 1 tem a probabilidade (63%, 93%) de ser apresentada como uma proteína citoplasmática solúvel. A PLC $\gamma$ 2 (52%, 85%) como uma proteína nuclear e solúvel. A PLC $\beta$ 1 por sua vez, pode ser tanto citoplasmática, quanto nuclear (46% e 51% respectivamente) e solúvel (93%). A PLC $\beta$ 2 como proteína nuclear (70%) e solúvel (95%). Já a PLC $\beta$ 3 apresenta duas isoformas anotadas (isoformas 1 e 2) com probabilidade de 81% e 79% de ser apresentada como proteína nuclear e solúvel (89% e 85% respectivamente). A PLC $\beta$ 4 apresenta 4 isoformas anotadas (a, b, c, d) das quais as isoformas a e b são citoplasmáticas (60% e 61% respectivamente) e as isoformas c e d são tanto citoplasmáticas, quanto nucleares (52% e 45% para c e 50% e 47% para d). Todas as isoformas de PLC $\beta$ 4 são solúveis (95%). Da família delta, a PLC $\delta$ 1 é uma proteína acoplada à membrana plasmática (66%, 81%); a PLC $\delta$ 3, uma proteína nuclear, solúvel ou associada à membranas (42%, 42% e 53%); a PLC $\delta$ 4 por sua vez, é uma proteína nuclear e solúvel (68%, 91%). A PLC $\epsilon$ 1 apresenta 3 isoformas depositadas (1, 2 e 3), todas nucleares (68%, 67% e 59% respectivamente) e solúveis (74%, 64% e 78% respectivamente). A PLC $\eta$ 1 apresenta seis isoformas anotadas (a, b, c1, c2, d, e) das quais, todas são citoplasmáticas (65%, 64%, 65%, 65%, 67% e 70%) e solúveis (87%, 85%, 91%, 91%, 84% e 92%). A PLC $\eta$ 2 apresenta as isoformas 1, 2 e 3, todas citoplasmáticas (54%, 70% e 54%) e solúveis (83%, 92% e 86%). Finalmente, a PLC $\zeta$  apresenta três isoformas (1, 2, 3), das quais as isoformas 1 e 2 são encontradas tanto no compartimento citoplasmático, quanto no nuclear (38%, 30% - isoforma 1 e 41%, 50% - isoforma 2); a isoforma 3 é uma proteína nuclear (54%). Todas as isoformas de PLC $\zeta$ 1 são solúveis (85%, 96% e 93%, respectivamente).

Assim, é possível observar que a PLC $\gamma$ 2, apesar de pouco expressa fora de tecidos hematopoiéticos, é também uma possível candidata para iniciar a sinalização intranuclear de EGFR por conter domínio SH2 e SH3 que permite a interação entre a calda C-terminal fosforilada do EGFR à enzima.

Tabela 3 - Probabilidade de localização subcelular das PLC humanas anotadas no NCBI

PLC Acesso NCBI	Citoplasma	Núcleo	Membrana Plasmática	Complexo de Golgi	Lisossomo Vacúolo	Peroxisomo	Retículo Endoplasmático	Mitocôndria	Extracelular
PLC $\gamma$ 1 NP_002651.2	<b>0,6335</b>	0,3122	0,0241	0,0131	0,0078	0,0043	0,002	0,0012	0,0009
PLC $\gamma$ 2 NP_002652.2	0,3952	<b>0,5223</b>	0,0348	0,0154	0,0152	0,0083	0,0053	0,0019	0,0007
PLC $\beta$ 1 NP_056007.1	<b>0,4625</b>	<b>0,51</b>	0,0094	0,009	0,0039	0,0024	0,0004	0,0016	0,0001
PLC $\beta$ 2 NP_001271226.1	0,2692	<b>0,7094</b>	0,0082	0,0052	0,003	0,0024	0,0008	0,0011	0,0001
PLC $\beta$ 3-1 NP_000923.1	0,1661	<b>0,8164</b>	0,0036	0,006	0,0043	0,0025	0,0002	0,0006	0
PLC $\beta$ 3-2 NP_001171812.1	0,1851	<b>0,7981</b>	0,0047	0,0061	0,0032	0,0013	0,0003	0,001	0
PLC $\beta$ 4-a NP_000924.3	0,3762	<b>0,607</b>	0,0042	0,008	0,0029	0,001	0,0004	0,0002	0
PLC $\beta$ 4-b NP_001364065.1	0,3648	<b>0,6191</b>	0,0043	0,0068	0,0034	0,0008	0,0004	0,0002	0
PLC $\beta$ 4-c NP_001166117.1	<b>0,456</b>	<b>0,5266</b>	0,0052	0,0069	0,0036	0,0009	0,0004	0,0002	0
PLC $\beta$ 4-d NP_001364071.1	<b>0,4762</b>	<b>0,5043</b>	0,005	0,0092	0,0037	0,0009	0,0003	0,0002	0

PLC Acesso NCBI	Citoplasma	Núcleo	Membrana Plasmática	Complexo de Golgi	Lisossomo Vacúolo	Peroxisomo	Reticulo Endoplasmático	Mitocôndria	Extracelular
PLC $\delta$ 1 NP_001124436.1	0,0629	0,2168	<b>0,6639</b>	0,0353	0,0055	0,001	0,0027	0,0091	0,0008
PLC $\delta$ 3 NP_588614.1	0,2981	<b>0,4225</b>	0,0941	0,0511	0,0028	0,0006	0,0092	0,1005	0,0149
PLC $\delta$ 4 NP_116115.1	0,2797	<b>0,684</b>	0,0214	0,0033	0,0027	0,0056	0,0011	0,0011	0,0006
PLC $\epsilon$ 1 – 1 NP_057425.3	0,2639	<b>0,6795</b>	0,043	0,048	0,0032	0,0025	0,0003	0,0011	0,0003
PLC $\epsilon$ 1 – 2 NP_001159451.1	0,2441	<b>0,5956</b>	0,1291	0,01	0,0085	0,004	0,0016	0,0032	0,0018
PLC $\epsilon$ 1 – 3 NP_001275918.1	0,2571	<b>0,7013</b>	0,0302	0,0037	0,0025	0,0022	0,0003	0,001	0,0002
PLC $\eta$ 1 – a NP_001124432.1	<b>0,6546</b>	0,2797	0,0586	0,0036	0,0018	0,001	0,0002	0,0002	0,0002
PLC $\eta$ 1 – b NP_0055811.2	<b>0,645</b>	0,2774	0,0658	0,0048	0,003	0,0025	0,0004	0,0005	0,0004
PLC $\eta$ 1 – c1 NP_001124433.1	<b>0,6581</b>	0,3034	0,0287	0,0033	0,0044	0,0006	0,0003	0,0003	0,0008
PLC $\eta$ 1 – c2 NP_001336179.1	<b>0,6581</b>	0,3034	0,287	0,0033	0,0044	0,0006	0,0003	0,0003	0,0008 Cont. Tab. 3

PLC Acesso NCBI	Citoplasma	Núcleo	Membrana Plasmática	Complexo de Golgi	Lisossomo Vacúolo	Peroxisomo	Reticulo Endoplasmático	Mitocôndria	Extracelular
PLC $\eta$ 1 – d NP_001336180.1	<b>0,6757</b>	0,2412	0,0737	0,004	0,0024	0,0016	0,0003	0,0005	0,0004
PLC $\eta$ 1 – e NP_001336181.1	<b>0,7064</b>	0,2593	0,0237	0,0026	0,0042	0,0012	0,0003	0,0006	0,0011
PLC $\eta$ 2 -1 NP_055453.2	<b>0,5465</b>	0,3076	0,1303	0,0079	0,0026	0,0014	0,0008	0,0014	0,0013
PLC $\eta$ 2 -2 NP_001289941.1	<b>0,7029</b>	0,2415	0,0515	0,0017	0,0014	0,0004	0,0001	0,0002	0,0003
PLC $\eta$ 2 -3 NP_001289942.1	<b>0,5445</b>	0,3591	0,0805	0,0046	0,0021	0,0013	0,0002	0,0048	0,0013
PLC $\zeta$ 1 – 1 NP_149114.2	<b>0,3832</b>	<b>0,3068</b>	0,0611	0,0444	0,052	0,0115	0,1086	0,0153	0,0147
PLC $\zeta$ 1 – 2 NP_001317703.1	<b>0,4187</b>	<b>0,5007</b>	0,0557	0,0033	0,0029	0,0012	0,0033	0,0032	0,0104
PLC $\zeta$ 1 – 3 NP_001317698.1	0,3605	<b>0,5424</b>	0,0317	0,0107	0,0192	0,0036	0,0175	0,0078	0,0047

Valores variam de 0 a 1, sendo 1 - 100% e 0 - 0% de probabilidade da proteína inquerida estar no sublocal celular. Continuação tabela 3.

Tabela 4 - Probabilidade das PLC humanas anotadas no NCBI serem solúveis ou acoplada em membranas.

	<b>Solúvel</b>	<b>Membrana</b>		<b>Solúvel</b>	<b>Membrana</b>
PLC $\gamma$ 1	<b>0,9383</b>	0,0617	PLC $\epsilon$ 1-2	<b>0,6405</b>	0,3595
PLC $\gamma$ 2	<b>0,8558</b>	0,1442	PLC $\epsilon$ 1-3	<b>0,7873</b>	0,2127
PLC $\beta$ 1	<b>0,9331</b>	0,0669	PLC $\eta$ 1-a	<b>0,8705</b>	0,1295
PLC $\beta$ 2	<b>0,9547</b>	0,0453	PLC $\eta$ 1-b	<b>0,8513</b>	0,1487
PLC $\beta$ 3-1	<b>0,8921</b>	0,1079	PLC $\eta$ 1-c1	<b>0,9135</b>	0,0865
PLC $\beta$ 3-2	<b>0,8567</b>	0,1433	PLC $\eta$ 1-c2	<b>0,9135</b>	0,0865
PLC $\beta$ 4-a	<b>0,9514</b>	0,0486	PLC $\eta$ 1-d	<b>0,8499</b>	0,1501
PLC $\beta$ 4-b	<b>0,9594</b>	0,0406	PLC $\eta$ 1-e	<b>0,9212</b>	0,0788
PLC $\beta$ 4-c	<b>0,9532</b>	0,0468	PLC $\eta$ 2-1	<b>0,8308</b>	0,1692
PLC $\beta$ -d	<b>0,9569</b>	0,0431	PLC $\eta$ 2-2	<b>0,9237</b>	0,0763
PLC $\delta$ 1	0,1813	<b>0,8187</b>	PLC $\eta$ 2-3	<b>0,8695</b>	0,1305
PLC $\delta$ 3	<b>0,4672</b>	<b>0,5328</b>	PLC $\zeta$ 1-1	<b>0,8541</b>	0,1459
PLC $\delta$ 4	<b>0,9185</b>	0,0815	PLC $\zeta$ 1-2	<b>0,961</b>	0,039
PLC $\epsilon$ 1-1	<b>0,7445</b>	0,2555	PLC $\zeta$ 1-3	<b>0,936</b>	0,064

Valores variam de 0 a 1, sendo 0 - 0% e 1 - 100% da proteína inquerida ser associada à membrana ou solúvel.

## Apêndice B – Predição *in silico* de NLS e NES na PLC $\delta$ 4

As sequências de localização nuclear (NLS) são sequências peptídicas modulares suficientes para que as proteínas traduzidas no citoplasma sejam transportadas ao núcleo por auxílio de importinas pelo complexo do poro nuclear (Freitas and Cunha 2009). Os motivos NLS apresentam grande variedade, com diferentes tamanhos e características (Görlich 1997). Uma característica compartilhada por quase todas as sequências é a presença de trechos curtos de aminoácidos na sua maioria básicos com a sequência consenso K-K/R-X-K/R (Nair et al. 2003). Quando uma única sequência é capaz de gerar o transporte nuclear, essa sequência é chamada de monopartida. Por sua vez, quando essa sequência monopartida é separada por uma sequência variável, usualmente entre 9 e 12 aminoácidos, é chamada de bipartida. Essa sequência de que separa os motivos monopartidos pode ser ainda mais longa e pode também gerar motivos tripartidos (Nair et al. 2003; Hsu and Hung 2007; Freitas and Cunha 2009). Outros motivos para a sequência NLS são conhecidos, como o NLS prolina-tirosina (Freitas and Cunha 2009).

A sequência de exclusão nuclear (NES) é responsável por remover proteínas do núcleo celular e direcionar ao citoplasma, com auxílio de exportinas (Görlich and Kutay 1999). O motivo clássico para a NES contém de três a quatro aminoácidos hidrofóbicos, geralmente a leucina (Kutay and Güttinger 2005).

Pode-se observar após modelo preditivo e evidências experimentais que a PLC $\delta$ 4 é uma proteína majoritariamente nuclear (Apêndice A, Kunrath-Lima et. al. 2018). Contudo, não há NLS descrito para essa proteína. Dessa forma, buscamos identificar, utilizando modelos preditivos, a presença de NLS e NES na PLC $\delta$ 4. Essa identificação, permitirá a manipulação da sua sequência e com isso, identificar a maquinaria celular que permite a sua ativação pelo EGFR.

Quando a sequência da PLC $\delta$ 4 (NP\_116115.1, NCBI) foi interrogada para a presença de NLS, o software cNLSMapper retornou a sequência iniciando na posição 615 (Tabela 5) com pontuação de 6,8 (Kosugi et al. 2009). Segundo as diretrizes de pontuação desse software, essa pontuação indica que apenas parte das proteínas traduzidas são transportadas para o núcleo, permanecendo uma parte no citoplasma. Dessa forma, essa proteína não seria exclusivamente nuclear, assim como observado em experimentação. Quando interrogada no software NLStradamus, usando um corte de 0,5 sugerido pelos desenvolvedores, uma sequência NLS na posição 481 foi gerada (Nguyen Ba et al. 2009). Já o software SeqNLS, detectou uma sequência com início na posição 56, utilizando um corte de pontuação 0,86, permitindo melhor precisão (Lin and Hu 2013). O software PsortII, por sua vez, encontrou três sequências esparsas, a primeira na posição 81, a segunda na posição 481 e a terceira na posição 539. Entretanto, a pontuação estimada pelo software (0,44) coloca essa proteína como nuclear e citoplasmática (Nakai and Horton 1999). Utilizando o

NoD: *Nucleolar localization sequence detector*, foi retornado duas sequencias, uma de início na posição 21 e a outra na posição 472 (Scott et al. 2011).

Para a detecção de NES, os softwares NetNES e LocNES foram utilizados (La Cour et al. 2004; Xu et al. 2015). O primeiro retornou três regiões (posições 87, 248 e 461). O segundo, sete regiões (posições 73, 216, 491, 682, 684, 685, 687) (Tabela 5).

Tabela 5 - Tabela de sequências NLS e NES previstas para a PLC delta 4.

Software	Posição	Sequência	Pontuação*
cNLS Mapper	615-646	FHPEKPISPFKAQTLIQVISGQQLPKVDKTK	5,6
NLStradamus	481-486	KKKKSK	0,5
SeqNLS	22-30	MPMRKVRSK	0,86
	56-67	SAKPSFSISDVE	0,879
PsortII	81-87	PMRKVRS	0,44
	481-487	PEELRRK	0,44
	539-542	KKKK	0,44
NoD	21-45	GMPMRKVRSKSWKKLRYFRLQNDGM	0,85
	472-494	QEQLQNKDKKKKSKPILCPALS	0,85
NetNES	87	L	0,678
	248	L	0,515
	461	L	0,533
LocNES	73-87	HDSELLRSLAEELPL	0,345
	484-498	KSKPILCPALSSLVI	0,256
	491-505	PALSSLVIYLKSVSF	0,409
	682-696	YWGQTLCFRVLVPEL	0,376
	684-698	GQTLCFRVLVPELAM	0,236
	685-699	QTLCFRVLVPELAML	0,279
	687-701	LCFRVLVPELAMLR	0,357

\*As pontuações fornecidas por cada programa são diferentes em corte e interpretação. Maiores detalhes pode ser encontrado nos materiais e métodos – Apêndice B.

É interessante notar que há sobreposições entre a sequência gerada pelo SeqNLS e NoD (20-GMPMRKVRSKSWKKLRYFRLQNDGM-45) e sequências geradas pelo NLStradamus, PsortII e NoD (472-QEQLQNKDKKKKSKPILCPALS-494).

De posse dessas sequências pode ser possível gerar mutações sítio dirigidas para interromper parte dessas sequências, impedindo a localização nuclear da PLC $\delta$ 4 e com isso reafirmar a necessidade dessa PLC para a continuação da sinalização nuclear mediada por EGF/EGFR. Vale ressaltar, que algumas proteínas são transportadas ao núcleo e não apresentam sequências de localização nuclear caracterizada (Bauer et al. 2015). Isso pode acontecer com a PLC $\delta$ 4, fazendo com que as sequências previstas não necessariamente seriam responsáveis pela importe nuclear.

## Materiais e Métodos – Apêndice B

Para a gerar as sequências de exclusão ou de localização nuclear, foram utilizados softwares livres. O cNLSMapper disponível por Kosugi e colaboradores (2009), utiliza a estratégia de aprendizado de máquina para a geração de pontuação pela presença de sequências depositadas para NLS de classe 1/2, classe 3, classe 4 e bipartido. Essa pontuação varia de 0 a 10 e indica a atividade do NLS (Kosugi et al. 2009). O NLStradamus, Nguyen Ba e colaboradores (2009), utiliza a estatística baseada no modelo oculto de Markov (Nguyen Ba et al. 2009). Simplificadamente, são gerados dois estados representados como base, onde resíduos com a mesma frequência do genoma e uma base de dados NLS são gerados e serão comparadas com a sequência a ser interrogada. A sequência então, passa por um corte de probabilidade e contagem de predição e apenas aquelas que ultrapassam da linha de corte (semelhante ao corte de probabilidade) são devolvidas.

O SeqNLS utiliza sequências de localização nuclear com validação experimental, sequências lineares consensos e modelos de padrões sequenciais (geração de motivos que poderiam interferir na apresentação de um aminoácido) para a geração de uma pontuação. Uma pontuação de base é escolhida (os autores sugerem 0,86) onde se reduz os falsos positivos e aumenta a predição. As sequências devolvidas são apresentadas com pontuação próximo ou acima do corte (Lin and Hu 2013).

O programa PSORTII utiliza da estratégia de aprendizado de máquinas e compara sequências geradas por experimentação para a geração de uma pontuação. Os autores não discutem, contudo, a abrangência dessa pontuação (Nakai and Horton 1999).

O software NoD utiliza as sequências de proteínas conhecidas por se depositar e nucléolos e compara a sequência interrogada. Com isso, gera uma pontuação para cada sequência e apresenta aquelas que ultrapassam a do modelo validado (0,8) (Scott et al. 2011). Para prever aminoácidos que participam da NES, o software NetNES, de forma simplificada, busca na proteína interrogada, a sequência consenso LxxLxL (sendo L podendo ser L, I, V, F ou M), a isso, adiciona modelos probabilísticos de interação tridimensional e usa a estatística baseada em modelo oculto de Markov e redes neurais para a geração de uma pontuação. Essa pontuação quando maior que a pontuação de corte (0,5) é reconhecido como presente na sequência NES (La Cour et al. 2004).

Finalmente, o programa LocNES utiliza banco de dados de sequências NES para a geração de uma pontuação baseada em posição para cada 15 aminoácidos da proteína interrogada. A isso, é adicionado um cálculo para a propensão de desordem. A pontuação baseada na posição dos aminoácidos, somadas as pontuações da sequência de aminoácidos, propensão de desordem e as sequências consenso NES permite a formação da pontuação final. A validação dessa pontuação mostrou que valores maiores que 0,1 apresentam

68% de taxa *recall* (definida como a fração da NES real dividido pelo valor de corte) (Xu et al. 2015). A sequência peptídica da PLC $\delta$ 4 NP\_116115.1, recuperada na NCBI foi utilizada.

## Apêndice C – Publicação originada deste trabalho

Esse trabalho deu origem a um artigo publicado no periódico *Journal of Biological Chemistry* em setembro de 2019 (doi: 10.1074/jbc.RA118.006961).

### Epidermal growth factor (EGF) triggers nuclear calcium signaling through intra-nuclear phospholipase C delta-4 (PLC $\delta$ 4)

Marcelo Miranda de Coutinho<sup>1,6#</sup>, Michele Angela Rodrigues<sup>1,6#</sup>, Ana Carolina de Angelis Campos<sup>1,6#</sup>, Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria<sup>2#</sup>, Marianna Kunrath-Lima<sup>1</sup>, Gregory A. Mignery<sup>3</sup>, Deborah Schechtman<sup>4</sup>, Alfredo Miranda Goes<sup>5</sup>, Michael H. Nathanson<sup>6</sup>, and Dawidson A. Gomes<sup>1,6\*</sup>

From the <sup>1</sup>Department of Biochemistry and Immunology, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Antonio Carlos, 6627, Belo Horizonte – MG, 31270-901, Brazil; <sup>2</sup>Department of Physiology Sciences, Universidade Federal do Amazonas, Manaus - AM, Brazil; <sup>3</sup>Department of Cell and Molecular Physiology, Stritch School of Medicine, Loyola University Chicago, Maywood – IL, 60153, USA; <sup>4</sup>Department of Biochemistry, University of São Paulo. Av. Professor Lineu Prestes, 748, São Paulo – SP, 05508-900, Brazil; <sup>5</sup>Department of Pathology, UFMG; <sup>6</sup>Section of Digestive Diseases, Internal Medicine, Yale University. 333 Cedar St, New Haven – CT, 06520-8056, USA.

Running title: PLC $\delta$ 4 mediates EGF-induced Ca<sup>2+</sup> signals and cell proliferation

#Contributed equally

\*To whom correspondence should be addressed: Dawidson A. Gomes. E-mail: [dawidson@icb.ufmg.br](mailto:dawidson@icb.ufmg.br); Instituto de Ciências Biológicas, bloco Q4, sala 238. Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos, 6627. Belo Horizonte – MG, Zip Code: 31270-901, Brazil.

**Keywords:** EGFR, PI(4,5)P<sub>2</sub>, nucleus, calcium, PKC, Phospholipase C $\delta$ -4.

#### ABSTRACT

Calcium (Ca<sup>2+</sup>) signaling within the cell nucleus regulates specific cellular events such as gene transcription and cell proliferation. Nuclear and cytosolic Ca<sup>2+</sup> can be independently regulated, and nuclear translocation of receptor tyrosine kinases (RTKs) is one way to locally activate signaling cascades within the nucleus. Nuclear RTKs, including the epidermal growth factor receptor (EGFR), are important for processes such as transcriptional regulation, DNA-damage repair, and cancer therapy resistance. RTKs can hydrolyze phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>)

within the nucleus, leading to Ca<sup>2+</sup> release from the nucleoplasmic reticulum (NR) by inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (InsP<sub>3</sub>R). PI(4,5)P<sub>2</sub> hydrolysis is mediated by phospholipase C (PLC). However, it is unknown which nuclear PLC isoform is triggered by EGFR. This work investigated the role of PLC $\delta$ 4 in EGF-induced nuclear Ca<sup>2+</sup> signaling and downstream events. EGF-induced Ca<sup>2+</sup> signals were inhibited when EGFR nuclear translocation was impaired. Nuclear Ca<sup>2+</sup> signals also were reduced by selectively buffering inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP<sub>3</sub>) within the nucleus. EGF induced hydrolysis of

nuclear PI(4,5)P<sub>2</sub> by the intra-nuclear PLCδ4, rather than by PLCγ1. Moreover, the activity of protein kinase C (PKC), a downstream target of EGF, occurred in the nucleus of stimulated cells. Furthermore, PLCδ4 modulated cell cycle progression through the regulation of cyclins A and B1 expression. These data provide evidence that EGF-induced nuclear signaling is mediated by nuclear PLCδ4, and suggest new targets to modulate the proliferative effects of this growth factor.

## Introduction

The spatial-temporal distribution of calcium (Ca<sup>2+</sup>) signals contributes to the versatility of this second messenger (Berridge 2016). For example, increases in Ca<sup>2+</sup> within the cell nucleus selectively promote cellular events such as gene transcription (Pusl et al. 2002), cell proliferation and tumor growth (Rodrigues et al. 2007). Moreover, nuclear Ca<sup>2+</sup> signals can be regulated independently of cytosolic Ca<sup>2+</sup> signals (Hardingham et al. 1997). This is possible because the nucleus contains the machinery necessary for Ca<sup>2+</sup> mobilization (Echevarria et al. 2003; Gomes et al. 2006, 2008; Rodrigues et al. 2008). The nuclear envelope (NE) is contiguous with the endoplasmic reticulum (ER) (Subramanian and Meyer 1997). NE is a structure comprising two phospholipid bilayers [the outer nuclear membrane (ONM), inner nuclear membrane (INM)] and, an intermembrane space (IMS). The NE has invaginations of the INM or from both nuclear membranes that can reach deep within the nucleoplasm (Malhas et al. 2011). Because Ca<sup>2+</sup> is stored and released from IMS of the NE the name NR was suggested for this intranuclear network (5). InsP<sub>3</sub>R is found on both NE membranes (Matter et al. 1993; Stehno-Bittel et al. 1995; Echevarria et al. 2003). Intra-nuclear InsP<sub>3</sub> is formed from PI(4,5)P<sub>2</sub> hydrolysis, which is induced by growth factors such as hepatocyte growth factor (Gomes et al. 2008) and insulin (Rodrigues et al. 2008). Some RTKs undergo nuclear translocation upon activation, which appears necessary for initiation of nuclear Ca<sup>2+</sup> signals (Gomes et al. 2008; Rodrigues et al. 2008), so this could be one mechanism to regulate Ca<sup>2+</sup> release locally.

Nuclear localization of EGFR is of clinical relevance, as it is correlated with cancer prognosis (Brand et al. 2011) and relates to resistance to

various cancer therapies (Li et al. 2009; Huang et al. 2011). Nuclear EGFR function has been the subject of extensive investigation, as has been nuclear targets of EGFR. EGFR can shuttle from the cell surface to the nucleus (De Angelis Campos et al. 2011; Faraco et al. 2018) where it acts as a transcriptional regulator (Lin et al. 2001; Huo et al. 2010), transmits signals (Wang et al. 2006; Llicardi et al. 2011), and is involved in processes such as cell proliferation, tumor progression, and DNA repair and replication (Wang and Hung 2012). However, it is unknown if EGFR is linked to nuclear calcium release.

PLC could be involved in primary nuclear Ca<sup>2+</sup> signaling since activation of InsP<sub>3</sub> receptors generally is involved in the release of Ca<sup>2+</sup> in the nucleus (Bootman et al. 2009). In mammals, the PLC family is composed of 13 isozymes, divided into 6 classes: β, γ, δ, ε, ζ and η, according to their structures (Nakamura and Fukami 2017). All these isozymes catalyze the reaction of PI(4,5)P<sub>2</sub> cleavage, generating InsP<sub>3</sub> and diacylglycerol (DAG), but each one possesses unique physiological functions (Nakamura and Fukami 2017). Some PLCs are described within the nucleus in specific cell types such as PLCβ1, PLCγ1, PLCδ1, PLCδ4 and PLCζ (Leung et al. 2004; Faenza et al. 2013). The activity of these nuclear PLCs is related to the regulation of several cellular processes, such as proliferation and differentiation. These particular isoforms also have been linked to specific diseases, including myelodysplastic syndromes (PLCβ1), neurological diseases (PLCγ1) and infertility (PLCζ and PLCδ1-4) (Ratti et al. 2017).

PLCδ4 has been identified as a nuclear protein in different cell types and may be involved in proliferative processes (Lee and Rhee 1996; Nagano et al. 1999; Leung et al. 2004; Kunrath-Lima et al. 2018). It was first purified from regenerating rat liver protein extracts (Asano et al. 1994), and its gene was cloned (Liu et al. 1996) from a regenerating rat liver cDNA library, indicating a possible role of PLCδ4 in cell proliferation. Despite its nuclear localization, it is unknown how human PLCδ4 is activated within the nucleus. This work investigates whether EGFR activates nuclear Ca<sup>2+</sup> signaling via PLCδ4.

## Results

### ***EGFR translocates to the nucleus and induces Ca<sup>2+</sup> signals***

Stimulation with EGF induces its RTK EGFR to translocate to the nucleus (Faraco et al. 2018), similar to what has been shown for other RTKs, including the hepatocyte growth factor (HGF) receptor c-Met and the insulin receptor (Gomes et al. 2008; Rodrigues et al. 2008). EGFR translocated to the nucleus in both primary rat hepatocytes and SKHep-1 cells, a human liver cancer cell line (Fig. 1A). EGFR protein levels in the nuclear fraction were higher than in non-stimulated control cells as soon as 2.5 min after stimulation with EGF (Fig. 1A). In SKHep-1 cells, EGFR decreased in the non-nuclear fraction as it increased in the nuclear fraction. The peak of EGFR nuclear translocation in this cell line is at 10 min (Fig. 1A). Confocal immunofluorescence showed that EGFR accumulated in the nucleus within 10 min of exposure to EGF (Fig. 1B). EGF stimulation induces bigger EGFR clusters throughout the cells, including at the nucleus, as previously demonstrated (15). These data demonstrate that EGF induces EGFR to translocate to the nucleus. Translocation of EGFR to the nucleus depends on Clathrin-mediated endocytosis (De Angelis Campos et al. 2011), so we used Clathrin heavy chain 2 (CHC2) siRNAs to disrupt this endocytic pathway and thereby inhibit internalization of EGFR. Figure 1C shows that siRNA treatment reduced CHC2 expression by  $94 \pm 3\%$  using the CHC2 siRNA 1 and by  $87 \pm 8\%$  using the CHC2 siRNA 2, relative to control ( $p < 0.001$ ). Stimulation of control cells with EGF led to a gradual Ca<sup>2+</sup> increase with some superimposed oscillations, similar to the Ca<sup>2+</sup> signal pattern induced by other growth factors (Gomes et al. 2008; Rodrigues et al. 2008), but CHC2 knockdown diminished the peak of EGF-induced Ca<sup>2+</sup> signals by  $85 \pm 2\%$  ( $p < 0.001$ ) using the CHC2 siRNA 1 and by  $100 \pm 2\%$  ( $p < 0.001$ ) using the CHC2 siRNA 2, compared to control (Fig. 1D). This indicates that most of the Ca<sup>2+</sup> signals induced by EGF depend on EGFR internalization.

### ***EGF triggers intranuclear PI(4,5)P<sub>2</sub> hydrolysis and InsP<sub>3</sub> formation***

EGF induces intracellular Ca<sup>2+</sup> transients through InsP<sub>3</sub> (Moccia et al. 2003), so we investigated

whether EGF-induced InsP<sub>3</sub> formation in the nucleus was responsible for increasing intranuclear Ca<sup>2+</sup>. SKHep-1 cells were transfected with cytosolic or nuclear InsP<sub>3</sub>-buffer constructs whose targeting was confirmed by subcellular localization of the monomeric red fluorescent protein (mRFP) (Fig. 2A). Fluo-4/AM was used to monitor Ca<sup>2+</sup> release in response to EGF. Cytosolic InsP<sub>3</sub>-buffer decreased the Ca<sup>2+</sup> response by  $50.5 \pm 6.1\%$  in the nucleus and by  $53.8 \pm 4.5\%$  in the cytoplasm (Fig. 2B), but EGF-induced Ca<sup>2+</sup> signals were decreased by  $86 \pm 2.7\%$  in the nucleus and by  $96 \pm 3.9\%$  in the cytoplasm in cells expressing the nuclear InsP<sub>3</sub>-buffer (Fig. 2B). This suggests that EGF triggers nuclear Ca<sup>2+</sup> signals by inducing the formation of InsP<sub>3</sub> within the nucleus, similar to what has been observed in liver cells stimulated with HGF (Gomes et al. 2008) or insulin (Rodrigues et al. 2008). To investigate whether EGF induces nuclear PI(4,5)P<sub>2</sub> hydrolysis to produce InsP<sub>3</sub>, PI(4,5)P<sub>2</sub> was measured in nuclear fractions of hepatocytes. Nuclei from EGF-stimulated cells contained  $64 \pm 1.5\%$  less PI(4,5)P<sub>2</sub> than nuclei from control cells (Fig. 2D). These findings provide evidence that EGF triggers nuclear PI(4,5)P<sub>2</sub> hydrolysis and local InsP<sub>3</sub> production to generate Ca<sup>2+</sup> signals.

### ***EGF stimulates intra-nuclear PKC activity***

PI(4,5)P<sub>2</sub> hydrolysis generates not only InsP<sub>3</sub> but also DAG, which can activate PKC (Bootman et al. 2009). Increases in nuclear DAG can either participate in translocation of PKCs, from the cytosol to the nucleus, or can directly activate PKCs that reside in the nucleus (Martelli et al. 2006). To determine whether EGF triggers nuclear PKC activity, we used a Förster resonance energy transfer (FRET) reporter based on PKC activity and tagged to a nuclear localization signal (NucCKAR) (Gallegos et al. 2006). The nuclear localization of this construct was confirmed by intra-nuclear detection of cyan fluorescent protein (CFP) and yellow fluorescent protein (YFP) fluorescence by confocal microscopy (Fig. 3A). Decreased FRET (corresponding to an increased CFP/YFP emission ratio) indicates phosphorylation of the reporter by PKC. NucCKAR-expressing SKHep-1 cells were stimulated with EGF, phorbol 12-13-dibutyrate (PdBu) as a positive control for PKC activation, or arginine vasopressin (AVP) to reflect cytosolic activation of PKC, and then changes in FRET were

followed for 30 minutes (Fig. 3B). PdBu increased CFP/YFP emission of NucCKAR (Fig. 3b and 3c) and similar results were obtained with EGF treatment (Fig. 3B and 3C), indicating that either stimulus increases nuclear PKC activity. Unlike EGF, stimulation with AVP, which activates a prototypical G protein-coupled receptor in the plasma membrane, did not increase the CFP/YFP emission ratio of NucCKAR (Fig. 3B and 3C). This result suggests that subplasmalemmal formation of DAG in response to AVP does not activate nuclear PKC. Treatment with the broad-range PKC inhibitor Go6983 (Fig. 3D) decreased EGF-induced CFP/YFP emission ratio, providing additional evidence that EGF triggers PKC activity within the nucleus.

#### ***PLC $\gamma$ 1 is localized to the cytosol and PLC $\delta$ 4 is in the nucleus***

PLC mediates PI(4,5)P<sub>2</sub> hydrolysis (Ratti et al. 2017) and formation of InsP<sub>3</sub> and DAG (Lee and Rhee 1996; Nagano et al. 1999), so the relative role played by several candidate PLC isoforms during EGF stimulation was investigated. PLC $\gamma$ 1 is the primary isoform typically thought to bind to and be activated by RTKs (Berridge 2016). PLC $\delta$ 4 has been recognized as a predominantly nuclear PLC isoform, and its expression is increased in liver regeneration (Liu et al. 1996), so we compared the localization of these two isoforms in SKHep-1 cells. Confocal immunofluorescence showed that PLC $\gamma$ 1 is mostly localized to the cytosol, and this pattern does not change upon EGF stimulation (Fig. 4A). In contrast, PLC $\delta$ 4 was detected exclusively in the nucleus of SKHep-1 cells, demonstrated by both confocal microscopy (Fig. 4B) and western blot (not shown). The subcellular localization of these PLC isoforms was also assessed in primary rat hepatocytes. Similar to what was observed in SKHep-1 cells, PLC $\gamma$ 1 was found in non-nuclear fractions of both control and EGF-stimulated cells, whereas PLC $\delta$ 4 was only detected in the nuclear fractions (Fig. 4C). The amount of PLC $\gamma$ 1 or PLC $\delta$ 4 in each cell fraction was not altered by stimulation with EGF (Fig. 4C), indicating that there is no translocation of these PLCs between nuclear and non-nuclear compartments in response to EGF. Further examination showed that EGF stimulation for up to 10 min does not induce PLC $\gamma$ 1

to translocate from the cytoplasm to the nucleus (Fig. 4D).

#### ***PLC $\delta$ 4 participates in EGF-induced nuclear PI(4,5)P<sub>2</sub> hydrolysis, InsP<sub>3</sub> signaling, and PKC activity***

A siRNA approach was employed to determine the role of these two PLC isoforms in EGF-induced nuclear PI(4,5)P<sub>2</sub> hydrolysis and Ca<sup>2+</sup> signaling. Specific siRNAs reduced PLC $\gamma$ 1 expression by 90 ± 14% and 91 ± 27% using siRNA 1 and 2, respectively. PLC $\delta$ 4 expressions were reduced by 75 ± 7% and 86 ± 5% using siRNA 1 and 2, respectively (p<0.01) (Fig. 5A). Nuclear fractions were isolated from these cells after EGF stimulation and PI(4,5)P<sub>2</sub> was quantified. EGF significantly increase nuclear PI(4,5)P<sub>2</sub> hydrolysis in control siRNAs and PLC $\gamma$ 1 siRNA-treated cells, but not in PLC $\delta$ 4 siRNA-treated cells (Fig. 5B). Furthermore, cells treated with PLC $\delta$ 4 siRNAs blocked nuclear InsP<sub>3</sub> production and nuclear PKC activity, but not PLC $\gamma$ 1 siRNA-treated cells (Fig. 5B and C). These results suggest that PLC $\delta$ 4 but not PLC $\gamma$ 1 participates in nuclear PI(4,5)P<sub>2</sub> hydrolysis, InsP<sub>3</sub> production and PKC activation triggered by EGF stimulus. These results show that EGF mediates nuclear PI(4,5)P<sub>2</sub> hydrolysis, InsP<sub>3</sub> production and PKC activation via PLC $\delta$ 4.

#### ***PLC $\delta$ 4 participates in cell cycle progression***

Nuclear Ca<sup>2+</sup> is important for cell proliferation (Rodrigues et al. 2007), an important downstream effect of EGF. Therefore, we investigated whether PLC $\delta$ 4 is involved in EGFR-mediated cell proliferation. Cell proliferation was decreased by over 67% in cells in which PLC $\delta$ 4 expression was reduced (Fig. 6A). SKHep-1 proliferation is restored when PLC $\delta$ 4 expression is recovered (Figure S1). Cell death does not mediate the decreased proliferation since Annexin V-FITC, and propidium iodide assays did not reveal cell death between control and siRNA treated groups (Fig. 6B). Next, the role of PLC $\delta$ 4 in cell cycle progression was investigated. To understand the basis for this, the effects of PLC $\delta$ 4 on the expression of various cyclins was studied (Figure S1). Expression of cyclin B1, a G2/M-phase checkpoint protein, and cyclin A, an S-phase checkpoint protein, were decreased in PLC $\delta$ 4

knockdown cells compared to cells treated with control siRNA (Fig. 6C). Furthermore, nuclear InsP<sub>3</sub>-buffer also decrease the expression of cyclin A and B. These findings suggest that nuclear PLC $\delta$ 4 affects cell cycle progression, in part by affecting cyclin expression.

## Discussion

EGFR has several direct effects on signaling in the nucleus, including interaction with transcription factors (Shi et al. 2012) and phosphorylation (Wang et al. 2006). The current work extends this repertoire of intranuclear actions by showing that EGFR translocates to the nucleus of hepatic cells to initiate InsP<sub>3</sub>-mediated Ca<sup>2+</sup> signals. EGFR likely translocates from the plasma membrane to the nucleus via the ER (Huo et al. 2010; Wang and Hung 2012), and a similar trafficking route has been described for both viruses and toxins as well (Sandvig and Van Deurs 2002; Marsh and Helenius 2006; Carpenter and Liao 2009). Trafficking of other RTKs from the plasma membrane to the nucleus has also been described. For example, c-Met that is biotinylated at the plasma membrane can be recovered from the nucleus after cells are stimulated with HGF (Gomes et al. 2008). Similarly, fluorescently labeled EGF can be tracked from the cell membrane to the cell nucleus over a 10-minute period (Faraco et al. 2018). Furthermore, super-resolution imaging can be used to quantify the amount of EGF/EGFR clusters that accumulate in the nucleus (Faraco et al. 2018). The peak in nuclear translocation of EGFR coincides with the peak in Ca<sup>2+</sup> signals (Figure 1C). The current work builds on the previous observation that translocation of EGFR to the nucleus depends on dynamin and clathrin-mediated endocytosis (De Angelis Campos et al. 2011) by showing that knockdown of clathrin reduces EGF-induced Ca<sup>2+</sup> signals. These findings are consistent with the idea that EGFR must translocate to the nucleus in order to initiate nuclear Ca<sup>2+</sup> signals, similar to what has been shown for c-Met (Gomes et al. 2008).

Ca<sup>2+</sup> signaling in the nucleus rather than cytosol is important for proliferation and tumor growth (Rodrigues et al. 2007). Nuclear Ca<sup>2+</sup> also can regulate gene expression (Hardingham et al. 1997; Puls et al. 2002). Thus, increases in nuclear Ca<sup>2+</sup> could be one mechanism for EGF to promote those cellular processes. The nucleus contains the

machinery necessary for InsP<sub>3</sub> receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> release (Echevarria et al. 2003; Gomes et al. 2008; Rodrigues et al. 2008; Bootman et al. 2009). Although PLC-mediated PI(4,5)P<sub>2</sub> hydrolysis and formation of InsP<sub>3</sub> and DAG within the cytoplasm has been described extensively (Berridge 2016), there are fewer studies showing that PI(4,5)P<sub>2</sub> hydrolysis also occurs within the nucleus. The current work provides evidence that EGF triggers PI(4,5)P<sub>2</sub> hydrolysis and InsP<sub>3</sub> formation within the nucleus (Fig. 2), similar to what has been observed in response to stimulation with HGF (Gomes et al. 2008) or insulin (Rodrigues et al. 2008).

PLC within the nucleus is involved in signal transduction pathways that are separate from those activated by isoforms localized in other compartments (Follo et al. 2009). The most common paradigm links PLC beta isoforms with G protein-coupled receptors, whereas RTKs typically are associated with PLC gamma isoforms (Nishibe et al. 1990). For example, activated nuclear metabotropic glutamate 5 (mGlu5) receptor couples to G<sub>q/11</sub> and a nuclear isoform, PLC $\beta$ 1 to generate the InsP<sub>3</sub>-mediated release of Ca<sup>2+</sup> from Ca<sup>2+</sup>-release channels in the nucleus of primary striatal neurons (Kumar et al. 2008). The current work provides evidence that EGF induces hydrolysis of nuclear PI(4,5)P<sub>2</sub> by the intra-nuclear PLC $\delta$ 4, rather than by PLC $\gamma$ 1 (Figure 4). It remains unclear whether PLC $\delta$ 4 is activated directly or indirectly, as a direct binding of PLC $\delta$ 4 with nuclear EGFR could not be demonstrated by co-immunoprecipitation (not shown).

There are a number of previous studies about the function of nuclear PLCs. Some studies suggest that PLC positively regulates the cell cycle. PLC $\beta$ 1 can regulate IGF (insulin-like growth factor)-1-stimulated DNA synthesis and its overexpression increases proliferation in the absence of mitogenic stimuli (Manzoli et al. 1997; Faenza et al. 2007). Furthermore, PLC $\beta$ 1 in the nucleus regulates transcriptional levels of genes such as cyclin D3 and c-jun activation in skeletal muscle cells (Faenza et al. 2007; Ramazzotti et al. 2008). The present study demonstrates that PLC $\delta$ 4 also plays a role in cellular proliferation and specifically in cell-cycle control. Knockdown of PLC $\delta$ 4 leads to decreased cell proliferation without affecting apoptosis in SKHep-1 cells (Figure 6). The cell cycle profile is accompanied by reduced expression of cyclins A, B1 and H (Figure 6). Consistent with

this, decreased cyclin B1 could interfere with the transition through the G2/M phase of the cell cycle. Nuclear PLC $\delta$ 4 expression dramatically increases during the transition from G1 to S-phase and this expression pattern continues till the end of M-phase (Kim et al. 1999a). This is consistent with the current observation that PLC $\delta$ 4 knockdown increases the fraction of cells in G1 and G2/M phase and reduces S phase cells compared to control. Furthermore, it was demonstrated that PLC $\delta$ 4 knockdown impaired human mesenchymal stem/stromal cells proliferation, without inducing cell death (Kunrath-Lima et al. 2018).

The direct target of PLC signaling is typically PKC, which is activated by the PI(4,5)P<sub>2</sub> hydrolysis products DAG and InsP<sub>3</sub> (Martelli et al. 2006). Because EGF activates PKC within the nucleus (Figure 3), and several nuclear proteins are PKC substrates, this may also be relevant for processes such as gene expression and changes in chromatin structure (Huang et al. 2004). Activation of PKC may affect cell cycle progression as well (Parekh et al. 2000; Fima et al. 2001). PKC $\alpha$  is necessary for PLC $\beta$ 1 mediated regulation of cyclin D3 and cell proliferation in human erythroleukemia cells (Poli et al. 2013), and PKC $\alpha$  regulates cyclin B1 leading to effects on G2/M transition. PKC inhibitors can decrease cyclin B1 expression consequent to PKCs down-regulation (Poli et al. 2014). The increase in nuclear DAG level observed during the G2 phase is sufficient to activate nuclear PKC $\alpha$ /PKC $\beta$ . PKC phosphorylates Lamin B1 at sites involved in mitotic disassembly of the nuclear lamina, one of the most critical events in the G2/M transition (Fiume et al. 2009).

In light of these consideration, the current findings identify novel signaling events that may link EGFR nuclear translocation to stimulation of cell growth (Fig. 7). Activation of this signaling pathway may, in turn, be important for hepatocytes proliferation, especially because liver regeneration is absolutely dependent on the presence of either EGF or HGF (Michalopoulos 2017). This also is consistent with the observation that PLC $\delta$ 4 expression is increased in liver regeneration as well as in liver cancer cell lines (Liu et al. 1996). It furthermore is consistent with data from PLC $\delta$ 4 knockout mice that show increases in Bromodeoxyuridine (BrdU) are delayed after partial hepatectomy, although liver regeneration is not delayed (Akutagawa et al. 2006). Therefore, strategies to selectively inhibit

PLC $\delta$ 4 could be important for selective inhibition of liver cancer, which is the third leading cause of cancer death worldwide.

## Experimental procedures

### *Cell culture and EGF stimulus*

The SKHep-1 is a human liver cancer cell line (ATCC, VA, USA). It was cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified Eagle's medium (Life Technologies, CA, USA) containing 10% fetal bovine serum, 1 mM sodium pyruvate, 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin (Life Technologies).

Hepatocytes were isolated from healthy male Sprague Dawley rats (190-200g; Charles River Laboratories, MA, USA), as described previously (Boyer et al. 1990). Primary cells were cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> in Williams' medium E (Life Technologies) containing 10% fetal bovine serum, 100 units/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin and plated on collagen-coated coverslips (50 µg/mL) (BD Biosciences, CA, USA). Hepatocytes were used within 24 hours of isolation.

Serum-starved (14-16 hours) cells were treated with 100 ng/mL human recombinant EGF (Life Technologies) or recombinant rat EGF (R&D Systems, MN, USA) at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>.

### *Subcellular fractionation and western blot*

Cells were washed twice with ice-cold 10 mM phosphate-buffered saline pH 7.4 (PBS) (Sigma-Aldrich, CA, USA), harvested by scraping, and lysed in a buffer with 20 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid, pH 7.0, 10 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% Nonidet P-40. After incubation on ice for 10 minutes, the cells were homogenized by vortex. The homogenate was centrifuged at 1,500g for 5 min to sediment the nuclei. The supernatant was then centrifuged at a maximum speed of 16,100g for 20 min, and the resulting supernatant formed the non-nuclear fraction. The nuclear pellet was washed three times with lysis buffer to remove any contamination from cytoplasmic membranes. The isolated nuclei were resuspended in NETN buffer (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5% Nonidet P-40), and the mixture was sonicated briefly to aid nuclear lysis. Nuclear lysates were collected after centrifugation at 16,100g for 20 min at 4°C.

Protease and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich) were added to all buffers. Proteins were quantified by Bradford assay (Sigma-Aldrich). Western blotting was performed and detected as described previously (Gomes et al. 2008). In Brief, primary antibodies used were: rabbit polyclonal anti-EGFR (1:500, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA, cat. SC3), mouse monoclonal anti-EGFR clone 8G6.2 (1:500, Millipore/Sigma-aldrich, cat. 05-1047), mouse monoclonal anti- $\alpha$ -Tubulin (1:2000, Sigma-Aldrich, cat. T6199), rabbit polyclonal anti-Lamin B1 (1:2000, Abcam, MA, USA, cat. ab16048), monoclonal anti-Clathrin (1:500, Abcam, cat. b21679), mouse monoclonal anti-PLC $\gamma$ 1 (1:1000, Cell Signaling Technology, MA, USA, cat. I2822) and rabbit polyclonal anti-PLC $\delta$ 4 (1:500, Santa Cruz Biotechnology, cat. H-250), rabbit polyclonal Erk1/2 (1:1000; Cell Signaling, cat. 9101), rabbit monoclonal anti-phospho-Erk1/2 T202/Y204 (1:1000; Cell Signaling, cat. 4370), rabbit monoclonal anti-AKT (1:1000, Cell Signaling, cat. 4691), rabbit monoclonal anti-phospho-AKT T308 (1:1000; Cell Signaling, cat. 13038), cyclins A, B1, D1, D2, D3, E, E2 and H (1:500 to 1000, Cell Signaling Technology, Kit cat. 9869). The membranes were developed using ECL Plus (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA). Subsequently, the films were scanned and analyzed using Image J software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). All the antibodies used presented the correct molecular weight by western blot. The antibodies for Clathrin, PLC $\delta$ 4 and PLC $\gamma$ 1 were validated with at least two specific siRNAs.

### ***Immunofluorescence***

Confocal immunofluorescence was performed as described previously (Faraco et al. 2018). In brief, cells were labeled with rabbit polyclonal anti-EGFR (1:250, Santa Cruz Biotechnology, cat. SC3) or mouse monoclonal anti-EGFR clone 8G6.2 (1:200, Millipore/Sigma-Aldrich, cat. 05-1047), rabbit polyclonal anti-PLC $\gamma$ 1 (1:200, Cell Signaling, I2822) and polyclonal anti-PLC $\delta$ 4 (Santa Cruz Biotechnology, cat. H-250) and then incubated with secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488 or 546 (Life Technologies). Hoechst 33342 (Life Technologies) was used as a marker for the nuclear compartment. Images were collected using a Leica SP8 Gated STED with a 100X, 1.4 NA objective lens.

### ***siRNA transfection***

Cells were transfected using Lipofectamine RNAiMAX reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. 50 nM siRNAs were used for Clathrin Heavy Chain knockdown (CHC2 siRNA 1, 5'-GCAAUUAUUAAGGCUGACCGUAtt-3', Life Technologies, cat. s223263; CHC2 siRNA 2, 5'-AGGUGGCUUCUAAAUAUCAUGAACA-3', IDT, cat. hs.Ri.CLTC.13.1). 25 nM siRNAs were used for PLC $\gamma$ 1 knockdown (PLC $\gamma$ 1 siRNA 1, 5'-GAAUCGUGAGGAUCGUAUAtt-3', Life Technologies, cat. s10632; and PLC $\gamma$ 1 siRNA 2, 5'-GACCUCAUCAGCUACUAUGAGAAAC-3', IDT, cat. hs.Ri.PLCG1.13.1). For PLC $\delta$ 4 knockdown 50 nM of the following siRNAs were used: ON-TARGETplus SMARTpool (PLC $\delta$ 4 siRNA 1, 5'-CAAGAAGUUCAGCGGUUAU-3', 5'-GCUCAAUCCCAUACCGACA-3', 5'-GACC AAUGGCUGAGCGAUU-3', CAACAAGGUU ACCGCCACA Dharmacon, CO, USA, cat. L-005065-01) and PLC $\delta$ 4 siRNA 2 (5'-AAGGCA GGUUGCAACUAGAAAUUCA-3', IDT, cat. hs.Ri.PLCD4.13.3.). 50 nM of the following non-targeting siRNAs were used: Silencer™ Select Negative Control No. 2 siRNA (control siRNA 1, Life Technologies, cat. 4390846,) and IDT Scrambled negative control DsiRNA (control siRNA 2, 5'-CUUCCUCUCUUUCUCUCCCUU GUGA-3', cat. 51-01-19-08). Further analysis was performed 48 h after transfection.

### ***InsP<sub>3</sub>-buffer constructs and calcium imaging***

Generation of InsP<sub>3</sub>-buffer constructs was as described previously (Gomes et al. 2008). Briefly, the InsP<sub>3</sub> binding domain (residues 224-605) of the human type I InsP<sub>3</sub> receptor was tagged with a mRFP and with a nuclear localization signal or nuclear exclusion signal to generate the nuclear and cytosolic constructs, respectively. The adenovirus were built by ViraQuest Inc. Cells were infected with 10 MOIs and analysis performed in 48 hours. For calcium imaging cells were incubated with 5  $\mu$ M Fluo-4/AM (Life Technologies) and placed in a custom-made perfusion chamber for EGF stimulation. Images were collected with a Zeiss LSM 710 DUO NLO. Nuclear and cytosolic regions were selected with the assistance of the brightfield images.

### ***Nuclear PI(4,5)P<sub>2</sub> extraction and detection***

PI(4,5)P<sub>2</sub> from samples was detected by a mass ELISA assay kit (Echelon Biosciences, UT, USA). Upon 5 min EGF stimulation cell nuclei were isolated as previously described (Gomes et al. 2008; Rodrigues et al. 2008), washed three times with PBS and followed with PI(4,5)P<sub>2</sub> extraction as recommended by the kit manufacturer. In summary, the protein was precipitated with 0.5 M trichloroacetic acid and following with neutral lipid extraction using MeOH:CHCl<sub>3</sub> (2:1) and acidic lipid extracted with MeOH:CHCl<sub>3</sub>:12 M HCl (80:40:1). Lipids collected from split organic phase were dried before analysis.

### ***FRET-based PKC activity reporter***

The NucCKAR construct was developed by Gallegos and colleagues (Gallegos et al. 2006) and obtained from Addgene (plasmid # 14869). Cells were transfected using Fugene6 (Promega) and microscope studies performed in 48 hours. 250 nM phorbol-12,13-dibutyrate (PdBu) (Sigma-Aldrich) was used as a positive control. 250 nM Gö6983 (Tocris Bioscience, Bristol, UK) was used as a PKC inhibitor to confirm the specificity of EGF response. Cells were placed in a custom-made perfusion chamber for agonist stimulation. Cyan fluorescent protein (CFP) and yellow fluorescent protein (YFP) emission intensity were collected using a Zeiss LSM 710 DUO NLO with a 63X, 1.4 NA objective lens. CFP/YFP emission ratio was calculated and normalized using Microsoft Excel software.

### ***FRET-based InsP<sub>3</sub> reporter***

The FRET-based InsP<sub>3</sub>-biosensor with nuclear localization signal (FIRE-1nuc) was developed by Kapoor and colleagues (Kapoor et al. 2014). Cells were transfected using Fugene6 (Promega) and microscope studies performed in 48 h. Cells were placed in a custom-made perfusion chamber for agonist stimulation. Cyan fluorescent protein (CFP) and yellow fluorescent protein (YFP) emission intensity were collected using a Zeiss LSM 710 DUO NLO with a 63X, 1.4 NA objective lens. YFP/CFP emission ratio was calculated and normalized using ZEN (Zeiss), Microsoft Excel and GraphPad Prism software.

### ***Proliferation assay***

SKHEP-1 cells were seeded into 96-well plates

(Corning, NY, USA) at a density of 1x10<sup>4</sup> and transfected with Lipofectamine RNAiMAX with control siRNAs, PLCδ4 siRNAs, and PLCγ1 siRNAs. The cells were transfected with 50 nM of each siRNA. Cells without transfection reagent and with Lipofectamine were used as a control group. The Cell Proliferation Elisa kit (ROCHE, offered by Sigma-Aldrich, CA) was used according to manufacturer instructions. Briefly, after 48 h, cells were cultivated with BrdU (0.2 μM) for two hours in serum-free media, fixated for 30 min and incubated with anti-BrdU-POD for 90 min at room temperature. After three washing steps, TMB was added, and the plate was read at 370 and 492 nm (Synergy 2, Biotek).

For the proliferation recovery experiment, the Tet-pLKO-neo plasmid was used to express shRNAs (Addgene ID. 21916) under the control of doxycycline promoter. The PLCD4 shRNAs target sequences were obtained from “The RNAi Consortium collection” (<https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/>), and the shRNA were designed and cloned according to Addgene instructions. In summary, shRNA sequences were subcloned into Tet-pLKO-neo after digestion with AgeI and EcoRI. We used the following target sequences for the shRNAs: PLCδ4 shRNA 1 (5'-AGAGCAGC GTCGAGGGGATATA-3'), PLCδ4 shRNA 2 (5'-ACTACCACTTCTACGAGATAT-3'), scramble shRNA 1 (5'-CCTAAGGTTAAGT CGCCCTCG-3') and scramble shRNA 2 (5'-CUUCCUCUCUUUCUCUCCCUUGUGA-3'). SKHEP-1 cells were transfected and selected with 500 ng/mL of G418. Stable cells were treated with 1 μg/mL doxycycline for 48 h and then were kept without doxycycline for another 48 h for PLCδ4 expression recovery. BrdU assay was performed as described above.

### ***Cell death assay***

For this experiment, the cells were incubated with 10 μg/mL doxorubicin for 24 h, as a positive control for cell death. The cells were incubated with Annexin V-FITC (Life Technologies) and propidium iodide (Life Technologies) for 1 h. Images were collected with a 10X and 20X objective lens on an Olympus IX70 inverted fluorescence microscopy (Olympus America, Melville, NY), the data obtained were quantified by counting cell labeled for Annexin V-FITC, PI, double-labeled and crossed with Bright-field

images were used to obtain total cell count. Each treatment was made in triplicate, three different images were counted, and the means were used for statistical analysis.

***Statistical analysis***

The significance of changes in treatment groups was determined by Student's t-test or one-way analysis of variance and Bonferroni's multiple comparison tests, using GraphPad Prism software. Data are represented as mean  $\pm$  S.E.

### Acknowledgments

This work was supported by the NIH grants R03 TW08709, P01 DK57751, P30 DK34989, S10 OD023598 and R01 DK45710, DK114041 and DK112797, and by grants from the “*INCT-Regenera*”, “*Rede Mineira de Engenharia de Tecidos e Terapia Celular* (REMETTEC, RED-00570-16),” FAPEMIG, CAPES, and CNPq. The authors also thank “*Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do ICB/UFMG*” (CAPI) for technical support.

### Conflict of interest

We declare that there are no conflicts of interest.

### References

- Abate C, Marshak DR, Curran T (1991) Fos is phosphorylated by p34(cdc2) cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C at multiple sites clustered within regulatory regions. *Oncogene* 6:2179–2185
- Agustoni F, Suda K, Yu H, et al (2019) EGFR-directed monoclonal antibodies in combination with chemotherapy for treatment of non-small-cell lung cancer: an updated review of clinical trials and new perspectives in biomarkers analysis. *Cancer Treat. Rev.* 72:15–27
- Akutagawa A, Fukami K, Banno Y, et al (2006) Disruption of phospholipase C $\delta$  gene modulates the liver regeneration in cooperation with nuclear protein kinase C. *J Biochem* 140:619–625 . doi: 10.1093/jb/mvj194
- Allen V, Swigart P, Cheung R, et al (1997) Regulation of inositol lipid-specific phospholipase C $\delta$  by changes in Ca<sup>2+</sup> ion concentrations. *Biochem J* 327:545–552 . doi: 10.1042/bj3270545
- Almagro Armenteros JJ, Sønderby CK, Sønderby SK, et al (2017) DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. *Bioinformatics* 33:3387–3395 . doi: 10.1093/bioinformatics/btx431
- Altman A, Kong K-F (2016) Protein Kinase C Enzymes in the Hematopoietic and Immune Systems. *Annu Rev Immunol* 34:511–538 . doi: 10.1146/annurev-immunol-041015-055347
- Ando T, Xiao W, Gao P, et al (2014) critical role for mast cell Stat5 activity in skin inflammation. *Cell Rep* 6:366–376 . doi: 10.1016/j.celrep.2013.12.029
- Asano M, Tamiya-Koizumi K, Homma Y, et al (1994) Purification and characterization of nuclear phospholipase C specific for phosphoinositides. *J Biol Chem* 269:12360–12366
- Bae YS, Cantley LG, Chen CS, et al (1998) Activation of phospholipase C- $\gamma$  by phosphatidylinositol 3,4,5- trisphosphate. *J Biol Chem* 273:4465–4469 . doi: 10.1074/jbc.273.8.4465
- Bauer NC, Doetsch PW, Corbett AH (2015) Mechanisms Regulating Protein Localization. *Traffic* 16:1039–1061
- Bauer PI, Farkas G, Buday L, et al (1992) Inhibition of DNA binding by the phosphorylation of poly ADP-ribose polymerase protein catalysed by protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 187:730–736 . doi: 10.1016/0006-291X(92)91256-P
- Berridge MJ (2016) The inositol trisphosphate/calcium signaling pathway in health and disease. *Physiol Rev* 96:1261–1296 . doi: 10.1152/physrev.00006.2016
- Bitler BG, Goverdhan A, Schroeder JA (2010) MUC1 regulates nuclear localization and function of the epidermal growth factor receptor. *J Cell Sci* 123:1716–1723 . doi: 10.1242/jcs.062661
- Bootman MD, Fearnley C, Smyrniak I, et al (2009) An update on nuclear calcium signalling. *J Cell Sci* 122:2337–2350 . doi: 10.1242/jcs.028100
- Boyer JL, Phillips JM, Graf J (1990) Preparation and specific applications of isolated hepatocyte couplets. *Methods Enzymol* 192:501–516 . doi: 10.1016/0076-6879(90)92090-Z
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254 . doi: 10.1016/0003-

- 2697(76)90527-3
- Brand TM, Iida M, Li C, Wheeler DL (2011) The nuclear epidermal growth factor receptor signaling network and its role in cancer. *Discov Med* 12:419–432
- Brand TM, Iida M, Luthar N, et al (2013) Nuclear EGFR as a molecular target in cancer. *Radiother. Oncol.* 108:370–377
- Bunney TD, Katan M (2011) PLC regulation: Emerging pictures for molecular mechanisms. *Trends Biochem. Sci.* 36:88–96
- Calcerrada MC, Miguel BG, Martín L, et al (2002) Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in nuclear translocation of protein kinase C  $\zeta$  induced by C2-ceramide in rat hepatocytes. *FEBS Lett* 514:361–365 . doi: 10.1016/S0014-5793(02)02401-8
- Carpenter G, Liao HJ (2009) Trafficking of receptor tyrosine kinases to the nucleus. *Exp Cell Res* 315:1556–1566 . doi: 10.1016/j.yexcr.2008.09.027
- Chen Y, Wang X, Di L, et al (2008) Phospholipase C $\gamma$ 2 mediates RANKL-stimulated lymph node organogenesis and osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 283:29593–29601 . doi: 10.1074/jbc.M802493200
- Chou RH, Wang YN, Hsieh YH, et al (2014) EGFR Modulates DNA Synthesis and Repair through Tyr Phosphorylation of Histone H4. *Dev Cell* 30:224–237 . doi: 10.1016/j.devcel.2014.06.008
- Clayton AHAA, Walker F, Orchard SG, et al (2005) Ligand-induced dimer-tetramer transition during the activation of the cell surface epidermal growth factor receptor-A multidimensional microscopy analysis. *J Biol Chem* 280:30392–30399 . doi: 10.1074/jbc.M504770200
- Cocco L, Follo MY, Faenza I, et al (2011) Physiology and pathology of nuclear phospholipase C  $\beta$ 1. *Adv. Enzyme Regul.* 51:2–12
- Cuneo KC, Nyati MK, Ray D, Lawrence TS (2015) EGFR targeted therapies and radiation: Optimizing efficacy by appropriate drug scheduling and patient selection. *Pharmacol. Ther.* 154:67–77
- De Angelis Campos AC, Gomes DA (2014) REGULAÇÃO DO CÁLCIO NUCLEAR PELO RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL (EGFR). Universidade Federal de Minas Gerais
- De Angelis Campos AC, Rodrigues MA, de Andrade C, et al (2011) Epidermal growth factor receptors destined for the nucleus are internalized via a clathrin-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 412:341–346 . doi: 10.1016/j.bbrc.2011.07.100
- De Pasquale V, Pezone A, Sarogni P, et al (2018) EGFR activation triggers cellular hypertrophy and lysosomal disease in NAGLU-depleted cardiomyoblasts, mimicking the hallmarks of mucopolysaccharidosis IIIB. *Cell Death Dis* 9: . doi: 10.1038/s41419-017-0187-0
- Deacon EM, Pettitt TR, Webb P, et al (2002) Generation of diacylglycerol molecular species through the cell cycle: A role for 1-stearoyl, 2-arachidonoyl glycerol in the activation of nuclear protein kinase C- $\beta$ II at G2/M. *J Cell Sci* 115:983–989
- Demory ML, Boerner JL, Davidson R, et al (2009) Epidermal growth factor receptor translocation to the mitochondria. *J Biol Chem* 284:36592–36604 . doi: 10.1074/jbc.M109.000760
- Dempsey EC, Newton AC, Mochly-Rosen D, et al (2000) Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. In: *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology.* pp L429–L438
- Dittmann K, Mayer C, Fehrenbacher B, et al (2005) Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 280:31182–31189 . doi: 10.1074/jbc.M506591200
- Dittmann K, Mayer C, Fehrenbacher B, et al (2010) Nuclear EGFR shuttling induced by ionizing radiation is regulated by phosphorylation at residue Thr654. *FEBS Lett* 584:3878–3884 . doi: 10.1016/j.febslet.2010.08.005
- Divecha N, Banfić H, Irvine RF (1991) The polyphosphoinositide cycle exists in the nuclei of Swiss 3T3 cells under the control of a receptor (for IGF-I) in the plasma membrane, and stimulation of the cycle increases nuclear diacylglycerol and apparently induces translocation of protein kinase. *EMBO J* 10:3207–3214 . doi: 10.1002/j.1460-2075.1991.tb04883.x

- Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JI (1997) Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration. *Nature* 386:855–858 . doi: 10.1038/386855a0
- Downward J, Parker P, Waterfield MD (1984) Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor. *Nature* 311:483–485 . doi: 10.1038/311483a0
- Echevarria W, Leite MF, Guerra MT, et al (2003) Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol* 5:440–446 . doi: 10.1038/ncb980
- Elliget KA, Phelps PC, Smith MW (1996) Transforming growth factor  $\beta$  modulation of the epidermal growth factor Ca<sup>2+</sup> signal and c-fos oncoprotein levels in A431 human epidermoid carcinoma cells. *Cell Growth Differ* 7:461–468
- Eun JR, Jung YJ, Zhang Y, et al (2014) Hepatoma SK Hep-1 cells exhibit characteristics of oncogenic mesenchymal stem cells with highly metastatic capacity. *PLoS One* 9:e110744 . doi: 10.1371/journal.pone.0110744
- Faenza I, Fiume R, Piazzini M, et al (2013) Nuclear inositide specific phospholipase C signalling - Interactions and activity. *FEBS J.* 280:6311–6321
- Faenza I, Ramazzotti G, Bavelloni A, et al (2007) Inositide-dependent phospholipase C signaling mimics insulin in skeletal muscle differentiation by affecting specific regions of the cyclin D3 promoter. *Endocrinology* 148:1108–1117 . doi: 10.1210/en.2006-1003
- Faraco CCF, Faria JAQA, Kunrath-Lima M, et al (2018) Translocation of Epidermal Growth Factor (EGF) to the nucleus has distinct kinetics between adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and a mesenchymal cancer cell lineage. *J Struct Biol* 202:61–69 . doi: 10.1016/j.jsb.2017.12.007
- Faria JAQA, de Andrade C, Goes AM, et al (2016) Effects of different ligands on epidermal growth factor receptor (EGFR) nuclear translocation. *Biochem Biophys Res Commun* 478:39–45 . doi: 10.1016/j.bbrc.2016.07.097
- Fima E, Shtutman M, Libros P, et al (2001) PKC $\eta$  enhances cell cycle progression, the expression of G1 cyclins and p21 in MCF-7 cells. *Oncogene* 20:6794–6804 . doi: 10.1038/sj.onc.1204885
- Fiume R, Ramazzotti G, Teti G, et al (2009) Involvement of nuclear PLC $\beta$ 1 in lamin B1 phosphorylation and G2/M cell cycle progression . *FASEB J* 23:957–966 . doi: 10.1096/fj.08-121244
- Follo MY, Finelli C, Mongiorgi S, et al (2009) Reduction of phosphoinositide-phospholipase C beta1 methylation predicts the responsiveness to azacitidine in high-risk MDS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:16811–16816 . doi: 10.1073/pnas.0907109106
- Freitas N, Cunha C (2009) Mechanisms and Signals for the Nuclear Import of Proteins. *Curr Genomics* 10:550–557 . doi: 10.2174/138920209789503941
- Fu G, Chen Y, Yu M, et al (2010) Phospholipase C $\gamma$ 1 is essential for T cell development, activation, and tolerance. *J Exp Med* 207:309–318 . doi: 10.1084/jem.20090880
- Fukami K, Nakao K, Inoue T, et al (2001) Requirement of phospholipase C $\delta$ 4 for the zona pellucida-induced acrosome reaction. *Science* (80- ) 292:920–923 . doi: 10.1126/science.1059042
- Furuuchi K, Berezov A, Kumagai T, Greene MI (2007) Targeted Antireceptor Therapy with Monoclonal Antibodies Leads to the Formation of Inactivated Tetrameric Forms of ErbB Receptors. *J Immunol* 178:1021–1029 . doi: 10.4049/jimmunol.178.2.1021
- Gallegos LL, Kunkel MT, Newton AC (2006) Targeting protein kinase C activity reporter to discrete intracellular regions reveals spatiotemporal differences in agonist-dependent signaling. *J Biol Chem* 281:30947–30956 . doi: 10.1074/jbc.M603741200
- Garrett TPJ, McKern NM, Lou M, et al (2002) Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor  $\alpha$ . *Cell* 110:763–773 . doi: 10.1016/S0092-8674(02)00940-6
- Giri DK, Ali-Sayed M, Li L-Y, et al (2005) Endosomal Transport of ErbB-2: Mechanism for Nuclear Entry of the Cell Surface Receptor. *Mol Cell Biol* 25:11005–11018 . doi: 10.1128/mcb.25.24.11005-11018.2005
- Gomes DA, Leite MF, Bennett AM, Nathanson MH (2006) Calcium signaling in the nucleus. *Can J Physiol Pharmacol* 84:325–332 . doi: 10.1139/Y05-117
- Gomes DA, Rodrigues MA, Leite MF, et al (2008) c-Met must translocate to the nucleus to initiate

- calcium signals. *J Biol Chem* 283:4344–4351 . doi: 10.1074/jbc.M706550200
- Görlich D (1997) Nuclear protein import. *Curr Opin Cell Biol* 9:412–419 . doi: 10.1016/S0955-0674(97)80015-4
- Görlich D, Kutay U (1999) Transport Between the Cell Nucleus and the Cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:607–660 . doi: 10.1146/annurev.cellbio.15.1.607
- Haigler HT, McKanna JA, Cohen S (1979) Direct visualization of the binding and internalization of a ferritin conjugate of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431. *J Cell Biol* 81:382–395 . doi: 10.1083/jcb.81.2.382
- Han W, Lo HW (2012) Landscape of EGFR signaling network in human cancers: Biology and therapeutic response in relation to receptor subcellular locations. *Cancer Lett.* 318:124–134
- Hanada N, Lo HW, Day CP, et al (2006) Co-regulation of B-Myb expression by E2F1 and EGF receptor. *Mol Carcinog* 45:10–17 . doi: 10.1002/mc.20147
- Hardingham GE, Chawla S, Johnson CM, Bading H (1997) Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature* 385:260–265 . doi: 10.1038/385260a0
- He S, Sharpless NE (2017) Senescence in Health and Disease. *Cell* 169:1000–1011
- Heffelfinger SC, Hawkins HH, Barrish J, et al (1992) SK HEP-1: A human cell line of endothelial origin. *Vitr Cell Dev Biol - Anim* 28:136–142 . doi: 10.1007/BF02631017
- Henglein B, Chenivesse X, Wang J, et al (1994) Structure and cell cycle-regulated transcription of the human cyclin A gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:5490–5494 . doi: 10.1073/pnas.91.12.5490
- Hicks SN, Jczyk MR, Gershbarg S, et al (2008) General and Versatile Autoinhibition of PLC Isozymes. *Mol Cell* 31:383–394 . doi: 10.1016/j.molcel.2008.06.018
- Hsu SC, Hung MC (2007) Characterization of a novel tripartite nuclear localization sequence in the EGFR family. *J Biol Chem* 282:10432–10440 . doi: 10.1074/jbc.M610014200
- Huang W, Mishra V, Batra S, et al (2004) Phorbol ester promotes histone H3-Ser10 phosphorylation at the LDL receptor promoter in a protein kinase C-dependent manner. *J Lipid Res* 45:1519–1527 . doi: 10.1194/jlr.M400088-JLR200
- Huang WC, Chen YJ, Li LY, et al (2011) Nuclear translocation of epidermal growth factor receptor by Akt-dependent phosphorylation enhances breast cancer-resistant protein expression in gefitinib-resistant cells. *J Biol Chem* 286:20558–20568 . doi: 10.1074/jbc.M111.240796
- Hug H, Sarre TF (1993) Protein kinase C isoenzymes: Divergence in signal transduction? *Biochem. J.* 291:329–343
- Hung LY, Tseng JT, Lee YC, et al (2008) Nuclear epidermal growth factor receptor (EGFR) interacts with signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) in activating Aurora-A gene expression. *Nucleic Acids Res* 36:4337–4351 . doi: 10.1093/nar/gkn417
- Huo L, Wang YN, Xia W, et al (2010) RNA helicase A is a DNA-binding partner for EGFR-mediated transcriptional activation in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:16125–16130 . doi: 10.1073/pnas.1000743107
- Hwang A, Maity A, McKenna WG, Muschel RJ (1995) Cell cycle-dependent regulation of the cyclin B1 promoter. *J Biol Chem* 270:28419–28424 . doi: 10.1074/jbc.270.47.28419
- Instituto Nacional de Câncer, Ministério da Saúde (2019) Estatísticas de Câncer. In: Estatísticas de câncer. <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>
- Ji QS, Winnier GE, Niswender KD, et al (1997) Essential role of the tyrosine kinase substrate phospholipase C- $\gamma$ 1 in mammalian growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2999–3003 . doi: 10.1073/pnas.94.7.2999
- Jiang H, Kuang Y, Wu Y, et al (1997) Roles of phospholipase C  $\beta$ 2 in chemoattractant-elicited responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7971–7975 . doi: 10.1073/pnas.94.15.7971
- Johannessen LE, Haugen KE, Østfold AC, et al (2001) Heterodimerization of the epidermal-growth-factor (EGF) receptor and ErbB2 and the affinity of EGF binding are regulated by different mechanisms. *Biochem J* 356:87–96 . doi: 10.1042/0264-6021:3560087
- Kadamur G, Ross EM (2013) Mammalian Phospholipase C. *Annu Rev Physiol* 75:127–154 . doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183750

- Kalyankrishna S, Grandis JR (2006) Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J. Clin. Oncol.* 24:2666–2672
- Kamaruddin MS (1993) The despairing and the hopeful : a Malay fishing community in Kuala Kedah
- Kanemaru K, Nakahara M, Nakamura Y, et al (2010) Phospholipase C- $\epsilon$ 2 is highly expressed in the habenula and retina. *Gene Expr Patterns* 10:119–126 . doi: 10.1016/j.gep.2009.12.004
- Kanemaru K, Nakamura Y, Sato K, et al (2012) Epidermal phospholipase C $\delta$ 1 regulates granulocyte counts and systemic interleukin-17 levels in mice. *Nat Commun* 3:963 . doi: 10.1038/ncomms1960
- Kapoor N, Maxwell JT, Mignery GA, et al (2014) Spatially defined InsP 3-mediated signaling in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *PLoS One* 9:e83715 . doi: 10.1371/journal.pone.0083715
- Kim H, Suh PG, Ryu SH, Park SH (1999a) Assignment of the human PLC  $\delta$ 4 gene (PLCD4) to human chromosome band 2q35 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 87:254–255 . doi: 10.1159/000015437
- Kim HK, Kim JW, Zilberstein A, et al (1991) PDGF stimulation of inositol phospholipid hydrolysis requires PLC- $\gamma$ 1 phosphorylation on tyrosine residues 783 and 1254. *Cell* 65:435–441 . doi: 10.1016/0092-8674(91)90461-7
- Kim HP, Yoon YK, Kim JW, et al (2009) Lapatinib, a dual EGFR and HER2 tyrosine kinase inhibitor, downregulates thymidylate synthase by inhibiting the nuclear translocation of EGFR and HER2. *PLoS One* 4:e5933 . doi: 10.1371/journal.pone.0005933
- Kim JK, Choi JW, Lim S, et al (2011) Phospholipase C- $\eta$ 1 is activated by intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and enhances GPCRs/PLC/Ca<sup>2+</sup> signaling. *Cell Signal* 23:1022–1029 . doi: 10.1016/j.cellsig.2011.01.017
- Kim YH, Park TJ, Lee YH, et al (1999b) Phospholipase C- $\delta$ 1 is activated by capacitative calcium entry that follows phospholipase C- $\beta$  activation upon bradykinin stimulation. *J Biol Chem* 274:26127–26134 . doi: 10.1074/jbc.274.37.26127
- Kiuru M, Kurban M, Itoh M, et al (2011) Hereditary leukonychia, or porcelain nails, resulting from mutations in PLCD1. *Am J Hum Genet* 88:839–844 . doi: 10.1016/j.ajhg.2011.05.014
- Kosugi S, Hasebe M, Tomita M, Yanagawa H (2009) Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:10171–10176 . doi: 10.1073/pnas.0900604106
- Kumar V, Jong YJI, O'Malley KL (2008) Activated nuclear metabotropic glutamate receptor mGlu5 couples to nuclear Gq/11 proteins to generate inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated nuclear Ca<sup>2+</sup> release. *J Biol Chem* 283:14072–14083 . doi: 10.1074/jbc.M708551200
- Kunrath-Lima M, de Miranda MC, Ferreira A da F, et al (2018) Phospholipase C delta 4 (PLC $\delta$ 4) is a nuclear protein involved in cell proliferation and senescence in mesenchymal stromal stem cells. *Cell Signal* 49:59–67 . doi: 10.1016/j.cellsig.2018.05.011
- Kutay U, Güttinger S (2005) Leucine-rich nuclear-export signals: Born to be weak. *Trends Cell Biol.* 15:121–124
- La Cour T, Kiemer L, Mølgaard A, et al (2004) Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel* 17:527–536 . doi: 10.1093/protein/gzh062
- Lee SB, Rhee SG (1996) Molecular cloning, splice variants, expression, and purification of phospholipase C- $\delta$ 4. *J Biol Chem* 271:25–31 . doi: 10.1074/jbc.271.1.25
- Lemmon MA, Falasca M, Schlessinger J (1997) Regulatory recruitment of signalling molecules to the cell membrane by pleckstrin-homology domains. *Trends Cell Biol.* 7:237–242
- Leung DW, Tompkins C, Brewer J, et al (2004) Phospholipase C delta-4 overexpression upregulates ErbB1/2 expression, Erk signaling pathway, and proliferation in MCF-7 cells. *Mol Cancer* 3: . doi: 10.1186/1476-4598-3-15
- Li C, Iida M, Dunn EF, et al (2009) Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab. *Oncogene* 28:3801–3813 . doi: 10.1038/onc.2009.234
- Li G, Deng X, Wu C, et al (2011a) Distinct kinetic and spatial patterns of protein kinase C (PKC)- and epidermal growth factor receptor (EGFR)- dependent activation of extracellular signal-regulated

- kinases 1 and 2 by human nicotinic acid receptor GPR109A. *J Biol Chem* 286:31199–31212 . doi: 10.1074/jbc.M111.241372
- Li J, Poi MJ, Tsai MD (2011b) Regulatory mechanisms of tumor suppressor P16INK4A and their relevance to cancer. *Biochemistry* 50:5566–5582 . doi: 10.1021/bi200642e
- Li Z, Jiang H, Xie W, et al (2000) Roles of PLC- $\beta$ 2 and - $\beta$ 3 and PI3ky in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science* (80- ) 287:1046–1049 . doi: 10.1126/science.287.5455.1046
- Liao HJ, Carpenter G (2007) Role of the Sec61 translocon in EGF receptor trafficking to the nucleus and gene expression. *Mol Biol Cell* 18:1064–1072 . doi: 10.1091/mbc.E06-09-0802
- Liao HJ, Kume T, McKay C, et al (2002) Absence of erythropoiesis and vasculogenesis in Plcg1-deficient mice. *J Biol Chem* 277:9335–9341 . doi: 10.1074/jbc.M109955200
- Liccardi G, Hartley JA, Hochhauser D (2011) EGFR nuclear translocation modulates DNA repair following cisplatin and ionizing radiation treatment. *Cancer Res* 71:1103–1114 . doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2384
- Lin J rong, Hu J (2013) SeqNLS: nuclear localization signal prediction based on frequent pattern mining and linear motif scoring. *PLoS One* 8: . doi: 10.1371/journal.pone.0076864
- Lin SY, Makino K, Xia W, et al (2001) Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* 3:802–808 . doi: 10.1038/ncb0901-802
- Liu N, Fukami K, Yu H, Takenawa T (1996) A new phospholipase C delta 4 is induced at S-phase of the cell cycle and appears in the nucleus. *J Biol Chem* 271:355–60 . doi: 10.1074/jbc.271.1.355
- Lo HW, Ali-Seyed M, Wu Y, et al (2006) Nuclear-cytoplasmic transport of EGFR involves receptor endocytosis, importin  $\beta$ 1 and CRM1. *J Cell Biochem* 98:1570–1583 . doi: 10.1002/jcb.20876
- Lo HW, Cao X, Zhu H, Ali-Osman F (2010) Cyclooxygenase-2 is a novel transcriptional target of the nuclear EGFR-STAT3 and EGFRvIII-STAT3 signaling axes. *Mol Cancer Res* 8:232–245 . doi: 10.1158/1541-7786.MCR-09-0391
- Lo HW, Hsu SC, Ali-Seyed M, et al (2005) Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. *Cancer Cell* 7:575–589 . doi: 10.1016/j.ccr.2005.05.007
- Lomasney JW, Cheng HF, Roffler SR, King K (1999) Activation of phospholipase C  $\delta$ 1 through C2 domain by a Ca<sup>2+</sup>-enzyme- phosphatidylserine ternary complex. *J Biol Chem* 274:21995–22001 . doi: 10.1074/jbc.274.31.21995
- Lyon AM, Tesmer JJG (2013) Structural insights into phospholipase C- $\beta$  function. *Mol. Pharmacol.* 84:488–500
- Malhas A, Goulbourne C, Vaux DJ (2011) The nucleoplasmic reticulum: Form and function. *Trends Cell Biol.* 21:362–373
- Manzoli L, Billi AM, Rubbini S, et al (1997) Essential role for nuclear phospholipase C  $\beta$ 1 in insulin-like growth factor I-induced mitogenesis. *Cancer Res* 57:2137–2139
- Markman B, Javier Ramos F, Capdevila J, Taberero J (2010) EGFR and KRAS in Colorectal Cancer
- Marsh M, Helenius A (2006) Virus entry: Open sesame. *Cell* 124:729–740
- Martelli AM, Bortul R, Tabellini G, et al (2002) Molecular characterization of protein kinase C- $\alpha$  binding to lamin A. *J Cell Biochem* 86:320–330 . doi: 10.1002/jcb.10227
- Martelli AM, Evangelisti C, Nyakern M, Manzoli FA (2006) Nuclear protein kinase C. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 1761:542–551 . doi: 10.1016/j.bbalip.2006.02.009
- Martelli AM, Gilmour RS, Bertagnolo V, et al (1992) Nuclear localization and signalling activity of phosphoinositidase C $\beta$  in Swiss 3T3 cells. *Nature* 358:242–245 . doi: 10.1038/358242a0
- Martelli AM, Sang N, Borgatti P, et al (1999) Multiple biological responses activated by nuclear protein kinase C. *J. Cell. Biochem.* 74:499–521
- Marti U, Burwen SJ, Wells A, et al (1991) Localization of epidermal growth factor receptor in hepatocyte nuclei. *Hepatology* 13:15–20 . doi: 10.1002/hep.1840130104
- Marti U, Wells A (2000) The nuclear accumulation of a variant epidermal growth factor receptor (EGFR) lacking the transmembrane domain requires coexpression of a full- length EGFR. *Mol Cell Biol Res Commun* 3:8–14 . doi: 10.1006/mcbr.2000.0177
- Masuda H, Zhang D, Bartholomeusz C, et al (2012) Role of epidermal growth factor receptor in breast

- cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 136:331–345
- Matter N, Ritz MF, Freyermuth S, et al (1993) Stimulation of nuclear protein kinase C leads to phosphorylation of nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and accelerated calcium release by inositol 1,4,5-trisphosphate from isolated rat liver nuclei. *J Biol Chem* 268:732–736
- Medema JP, Sark MW, Backendorf C, Bos JL (1994) Calcium inhibits epidermal growth factor-induced activation of p21ras in human primary keratinocytes. *Mol Cell Biol* 14:7078–7085 . doi: 10.1128/mcb.14.11.7078
- Michalopoulos GK (2017) Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance. *Hepatology* 65:1384–1392 . doi: 10.1002/hep.28988
- Mikoshiba K (1993) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Trends Pharmacol Sci* 14:86–89 . doi: 10.1016/0165-6147(93)90069-V
- Minder P, Zajac E, Quigley JP, Deryugina EI (2015) EGFR Regulates the Development and Microarchitecture of Intratumoral Angiogenic Vasculature Capable of Sustaining Cancer Cell Intravasation. *Neoplasia* 17:634–649 . doi: 10.1016/j.neo.2015.08.002
- Moccia F, Berra-Romani R, Tritto S, et al (2003) Epidermal growth factor induces intracellular Ca<sup>2+</sup> oscillations in microvascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 194:139–150 . doi: 10.1002/jcp.10198
- Mongiorgi S, Follo MY, Clissa C, et al (2012) Nuclear PI-PLC  $\beta$ 1 and Myelodysplastic Syndromes: From Bench to Clinics. In: *Current topics in microbiology and immunology*. pp 235–245
- Morgillo F, Woo JK, Kim ES, et al (2006) Heterodimerization of insulin-like growth factor receptor/epidermal growth factor receptor and induction of survivin expression counteract the antitumor action of erlotinib. *Cancer Res* 66:10100–10111 . doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1684
- Nagano K, Fukami K, Minagawa T, et al (1999) A novel phospholipase C  $\delta$ 4 (PLC $\delta$ 4) splice variant as a negative regulator of plc. *J Biol Chem* 274:2872–2879 . doi: 10.1074/jbc.274.5.2872
- Nair R, Carter P, Rost B (2003) NLSdb: Database of nuclear localization signals. *Nucleic Acids Res* 31:397–399 . doi: 10.1093/nar/gkg001
- Nakai K, Horton P (1999) PSORT: A program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem. Sci.* 24:34–35
- Nakai K, Hung MC, Yamaguchi H (2016) A perspective on anti-EGFR therapies targeting triple-negative breast cancer. *Am. J. Cancer Res.* 6:1609–1623
- Nakamura Y, Fukami K (2017) Regulation and physiological functions of mammalian phospholipase C. *J Biochem* 161:315–321 . doi: 10.1093/jb/mvw094
- Nakamura Y, Hamada Y, Fujiwara T, et al (2005) Phospholipase C- $\delta$ 1 and - $\delta$ 3 Are Essential in the Trophoblast for Placental Development. *Mol Cell Biol* 25:10979–10988 . doi: 10.1128/mcb.25.24.10979-10988.2005
- Nakamura Y, Ichinohe M, Hirata M, et al (2008) Phospholipase C- $\delta$ 1 is an essential molecule downstream of Foxnl, the gene responsible for the nude mutation, in normal hair development. *FASEB J* 22:841–849 . doi: 10.1096/fj.07-9239com
- Nakamura Y, Kanemaru K, Kojima R, et al (2014) Simultaneous loss of phospholipase C $\delta$ 1 and phospholipase C $\delta$ 3 causes cardiomyocyte apoptosis and cardiomyopathy. *Cell Death Dis* 5:e1215–e1215 . doi: 10.1038/cddis.2014.181
- Needham SR, Roberts SK, Arkhipov A, et al (2016) EGFR oligomerization organizes kinase-active dimers into competent signalling platforms. *Nat Commun* 7:13307 . doi: 10.1038/ncomms13307
- NERI LM, MARTELLI AM, BORGATTI P, et al (1999) Increase in nuclear phosphatidylinositol 3-kinase activity and phosphatidylinositol (3,4,5) trisphosphate synthesis precede PKC- $\zeta$  translocation to the nucleus of NGF-treated PC12 cells. *FASEB J* 13:2299–2310 . doi: 10.1096/fasebj.13.15.2299
- Newton AC (1995) Protein kinase C: Structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem.* 270:28495–28498
- Newton AC (2001) Protein kinase C: Structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev* 101:2353–2364 . doi: 10.1021/cr0002801
- Nguyen Ba AN, Pogoutse A, Provart N, Moses AM (2009) NLStradamus: A simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics* 10:202 . doi: 10.1186/1471-2105-10-202

- Nishibe S, Wahl MI, Hernández-Sotomayor SMT, et al (1990) Increase of the catalytic activity of phospholipase C- $\gamma$ 1 by tyrosine phosphorylation. *Science* (80- ) 250:1253–1256 . doi: 10.1126/science.1700866
- Orth JD, Krueger EW, Weller SG, McNiven MA (2006) A novel endocytic mechanism of epidermal growth factor receptor sequestration and internalization. *Cancer Res* 66:3603–3610 . doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2916
- Ortiz-Zapater E, Lee RW, Owen W, et al (2017) MET-EGFR dimerization in lung adenocarcinoma is dependent on EGFR mutations and altered by MET kinase inhibition. *PLoS One* 12:e0170798 . doi: 10.1371/journal.pone.0170798
- Pandiella A, Beguinot L, Velu TJ, Meldolesi J (1988) Transmembrane signalling at epidermal growth factor receptors overexpressed in NIH 3T3 cells. Phosphoinositide hydrolysis, cytosolic Ca<sup>2+</sup> increase and alkalization correlate with epidermal-growth-factor-induced cell proliferation. *Biochem J* 254:223–228 . doi: 10.1042/bj2540223
- Parekh DB, Ziegler W, Parker PJ (2000) Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J* 19:496–503 . doi: 10.1093/emboj/19.4.496
- Piechulek T, Rehlen T, Walliser C, et al (2005) Isozyme-specific stimulation of phospholipase C- $\gamma$ 2 by Rac GTPases. *J Biol Chem* 280:38923–38931 . doi: 10.1074/jbc.M509396200
- Poli A, Faenza I, Chiarini F, et al (2013) K562 cell proliferation is modulated by PLC $\beta$ 1 through a PKC $\alpha$ -mediated pathway. *Cell Cycle* 12:1713–1721 . doi: 10.4161/cc.24806
- Poli A, Ramazzotti G, Matteucci A, et al (2014) A novel DAG-dependent mechanism links PKC $\alpha$  and Cyclin B1 regulating cell cycle progression. *Oncotarget* 5:11526–11540 . doi: 10.18632/oncotarget.2578
- Pommier Y, Kerrigan D, Hartman KD, Glazer RI (1990) Phosphorylation of mammalian DNA topoisomerase I and activation by protein kinase C. *J Biol Chem* 265:9418–9422
- Popovics P, Beswick W, Guild SB, et al (2011) Phospholipase C- $\eta$ 2 is activated by elevated intracellular Ca<sup>2+</sup> levels. *Cell Signal* 23:1777–1784 . doi: 10.1016/j.cellsig.2011.06.012
- Prabhakar CN (2015) Epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer. *Transl. Lung Cancer Res.* 4:110–118
- Pusl T, Wu JJ, Zimmerman TL, et al (2002) Epidermal growth factor-mediated activation of the ETS domain transcription factor Elk-1 requires nuclear calcium. *J Biol Chem* 277:27517–27527 . doi: 10.1074/jbc.M203002200
- Qian X, Levea CM, Freeman JK, et al (1994) Heterodimerization of epidermal growth factor receptor and wild-type or kinase-deficient Neu: A mechanism of interreceptor kinase activation and transphosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1500–1504 . doi: 10.1073/pnas.91.4.1500
- Ramazzotti G, Faenza I, Gaboardi GC, et al (2008) Catalytic activity of nuclear PLC- $\beta$ 1 is required for its signalling function during C2C12 differentiation. *Cell Signal* 20:2013–2021 . doi: 10.1016/j.cellsig.2008.07.009
- Ratti S, Mongiorgi S, Ramazzotti G, et al (2017) Nuclear Inositide Signaling Via Phospholipase C. *J Cell Biochem* 118:1969–1978 . doi: 10.1002/jcb.25894
- Rebecchi MJ, Pentylala SN (2000) Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol. Rev.* 80:1291–1335
- Rodrigues MA, Gomes DA, Andrade VA, et al (2008) Insulin induces calcium signals in the nucleus of rat hepatocytes. *Hepatology* 48:1621–1631 . doi: 10.1002/hep.22424
- Rodrigues MA, Gomes DA, Leite MF, et al (2007) Nucleoplasmic calcium is required for cell proliferation. *J Biol Chem* 282:17061–17068 . doi: 10.1074/jbc.M700490200
- Rosenberger U, Lehmann I, Weise C, et al (2002) Identification of PSF as a protein kinase C $\alpha$ -binding protein in the cell nucleus. *J Cell Biochem* 86:394–402 . doi: 10.1002/jcb.10233
- Sahyoun N, Wolf M, Besterman J, et al (1986) Protein kinase C phosphorylates topoisomerase II: Topoisomerase activation and its possible role in phorbol ester-induced differentiation of HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:1603–1607 . doi: 10.1073/pnas.83.6.1603
- Sandvig K, Van Deurs B (2002) Transport of protein toxins into cells: Pathways used by ricin, cholera

- toxin and Shiga toxin. *FEBS Lett.* 529:49–53
- Saunders CM, Larman MG, Parrington J, et al (2002) PLC $\zeta$ : A sperm-specific trigger of Ca<sup>2+</sup> oscillations in eggs and embryo development. *Development* 129:3533–3544
- Schulze A, Zerfass K, Spitkovsky D, et al (1995) Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11264–11268 . doi: 10.1073/pnas.92.24.11264
- Scott MS, Troshin P V., Barton GJ (2011) NoD: A Nucleolar localization sequence detector for eukaryotic and viral proteins. *BMC Bioinformatics* 12: . doi: 10.1186/1471-2105-12-317
- Seifert JP, Wing MR, Snyder JT, et al (2004) RhoA activates purified phospholipase C- $\epsilon$  by a guanine nucleotide-dependent mechanism. *J Biol Chem* 279:47992–47997 . doi: 10.1074/jbc.M407111200
- Senatore A, Spafford JD (2008) Calcium Channels: Regulation of Gene Transcription. In: *Encyclopedia of Neuroscience*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 550–554
- Seshacharyulu P, Ponnusamy MP, Haridas D, et al (2012) Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* 16:15–31
- Shi Y, Tao YG, Jiang Y, et al (2012) Nuclear epidermal growth factor receptor interacts with transcriptional intermediary factor 2 to activate cyclin D1 gene expression triggered by the oncoprotein latent membrane protein 1. *Carcinogenesis* 33:1468–1478 . doi: 10.1093/carcin/bgs171
- Smrcka A V, Brown JH, Holz GG (2012) Role of phospholipase C $\epsilon$  in physiological phosphoinositide signaling networks. *Cell. Signal.* 24:1333–1343
- Stallings JD, Tall EG, Pentylala S, Rebecchi MJ (2005) Nuclear translocation of phospholipase C- $\delta$ 1 is linked to the cell cycle and nuclear phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem* 280:22060–22069 . doi: 10.1074/jbc.M413813200
- Stehno-Bittel L, Lückhoff A, Clapham DE (1995) Calcium release from the nucleus by InsP3 receptor channels. *Neuron* 14:163–167 . doi: 10.1016/0896-6273(95)90250-3
- Stewart AJ, Mukherjee J, Roberts SJ, et al (2005) Identification of a novel class of mammalian phosphoinositol-specific phospholipase C enzymes. *Int J Mol Med* 15:117–121 . doi: 10.3892/ijmm.15.1.117
- Stolarczyk M, Scholte BJ (2018) The EGFR-ADAM17 Axis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Cystic Fibrosis Lung Pathology. *Mediators Inflamm.* 2018
- Subramanian K, Meyer T (1997) Calcium-induced restructuring of nuclear envelope and endoplasmic reticulum calcium stores. *Cell* 89:963–971 . doi: 10.1016/S0092-8674(00)80281-0
- Sutcliffe EL, Bunting KL, He YQ, et al (2011) Chromatin-Associated Protein Kinase C- $\theta$  Regulates an Inducible Gene Expression Program and MicroRNAs in Human T Lymphocytes. *Mol Cell* 41:704–719 . doi: 10.1016/j.molcel.2011.02.030
- Tabellini G, Bortul R, Aluigi M, et al (2002) Binding of elements of protein kinase C- $\alpha$  regulatory domain to lamin B1. *Cell Signal* 14:819–827 . doi: 10.1016/S0898-6568(02)00021-9
- Takenaka N, Edamatsu H, Suzuki N, et al (2011) Overexpression of phospholipase C $\epsilon$  in keratinocytes upregulates cytokine expression and causes dermatitis with acanthosis and T-cell infiltration. *Eur J Immunol* 41:202–213 . doi: 10.1002/eji.201040675
- Thompson M, Andrade VA, Andrade SJ, et al (2003) Inhibition of the TEF/TEAD transcription factor activity by nuclear calcium and distinct kinase pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 301:267–274 . doi: 10.1016/S0006-291X(02)03024-3
- Tinhofer I, Maly K, Dietl P, et al (1996) Differential Ca<sup>2+</sup> signaling induced by activation of the epidermal growth factor and nerve growth factor receptors. *J Biol Chem* 271:30505–30509 . doi: 10.1074/jbc.271.48.30505
- Traynor AM, Weigel TL, Oettel KR, et al (2013) Nuclear EGFR protein expression predicts poor survival in early stage non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 81:138–141 . doi: 10.1016/j.lungcan.2013.03.020
- Ullrich A, Schlessinger J (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61:203–212
- Vega QC, Cochet C, Filhol O, et al (1992) A site of tyrosine phosphorylation in the C terminus of the

- epidermal growth factor receptor is required to activate phospholipase C. *Mol Cell Biol* 12:128–135 . doi: 10.1128/mcb.12.1.128
- Wang SC, Nakajima Y, Yu YL, et al (2006) Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability. *Nat Cell Biol* 8:1359–1368 . doi: 10.1038/ncb1501
- Wang YN, Hung MC (2012) Nuclear functions and subcellular trafficking mechanisms of the epidermal growth factor receptor family. *Cell Biosci* 2:13 . doi: 10.1186/2045-3701-2-13
- Wang YN, Wang H, Yamaguchi H, et al (2010a) COPI-mediated retrograde trafficking from the Golgi to the ER regulates EGFR nuclear transport. *Biochem Biophys Res Commun* 399:498–504 . doi: 10.1016/j.bbrc.2010.07.096
- Wang YN, Yamaguchi H, Hsu JM, Hung MC (2010b) Nuclear trafficking of the epidermal growth factor receptor family membrane proteins. *Oncogene* 29:3997–4006
- Wang YN, Yamaguchi H, Huo L, et al (2010c) The translocon Sec61 $\beta$  localized in the inner nuclear membrane transports membrane-embedded EGF receptor to the nucleus. *J Biol Chem* 285:38720–38729 . doi: 10.1074/jbc.M110.158659
- Wheeler DL, Huang S, Kruser TJ, et al (2008) Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: Role of HER (ErbB) family members. *Oncogene* 27:3944–3956 . doi: 10.1038/onc.2008.19
- Wiederschain D, Wee S, Chen L, et al (2009) Single-vector inducible lentiviral RNAi system for oncology target validation. *Cell Cycle* 8:498–504 . doi: 10.4161/cc.8.3.7701
- Xiao DM, Jhang Ho P, Wang X, et al (2000) Phosphorylation of HMG-I by protein kinase C attenuates its binding affinity to the promoter regions of protein kinase C  $\gamma$  and neurogranin/RC3 genes. *J Neurochem* 74:392–399 . doi: 10.1046/j.1471-4159.2000.0740392.x
- Xiao W, Kashiwakura J ichi, Hong H, et al (2011) Phospholipase C- $\beta$ 3 Regulates Fce $\beta$ RI-Mediated Mast Cell Activation by Recruiting the Protein Phosphatase SHP-1. *Immunity* 34:893–904 . doi: 10.1016/j.immuni.2011.04.010
- Xu D, Marquis K, Pei J, et al (2015) LocNES: A computational tool for locating classical NESs in CRM1 cargo proteins. *Bioinformatics* 31:1357–1365 . doi: 10.1093/bioinformatics/btu826
- Xu TR, Rumsby MG (2004) Phorbol ester-induced translocation of PKC epsilon to the nucleus in fibroblasts: Identification of nuclear PKC epsilon-associating proteins. *FEBS Lett* 570:20–24 . doi: 10.1016/j.febslet.2004.05.080
- Yang YR, Follo MY, Cocco L, Suh PG (2013) The physiological roles of primary phospholipase C. *Adv. Biol. Regul.* 53:232–241
- Yarden Y, Sliwkowski MX (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:127–137
- Yoon SY, Jellerette T, Salicioni AM, et al (2008) Human sperm devoid of PLC, zeta 1 fail to induce Ca<sup>2+</sup> release and are unable to initiate the first step of embryo development. *J Clin Invest* 118:3671–3681 . doi: 10.1172/JCI36942
- Zanetti-Domingues LC, Korovesis D, Needham SR, et al (2018) The architecture of EGFR's basal complexes reveals autoinhibition mechanisms in dimers and oligomers. *Nat Commun* 9:4325 . doi: 10.1038/s41467-018-06632-0
- Zeng F, Harris RC (2014) Epidermal growth factor, from gene organization to bedside. *Semin. Cell Dev. Biol.* 28:2–11
- Zhang L, Malik S, Pang J, et al (2013) Phospholipase C $\epsilon$  Hydrolyzes Perinuclear Phosphatidylinositol 4-Phosphate to Regulate Cardiac Hypertrophy. *Cell* 153:216–227 . doi: 10.1016/j.cell.2013.02.047
- Zhang X, Gureasko J, Shen K, et al (2006) An Allosteric Mechanism for Activation of the Kinase Domain of Epidermal Growth Factor Receptor. *Cell* 125:1137–1149 . doi: 10.1016/j.cell.2006.05.013
- Zhao B, Wang L, Qiu H, et al (2017) Mechanisms of resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Oncotarget* 8:3980–4000 . doi: 10.18632/oncotarget.14012
- Zhao M, Sutherland C, Wilson DP, et al (2004) Identification of the linker histone H1 as a protein kinase C $\epsilon$ -binding protein in vascular smooth muscle. *Biochem Cell Biol* 82:538–546 . doi: 10.1139/o04-053
- Zhou G, Seibenhener ML, Wooten MW (1997) Nucleolin is a protein kinase C- $\zeta$  substrate: Connection

between cell surface signaling and nucleus in PC12 cells. *J Biol Chem* 272:31130–31137 . doi: 10.1074/jbc.272.49.31130

**Abbreviations:**

RTK, receptor tyrosine kinase; EGF, epidermal growth factor; EGFR, EGF receptor; PKC, protein kinase C; PLC, phospholipase C; DAG, diacylglycerol; mRFP, monomeric red fluorescent protein; CFP, cyan fluorescent protein; YFP, yellow fluorescent protein; FRET, Förster resonance energy transfer; PdBu, phorbol 12-13-dibutyrate; AVP, arginine vasopressin.

## Figure legends

**Figure 1: EGF induces EGFR nuclear translocation and Clathrin-mediated endocytosis-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  signals.** **A**, Western blot analysis of EGFR in non-nuclear and nuclear fractions isolated from resting (control) or EGF-stimulated hepatocyte and SKHep-1 cells.  $\alpha$ -Tubulin and Lamin B1 were used as purity controls for non-nuclear and nuclear fractions, respectively. Indicated KDa values represent the position of the referenced bands from pre-stained protein standard. Densitometric measurements of cellular fractions show that nuclear EGFR is maximal within 10 min of stimulation in SKHep-1 and within 2.5-5 min in hepatocytes. Values are scaled relative to the initial amount in the non-nuclear fraction and relative to the amount at 2.5 min in the nuclear fraction (mean  $\pm$  S.E.; n = 3). **B**, Confocal images of control SKHep-1 cells (right image) and upon 10 min EGF stimulation (middle image). Serial optical sections were collected for three-dimensional reconstruction; x-z sections are shown at the top, and y-z sections are shown at the right of each image. EGFR is represented in green, Lamin B1 is in red and the nuclear compartment marked in blue. Merged images show EGFR co-localization with the nuclear dye in EGF-treated cells. Note that EGFR redistributes to the region of the nuclear envelope as well as in within the nuclear interior (arrows). Bar = 10 micrometers. Scatter plot showing the quantification of EGFR at the nucleus before and after EGF stimulation. N = 7-12 cells for each group. The image collection settings for fluorescence quantification was adjusted according to the cells stimulated with EGF to avoid nuclear-saturated pixels of EGFR clusters. \*\*\*p<0.001. **C**, western blot (top) analysis of Clathrin heavy chain 2 (CHC2) expression in non-treated, lipofectamine only, control siRNAs-treated or CHC2 siRNAs-treated SKHep-1 cells.  $\alpha$ -Tubulin was used as a loading control. Bar graph showing the summary of the western blots (n=4), \*\*\*p<0.001. **D**, Tracings represent Fluo-4/AM fluorescence intensity changes, normalized by the baseline, by the time of EGF stimulation. Lower panel, bar graph compiling peaks of Fluo-4/AM fluorescence intensity in EGF-stimulated at 15 min, control siRNA-treated (n=15), lipofectamine only (n=14), control siRNA 1 (n=10), control siRNA 2 (n=10), CHC2 siRNA 1 (n=13) or CHC2 siRNA 2-treated (n=13) SKHep-1 cells. Fluorescence changes over time from whole cells were normalized and represented as fluorescence intensity (F) by baseline fluorescence ( $F_0$ ) multiplied by 100. \*\*\*p<0.001. Experiments were performed on at least 3 different days.

**Figure 2: EGF triggers  $\text{Ca}^{2+}$  release by nuclear  $\text{InsP}_3$  and nuclear  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  hydrolysis.** **A**, confocal images of SKHep-1 cells loaded with Fluo-4/AM expressing cytosolic  $\text{InsP}_3$ -buffer, nuclear  $\text{InsP}_3$ -buffer or mRFP (control). Images show cells before EGF stimulus (baseline) and the peak (15 min) of EGF-induced Fluo-4/AM fluorescence intensity changes. Expression of constructs was checked by detection of mRFP. **B**, bar graph showing Fluo-4/AM fluorescence intensity peak in cytosolic and nuclear regions of control,

cytosolic or nuclear InsP<sub>3</sub>-buffer expressing cells upon EGF stimulus (8 to 11 cells in each group, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001). **C**, average traces of SKHep-1 expressing cytosolic or nuclear InsP<sub>3</sub>-buffer, or control cells stimulated with EGF. Cytosolic or nuclear regions for fluorescent intensity measurements were selected using the assistance of the Digital Image of Contrast (D.I.C) images. Nuclear but not cytosolic InsP<sub>3</sub>-buffer blocked the peak of EGF response in both compartments. **D**, bar graph represents the amount of PI(4,5)P<sub>2</sub> of nucleus isolated from control or EGF-stimulated hepatocytes (n=6). 5 minutes of EGF stimulation reduces nuclear PI(4,5)P<sub>2</sub> by 64 ± 1.5% (p<0.05).

**Figure 3: EGF induces nuclear PKC activity.** **A**, confocal images of a representative SKHep-1 cell expressing NucCKAR shows CFP and YFP emission as well as a transmitted image of the cell, confirming nuclear localization of the construct. **B**, representative tracings of NucCKAR CFP/YFP emission normalized by baseline, shows changes in emission ratio during 30 minutes of perfusion with phorbol 12-13-dibutyrate (PdBu) (n=6), EGF (n=10) or arginine vasopressin (AVP) (n=3). **C**, bar graph compiling the average results showed in **B**. Both PdBu and EGF induce significantly higher NucCKAR FRET ratio change than AVP (p<0.05). **D**, bar graph represents the average NucCKAR FRET ratio change in EGF-stimulated cells in the presence (n=8) or absence (n=10) of the PKC inhibitor Go6983 (250 nM). The PKC inhibitor significantly attenuates EGF-induced NucCKAR FRET changes. \*\*p<0.01.

**Figure 4: PLCγ1 is a cytosolic and PLCδ4 is a nuclear protein.** **A**, representative confocal images of SKHep-1 cells before and after EGF stimulation showing PLCγ1 in red, EGFR in green and TO-PRO nuclear dye in blue. Merged images reveal that PLCγ1 is predominantly expressed outside of the nucleus in both conditions (n=15 cells). **B**, representative confocal images of control and EGF-stimulated SKHep-1 cells showing PLCδ4 in red, which is exclusively intra-nuclear (n=15 cells). **C**, Western blot showing PLCγ1 and PLCδ4 expressions in non-nuclear and nuclear fractions from control or EGF-stimulated hepatocytes. α-tubulin and Lamin B1 were used as purity controls for nuclear and non-nuclear fractions. Indicated kDa values represent the position of the reference bands from pre-stained protein standard. Subcellular localization of PLCγ1 and PLCδ4 in hepatocytes are not altered by EGF stimulation for 10 min (n=3). **D**, tracings of normalized amounts of PLCγ1 in non-nuclear and nuclear fractions of SKHep-1 cells upon EGF stimulation with different time points, quantified from western blot experiments (n=3).

**Figure 5: Intra-nuclear PLCδ4 mediates EGF-induced nuclear PI(4,5)P<sub>2</sub> depletion and Ca<sup>2+</sup> signals.** **A**, western blot showing PLCγ1 and PLCδ4 expression in SKHep-1 cells under control, lipofectamine, control siRNAs, siRNAs for PLCδ4 or PLCγ1 siRNAs-treated conditions. α-Tubulin was used as a loading control. The molecular weight of each protein analyzed is on the right side. Bar graphs showing the summary

of the western blots. Specific siRNAs reduced PLC $\gamma$ 1 expression by  $90 \pm 14\%$  and  $91 \pm 27\%$  using siRNA 1 and 2, respectively. PLC $\delta$ 4 expressions were reduced by  $75 \pm 7\%$  and  $86 \pm 5\%$  using siRNA 1 and 2, respectively (\*\* $p < 0.01$ ). PLC $\gamma$ 1 siRNAs do not alter each PLC $\delta$ 4 expression levels or PLC $\delta$ 4 siRNAs do not alter each PLC $\gamma$ 1 expression levels. **B**, graph show PI(4,5)P<sub>2</sub> quantification in nuclei isolated from SKHep-1 cells before (-EGF group) and after 10 min of stimulation with EGF (+EGF groups). EGF induced PI(4,5)P<sub>2</sub> hydrolysis was blocked by PLC $\delta$ 4 siRNAs, but not by PLC $\gamma$ 1 siRNAs, compared to cells not treated with EGF (-EGF). Observe that -EGF group has no difference with PLC $\delta$ 4 siRNAs-treated cells or PLC $\gamma$ 1 has no difference with EGF-treated cells. N = 3. \*\* $p < 0.01$ . **C**, representative average tracings of nuclear InsP<sub>3</sub> sensor (FIRE-1nuc) shows changes in YFP/CFP emission normalized by baseline in EGF-stimulated groups for 20 min. bar graph compiling the average results showing intensity peak in control (n=11), control siRNA 1 (n=13), control siRNA 2 (n=13), PLC $\delta$ 4 siRNA 1 (n=11), PLC $\delta$ 4 siRNA 2 (n=12), PLC $\gamma$ 1 siRNA 1 (n=11) or PLC $\gamma$ 1 siRNA 2-treated (n=11) SKHep-1 cells. InsP<sub>3</sub> production is blocked by PLC $\delta$ 4 siRNAs ( $100 \pm 0.5\%$  for both siRNAs, \* $p < 0.05$ ), but not by PLC $\gamma$ 1 siRNAs, compared to control group. **D**, representative average tracings of NucCKAR CFP/YFP emission normalized by baseline, shows changes in emission ratio during 25 minutes of perfusion with EGF. bar graph compiling the average results showing intensity peak in control (n=12), control siRNA 1 (n=11), control siRNA 2 (n=9), PLC $\delta$ 4 siRNA 1 (n=7), PLC $\delta$ 4 siRNA 2-treated (n=7), PLC $\gamma$ 1 siRNA 1 (n=6) or PLC $\gamma$ 1 siRNA 2-treated (n=8) SKHep-1 cells. PKC activation is blocked by PLC $\delta$ 4 siRNAs ( $100.7 \pm 0.4\%$  for siRNA 1 and  $100 \pm 0.7\%$  for siRNA 2, \* $p < 0.05$ ), but not by PLC $\gamma$ 1 siRNAs, compared to control groups.

**Figure 6: Knockdown of PLC $\delta$ 4 diminishes cell growth and decreases cyclins A and B1 without affecting cell death.** **A**, effects of PLC $\delta$ 4 depletion on cell proliferation. BrDu measurements were performed at 48 h after transfection. \* $p < 0.05$ . **B**, quantification of cells labeled with Annexin V-FITC and propidium iodide. The bar graph shows the percentages of cells labeled with either Annexin V-FITC or propidium iodide, or double-labeled with Annexin V-FITC plus propidium iodide compared to all cells from each field. Each treatment was made in triplicate, and for each one, three different images were counted using ImageJ software, then the means were used for statistical analysis. All groups were compared to control groups (control, Lipofectamine and control siRNAs). Doxorubicin (Dox) 10  $\mu$ g/mL was used as positive control and it differs from all experimental groups. \*\*\* $p < 0.001$ . Annexin V staining did not reveal differences in the level of cell death between control and siRNA-treated groups. **C**, western blot showing cyclins A and B1 expression in SKHep-1 cells under controls or siRNA-treated conditions.  $\alpha$ -Tubulin was used as a loading control. Representative image of 3 independent experiments. Middle and right graphs, quantification of the western blots of cyclins that were normalized with the expression of  $\alpha$ -Tubulin (n = 3). \* $p < 0.05$  and \*\*\* $p < 0.001$ . **D**, western blot showing the effects of nuclear InsP<sub>3</sub> buffer on the expression of

the cyclins A and B1. Right graph, quantification of the western blots of cyclins that were normalized with the expression of  $\alpha$ -Tubulin (n =3). \*\*p<0.01.

**Figure 7: Proposed model – EGF triggers nuclear PI(4,5)P<sub>2</sub> hydrolysis, local InsP<sub>3</sub> production, and Ca<sup>2+</sup> release into the nucleoplasm through intra-nuclear PLC $\delta$ 4, which mediates cell proliferation.**

Scheme of the proposed EGF-induced nuclear Ca<sup>2+</sup> signaling pathway: Upon EGF binding EGFR is activated and initiates signal transducer cascades. EGFR is shuttled to the nucleus to induce downstream targets. PLC $\delta$ 4 is a nuclear enzyme induced by EGF stimulus and leads to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) hydrolysis which generates inositol trisphosphate (InsP<sub>3</sub>) and diacylglycerol (DAG). InsP<sub>3</sub> binds to InsP<sub>3</sub> receptors (InsP<sub>3</sub>R) present on the inner nuclear envelope triggering Ca<sup>2+</sup> release in the nucleoplasm. DAG can activate nuclear-resident PKCs. Ca<sup>2+</sup> and PKCs can activate downstream targets which ultimately result in cell proliferation.

**Figure S1: A**, western blot showing cyclins A, B1, D1, D2, D3, E, E2, H, ERK1/2, pERK1/2, AKT, pAKT expression in SKHep-1 cells under controls or siRNA-treated conditions.  $\alpha$ -Tubulin was used as a loading control. Representative image of 3 independent experiments. **B**, quantification of the western blots of cyclins that were normalized with the expression of  $\alpha$ -Tubulin (n =3). \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. **C**, expression recovery of PLC $\delta$ 4 restores SKHep-1 proliferation status. Stable cells with scramble shRNAs and PLC $\delta$ 4 shRNAs were treated with doxycycline for 48h and then cells with PLC $\delta$ 4 shRNAs were kept for another 48h to restore the expression of PLC $\delta$ 4 (recover shRNAs group, \*p<0.05).



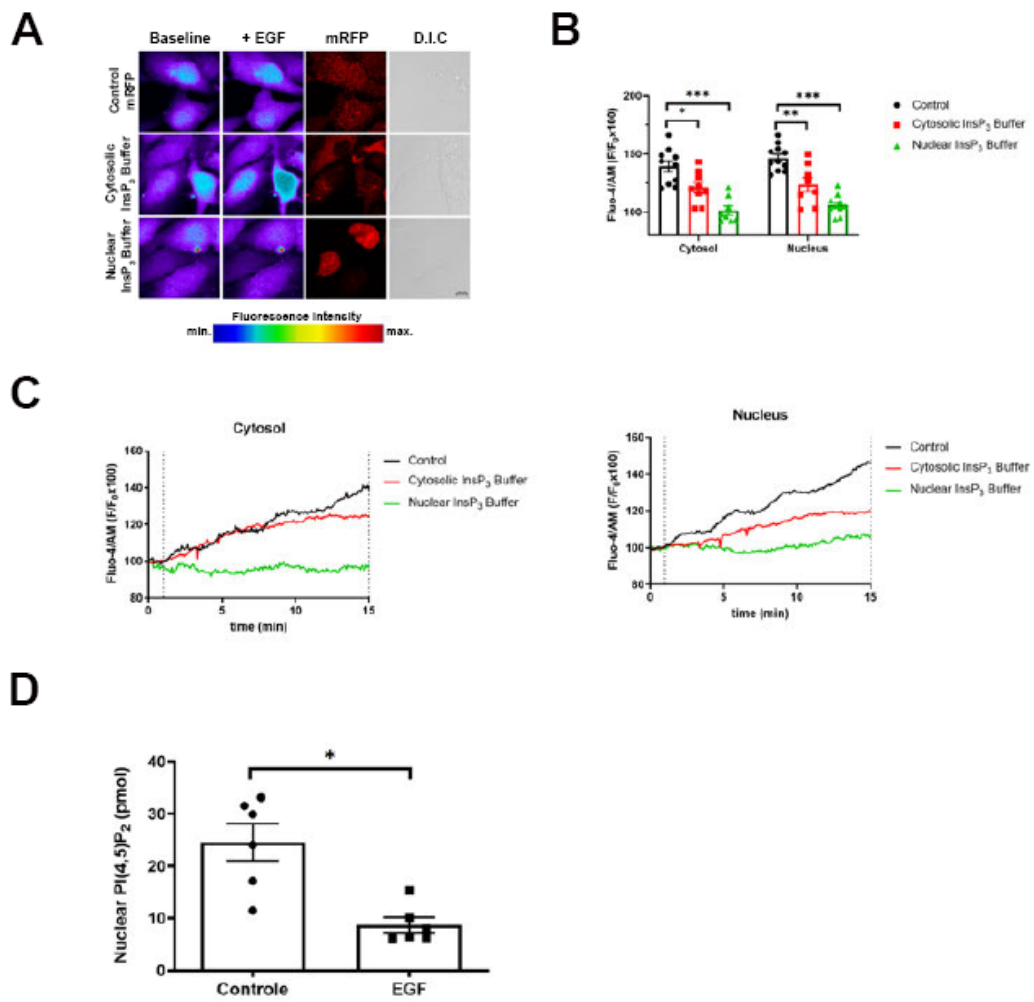


Figure 2

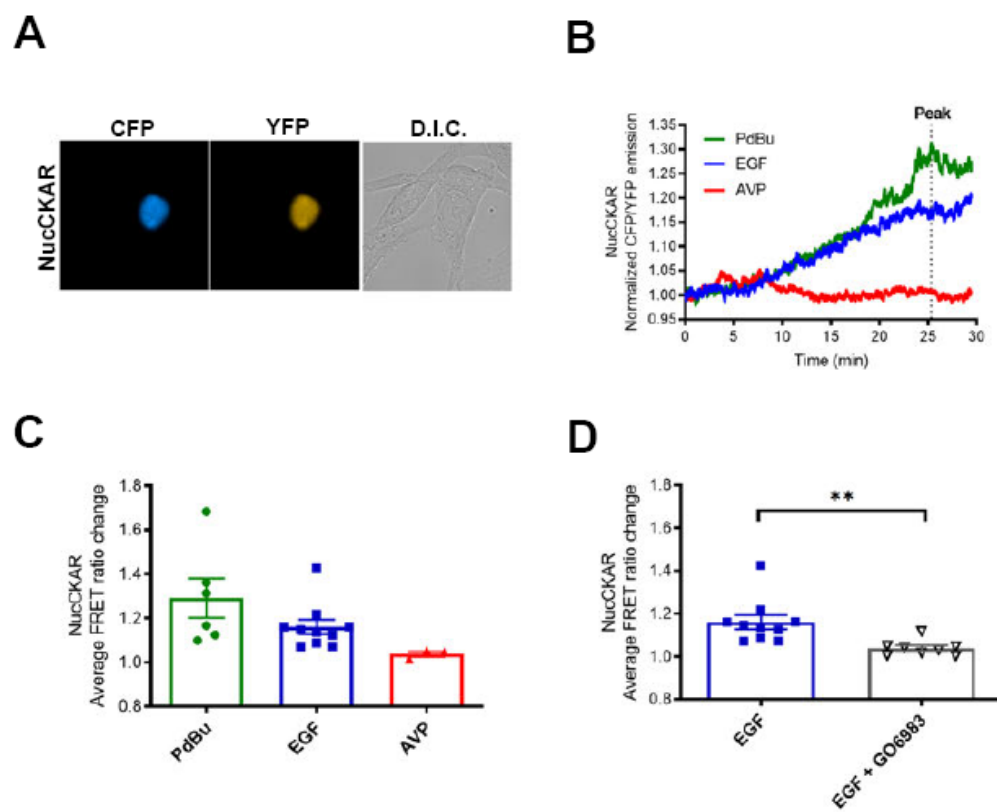
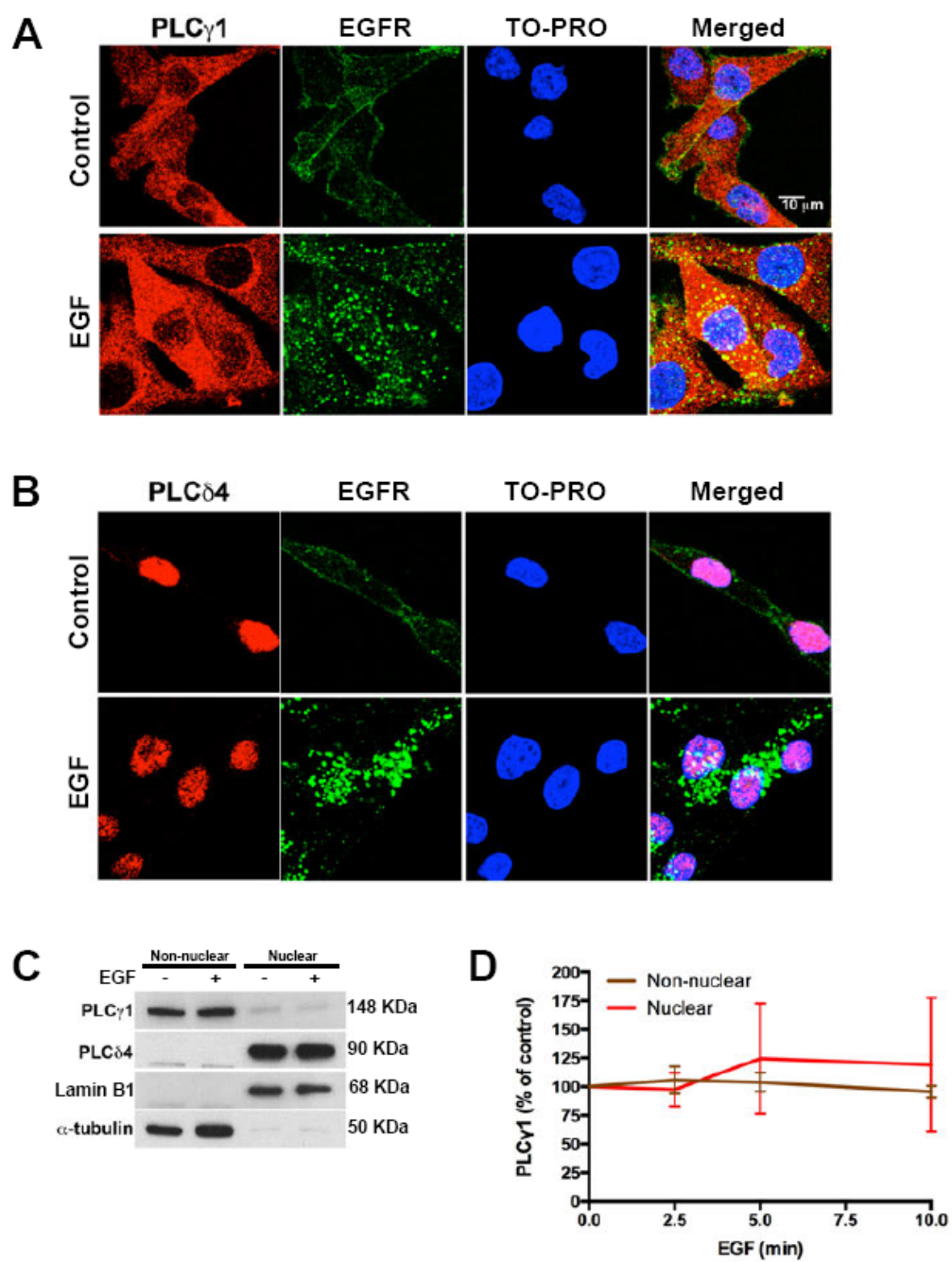


Figure 3



**Figure 4**

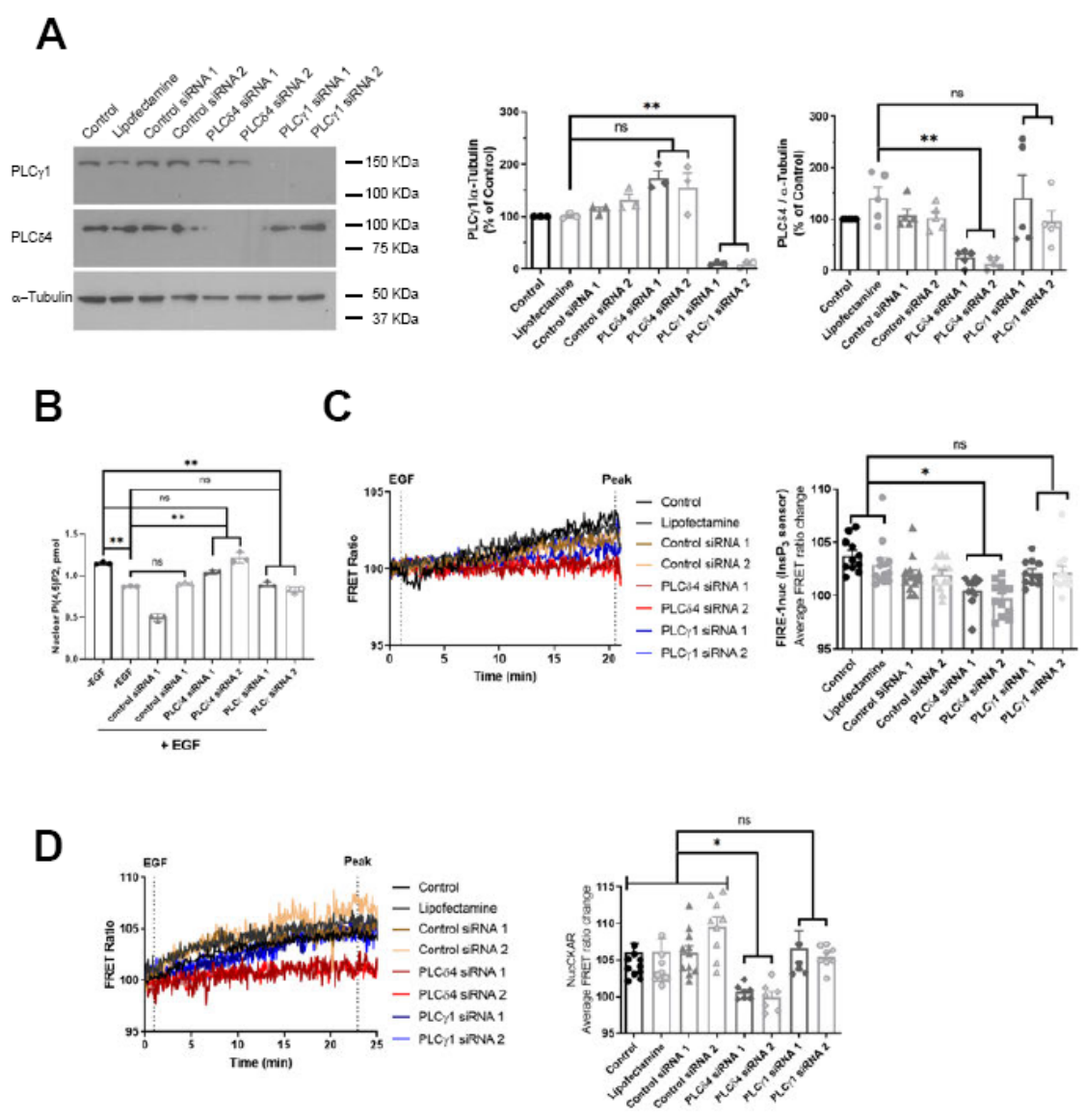
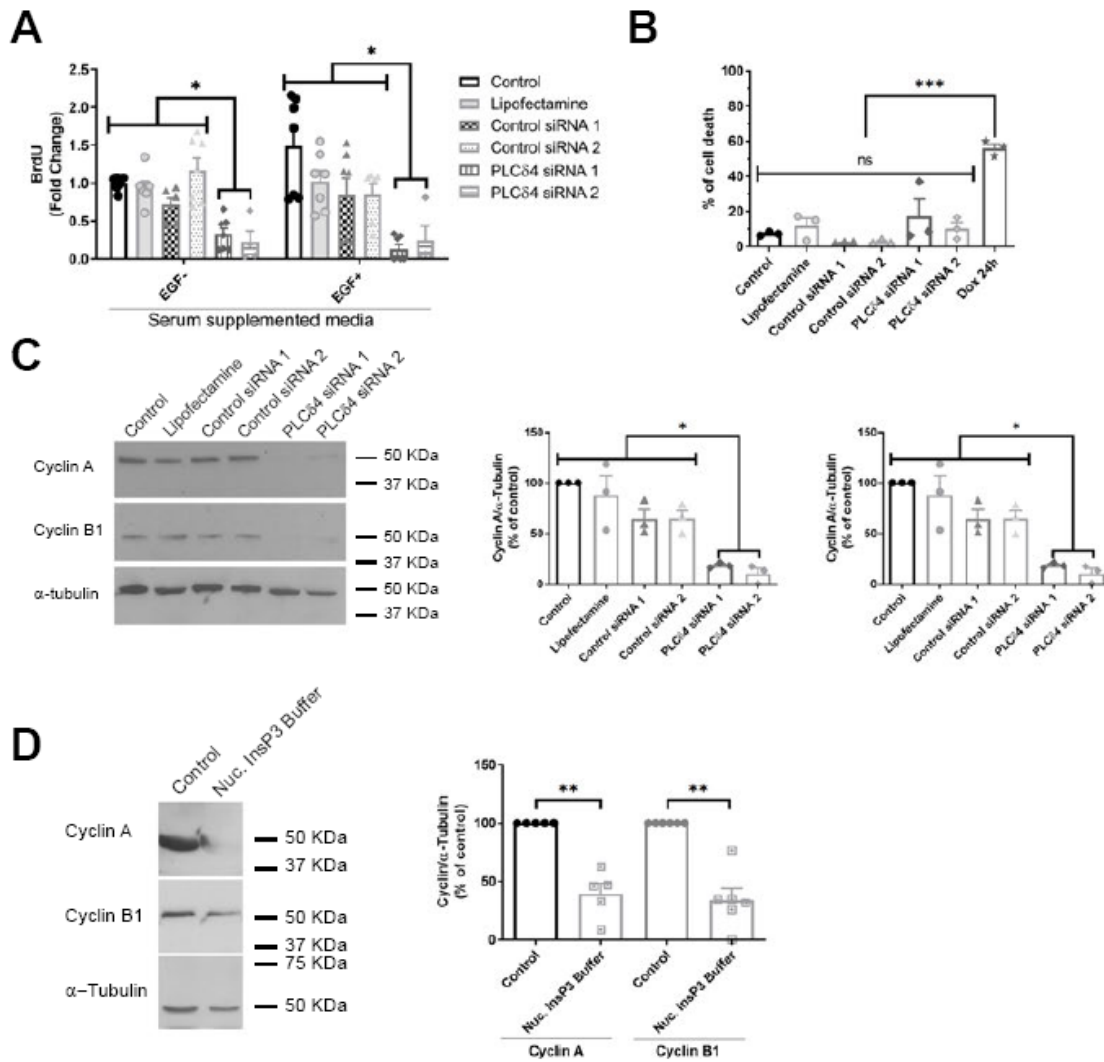
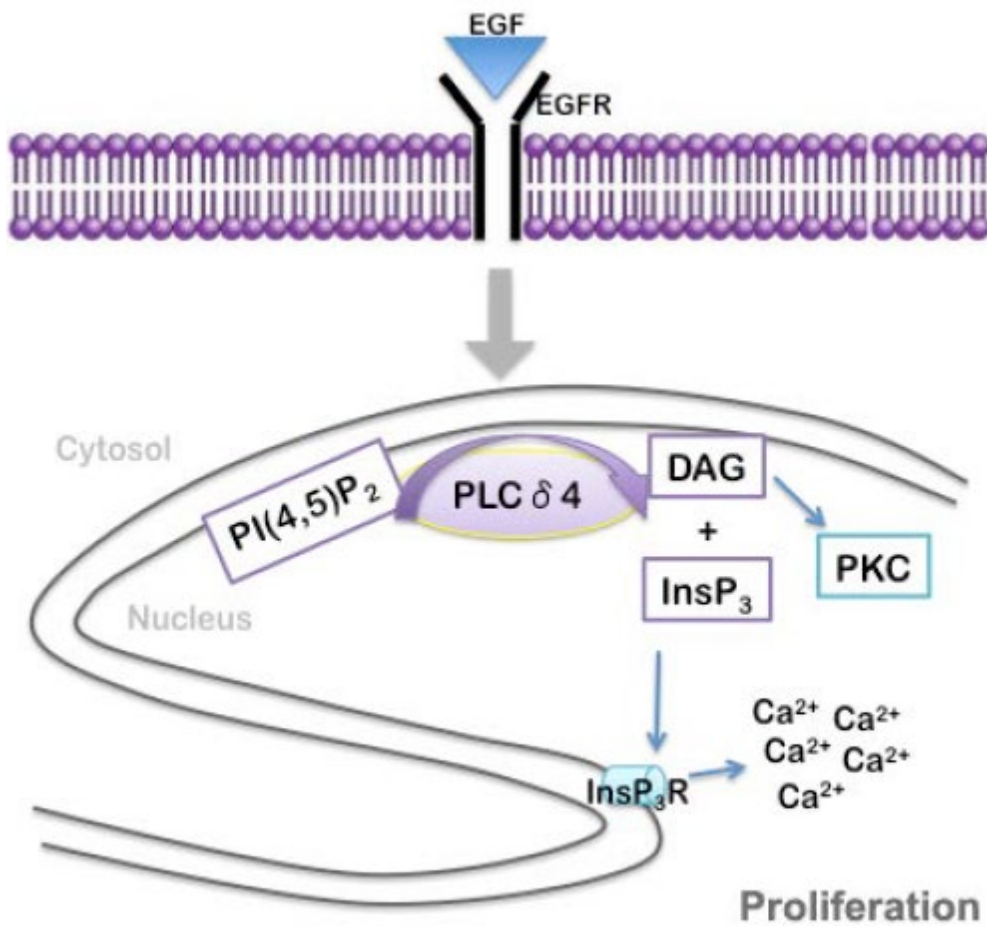


Figure 5





**Figure 7**

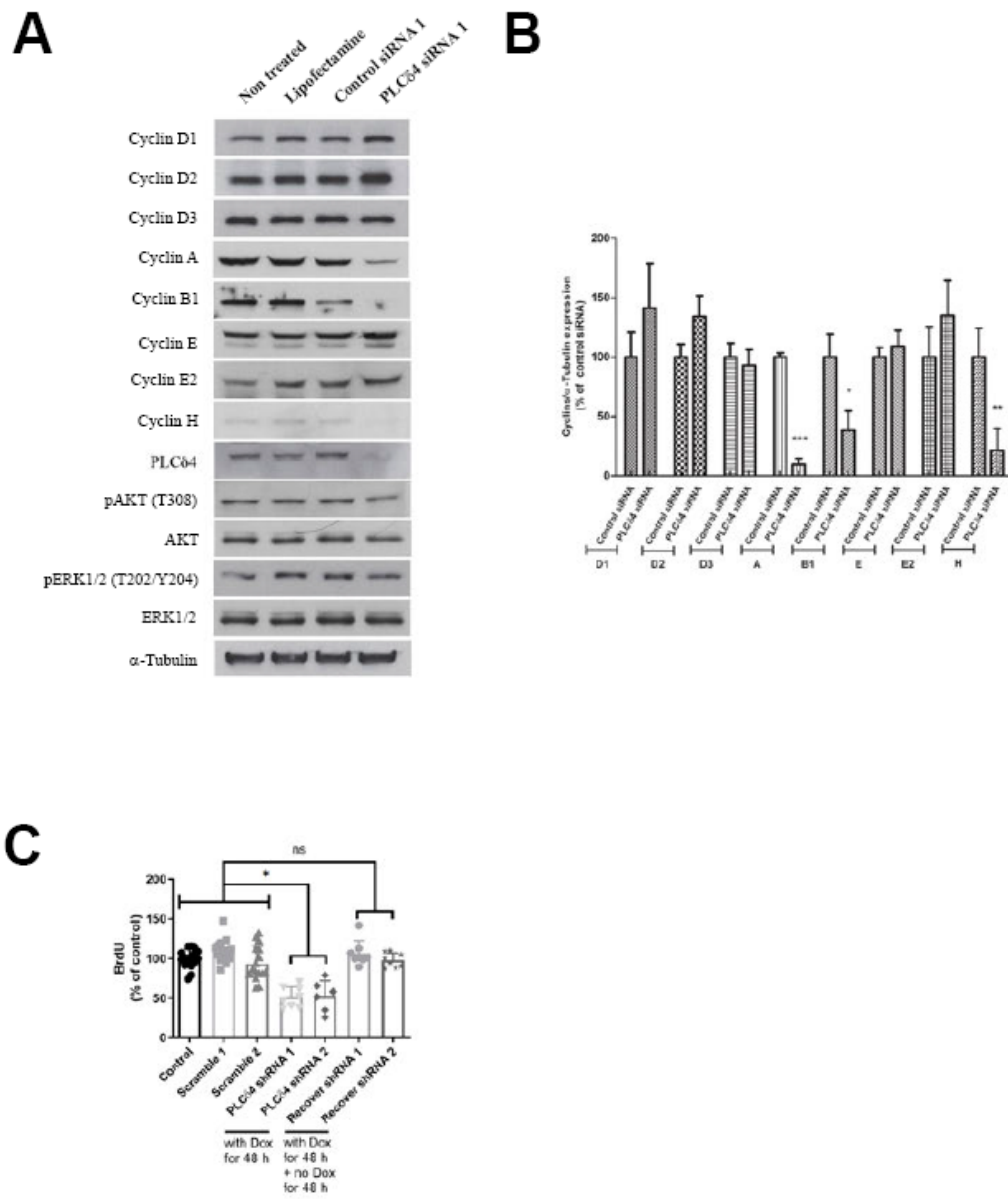


Figure S1

## Anexos

### Anexo A – Publicações em colaboração

Os conhecimentos adquiridos durante o doutoramento permitiram a contribuição para as seguintes publicações:

- 1 - Kunrath-Lima, M., **de Miranda, M. C.**, da Fonseca Ferreira, A., Faraco, C. C. F., de Melo, M. I. A., Goes, A. M., ... & Gomes, D. A. (2018). Phospholipase C delta 4 (PLC $\delta$ 4) is a nuclear protein involved in cell proliferation and senescence in mesenchymal stromal stem cells. Cellular signalling.
- 2 - Ferreira, A. D. F., Cunha, P. D. S., Carregal, V. M., Silva, P. D. C. D., **Miranda, M. C. D.**, Kunrath-Lima, M., ... & Resende, V. (2017). Extracellular vesicles from adiposederived mesenchymal stem/stromal cells accelerate migration and activate AKT pathway in human keratinocytes and fibroblasts independently of miR-205 activity. Stem cells international, 2017.
- 3 - Faraco CCF, Faria JAQA, Kunrath-Lima M, **Miranda M. C.**, de Melo MIA, Ferreira ADF, Rodrigues MA, Gomes DA. Translocation of Epidermal Growth Factor (EGF) to the nucleus has distinct kinetics between adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and a mesenchymal cancer cell lineage. Struct Biol. 2017 Dec 19. pii: S1047- 8477(17)30230-7. doi: 10.1016/j.jsb.2017.12.007.
- 4 - de Melo, M. I. A., da Silva Cunha, P., da Mata Martins, T. M., **de Miranda, M. C.**, Gomes, D. A., de Goes, A. M., & Novato-Silva, E. (2018). Glyphosate-based herbicide induces toxic effects on human adipose-derived mesenchymal stem cells grown in human plasma. Comparative Clinical Pathology, 1- 12.
- 5 - Ferreira, T. H., Miranda, M. C., Rocha, Z., Leal, A. S., Gomes, D. A., & Sousa, E. (2017). An Assessment of the Potential Use of BNNTs for Boron Neutron Capture Therapy. Nanomaterials, 7(4), 82.
- 6 - Lara, G. G., Andrade, G. F., Cipreste, M. F., da Silva, W. M., Gastelois, P. L., Gomes, D. A., **Miranda, M. C.**... & de Sousa, E. M. B. (2018). Protection of normal cells from irradiation bystander effects by silica-flufenamic acid nanoparticles. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 29(8), 130.
- 7 - de Rezende, M. R., Andrade, G. F., Cipreste, M. F., **Miranda, M. C.**, Gomes, D. A., de Barros Correia Menezes, M. Â., & de Sousa, E. M. (2019). 89Sr-doped hydroxyapatite nanoparticles as a potential therapeutic agent for bone tumors. International Journal of Applied Ceramic Technology, 16(5), 1904-1919.
- 8 - dos Apostolos, R. C., Andrade, G. F., da Silva, W. M., de Assis Gomes, D., **de Miranda, M. C.**, & de Sousa, E. M. (2019). Hybrid polymeric systems of mesoporous silica/hydroxyapatite nanoparticles applied

as antitumor drug delivery platform. *International Journal of Applied Ceramic Technology*, 16(5), 1836-1849.

9 - de Oliveira Silva, J., Fernandes, R. S., Oda, C. M. R., Ferreira, T. H., Botelho, A. F. M., Melo, M. M., **Miranda, M. C.**, ... & Rubello, D. (2019). Folate-coated, longcirculating and pH-sensitive liposomes enhance doxorubicin antitumor effect in a breast cancer animal model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 118, 109323.

10 - Cabral, T. C., Ardisson, J. D., **de Miranda, M. C.**, Gomes, D. A., Fernandez-Outon, L. E., Sousa, E. M., & Ferreira, T. H. (2019). Boron nitride nanotube@ NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: a highly efficient system for magnetohyperthermia therapy. *Nanomedicine*, (0).

## Anexo B - Propriedade Intelectual em colaboração

Os conhecimentos adquiridos durante o doutoramento permitiram a contribuição das seguintes patentes:

1. ARDISSON, J. D.; SOUSA, Edesia; ALBUQUERQUE, A. S.; CABRAL, T. C. S.; FERREIRA, T. H.; MIRANDA, Marcelo Coutinho de; GOMES, Dawidson Assis. Processo de obtenção de híbridos de nanotubos de nitreto de boro e ferrita magnética. Pedido de patente: BR 10 2018 06889. Depositado em 17 set. 2018. Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, Brasil.

2. OLIVEIRA, M. C.; GOMES, E. R.; NOVAIS, M. V. M.; PADUA, R. M.; SILVA, I. T.; BRAGA, F. C.; DE BARROS, André Luís Branco; LEITE, E. A.; GOMES, Dawidson Assis; MIRANDA, Marcelo Coutinho de; MUNKET, J.; FRADE, A. C. M. Composição farmacêutica lipossomal contendo substâncias bioativas coencapsuladas com atividade citotóxica e antitumoral. Pedido de patente: BR 10 2018 069645-9. Depositado em 26 set. 2018. Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, Brasil.

3. SILVA; MIRANDA, Marcelo Coutinho de. Aptâmeros de DNA, kit para identificação de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano e seus usos. Pedido de patente: BR 10 2019 014768-7. Depositado em 17 jul. 2019. Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, Brasil.

4. GOES, A. M.; CUNHA, P. S.; GOMES, Dawidson Assis; MIRANDA, Marcelo Coutinho de; MELO, M. I. A.; DA FONSECA FERREIRA, Andrea; FERREIRA, A. F.; GOES, T. S. Aptâmeros de RNA específicos para câncer de mama e seus usos. Pedido de patente: BR 10 2020 024604-6. Depositado em 1 dez. 2020. Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, Brasil.