

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

Marianna Kunrath Lima

**FOSFOLIPASE C DELTA 4 HUMANA (hPLC $\delta$ 4): uma proteína envolvida  
na proliferação e na diferenciação celular**

Belo Horizonte

2018

Marianna Kunrath Lima

**FOSFOLIPASE C DELTA 4 HUMANA (hPLC $\delta$ 4): uma proteína envolvida  
na proliferação e na diferenciação celular**

Versão final

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências com ênfase em Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Dawidson Assis Gomes

Coorientadora: Profa. Dra. Jerusa Araújo Quintão  
Arantes Faria

Belo Horizonte

2018

043

Lima, Marianna Kunrath.

Fosfolipase C delta 4 humana (hPLC $\delta$ 4): uma proteína envolvida na proliferação e na diferenciação celular [manuscrito] / Marianna Kunrath Lima. – 2018.

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

Orientador: Prof. Dr. Dawidson Assis Gomes. Coorientadora: Profa. Dra. Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria.

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. Proliferação de Células. 4. Diferenciação Celular. 5. Senescência Celular. 6. Fosfolipase C delta. I. Gomes, Dawidson Assis. II. Faria, Jerusa Araújo Quintão Arantes. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha  
 31270-901 – Belo Horizonte – MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



**TERMO DE RETIFICAÇÃO DA ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE MARIANNA KUNRATH LIMA, orientada pelo Prof. Dr. Dawidson Assis Gomes da Universidade Federal de Minas Gerais. O presente termo retifica a área de concentração, desse modo alterou-se a titulação conforme disposto a seguir. Aos cinco dias do mês de fevereiro de 2018 às 13h30 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 ""Fosfolipase C delta 4 humana (hPLC $\delta$ 4): uma proteína envolvida na proliferação e na diferenciação celular"", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Biologia Molecular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Dra. Jerusa Araújo Quintão Arantes, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Claire Nain Lunardi Gomes (Universidade Nacional de Brasília - UNB), aprovada; Dra. Deborah Schechtman (Universidade de São Paulo-USP), aprovada; Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. André Ricardo Massensini (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria - Coorientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada;. Pelas indicações a candidata foi considerada:**

**APROVADA**  
 **REPROVADA**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão.

O termo de retificação foi aprovado pela Coordenação do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia, a Profa. Dra. Leda Quercia Vieira.

Belo Horizonte, 06 de Fevereiro de 2018.

**Dra. Leda Quercia Vieira**  
 (Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG)  
 Coordenadora do Programa de Pós-graduação em  
 Bioquímica e Imunologia



Esta tese é dedicada aos meus pais, Geraldo e Anna, e à  
minha irmã, Graciela.

## Agradecimentos

Gostaria de começar agradecendo ao povo brasileiro. Graças aos impostos pagos, com muito suor, por todos, que consegui financiar meus estudos deste doutorado. Desejo retribuir este investimento com meu trabalho. Também gostaria de agradecer às agências financiadoras, CAPES, CNPq, FAPEMIG e NIH pelo apoio financeiro.

Agradeço ao Prof. Dr. Dawidson Assis Gomes por ter me recebido cordialmente em seu laboratório, por ter me dado espaço e suporte para desenvolver meu projeto de doutorado, por ter confiado tanto em meu trabalho! Também agradeço ao Prof. Dr. Alfredo Miranda de Góes, pelos conselhos e críticas que me auxiliaram no meu projeto e na vida.

À Profa. Dra. Jerusa, minha coorientadora (desculpa Je, com você posso ser mais informal!). Foi quem me ensinou os primeiros passos no laboratório, e permaneceu me orientando até o fim. Muito obrigada pelas horas investidas em experimentos, correções e reuniões, e em muitas conversas extra laboratoriais também! Sem você teria sido muito mais difícil!

Ao Marcelo, que merece um parágrafo só pra ele. Você foi minha mão direita nesses quatro anos, me guiou tantas vezes quando eu não sabia por qual caminho seguir, só um parágrafo não seria o suficiente para te agradecer. Que a nossa cumplicidade permaneça independente dos caminhos que sigamos.

Aos meus *lab friends*: Andrea, às vezes taxada como louca pela sua criatividade, uma pessoa sempre disposta a ajudar; Mariane, com os comentários mais engraçados, sempre, independente do assunto em discussão; Camila, a voz da razão, que nos lembra a nunca deixar de analisar os dois lados de uma situação; Joana, com sua sinceridade, que eu aprecio; Pricila, um doce de pessoa, que sempre arruma um tempinho pra dividir sua sabedoria conosco; Carol Andrade, que me ensinou muito sobre Western Blot e cujas verdades, incrivelmente, nunca me magoaram.

Aos colegas de laboratório LICM (Laboratório de Imunologia Celular e Molecular) que, além de me ajudarem nas questões científicas, também fizeram esta jornada mais alegre, com conversas e confraternizações. Gostaria de agradecer

especialmente a Michele, Thaís, Joyce, Eliza, Thalita, Junnia, Lud, Carolzinha, Ju Lott.

Aos laboratórios do Instituto de Ciências Biológicas, principalmente do Departamento de Bioquímica e Imunologia, que auxiliaram com o empréstimo de materiais e com o compartilhamento de conhecimento.

Aos meus amigos do Laboratório de Genética Bioquímica, Mika, Mari Costa, Elizângela, Isabella, Heron, Bruno Repolês, Ceres, Pedro, Carol, Matheus, Léo. Mesmo com a distância conseguimos manter a amizade, vocês sempre me trazem conselhos científicos e pessoais.

Aos meus amigos da graduação, especialmente Zazu, Pat, Mika, Silvinha e Lília, pelos momentos de distração e pelo compartilhamento dos anseios e projetos para o futuro.

Aos meus amigos do Magnum, o BDVA, que com nossos encontros me fizeram lembrar que existe vida além do laboratório!

Finalmente, agradeço minha família, que sempre me deu o apoio incondicional para eu seguir minhas aspirações. Aos meus pais, Geraldo e Anna, por me darem o exemplo de que se você der o melhor de si, o melhor irá lhe ocorrer. Ao meu cunhado, Denis, pelo companheirismo. À minha irmã, Graciela, que pacientemente escutou meus anseios e minhas dúvidas, que me deu consultorias científicas, que sempre esteve disponível para me auxiliar, em qualquer situação.

Muito obrigada a todos!

*“Only when our clever brain and our human heart  
work together can we reach our full potential.”*

*“Somente quando nosso cérebro inteligente e nosso coração humano  
trabalham juntos que podemos alcançar nosso potencial total.”*

Jane Goodall, primatologista e antropóloga

## Resumo

O  $\text{Ca}^{2+}$  é um importante segundo mensageiro que está envolvido na regulação de diversos processos celulares, como morte e proliferação. O aumento dos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  pode se dar pela geração de inositol 1, 4, 5-trisfosfato ( $\text{InsP}_3$ ), resultante da hidrólise de fosfatidilinositol 4, 5-bisfosfato ( $\text{PIP}_2$ ) por fosfolipases C (PLCs), que leva à liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos receptores de  $\text{InsP}_3$  ( $\text{InsP}_3\text{R}$ ). A liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pode acontecer tanto no citosol quanto no núcleo, via PLCs, mas pouco se conhece sobre a ativação destas proteínas no núcleo. O objetivo deste trabalho foi estudar a função da PLC $\delta$ 4 em células mesenquimais. Esta proteína tem sido apontada como uma proteína nuclear e parece estar envolvida em processos proliferativos. Nesta tese, foram utilizadas duas células humanas mesenquimais: as células tumorais SK-HEP-1 e células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (hASC) para a caracterização fenotípica de PLC $\delta$ 4 humana (hPLC $\delta$ 4). Em SK-HEP-1, o silenciamento de hPLC $\delta$ 4 por RNA de interferência reduziu a proliferação celular, sem aumento da morte celular, mas com aumento da porcentagem de células nas fases G1 e G2/M do ciclo celular e redução da expressão das ciclinas A, B1 e H. Em hASC, primeiramente foi feita a localização subcelular de hPLC $\delta$ 4, utilizando-se microscopia confocal. Esta proteína mostrou-se predominantemente nuclear, e ensaios de fracionamento celular também mostraram a presença de hPLC $\delta$ 4 no núcleo de hASC. Em análises de expressão proteica após diferenciação celular, foi visto que a expressão de PLC $\delta$ 4 aumentou com a diferenciação adipogênica, mas não com a diferenciação osteogênica. O *knockdown* de PLC $\delta$ 4 em hASC, assim como em SK-HEP-1, diminuiu a proliferação celular, sem aumento da morte celular. Entretanto, para as células silenciadas foi observado um aumento do número de células apenas na fase G1 do ciclo celular, com redução do número de células em interfase e G2/M. A redução da expressão de PLC $\delta$ 4 em hASC levou a um aumento da porcentagem de células senescentes, o que poderia explicar a redução da proliferação destas células. Desse modo, os resultados obtidos mostram que a PLC $\delta$ 4 humana está envolvida em processos de proliferação e diferenciação celular, sendo estes processos possivelmente mediados pelo  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear.

Palavras-chave: PLC $\delta$ 4 humana. Sinalização de cálcio nuclear. Sinalização de cálcio. Proliferação celular. Diferenciação celular. Senescência celular.

## Abstract

$\text{Ca}^{2+}$  is an important second messenger within cells, and it is involved in many cellular processes, like death and proliferation. The raise in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels can be due to the generation of inositol 1, 4, 5-trisphosphate ( $\text{InsP}_3$ ), which is a product of phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate ( $\text{PIP}_2$ ) hydrolysis by phospholipases C (PLCs) that leads to  $\text{Ca}^{2+}$  release by  $\text{InsP}_3\text{R}$ .  $\text{Ca}^{2+}$  release can occur in both cytosol and nucleus, via PLCs, but little is known about these enzymes' activation in the nucleus. The objective of this work was to study PLC $\delta$ 4 function in mesenchymal cells. This protein, which has not been extensively studied, has been pointed out as nuclear and it has a possible role in proliferative processes. In this thesis, two human mesenchymal cell models were used to phenotypically characterize human PLC $\delta$ 4 (hPLC $\delta$ 4): SK-HEP-1 tumor cells and human adipose-derived stem cells (hASC). In SK-HEP-1, hPLC $\delta$ 4 silencing by siRNA reduced cell proliferation, without cell death increase, but with an increase in the percentage of cells on G1 and G2/M cell cycle phases and reduction in the expression of cyclins A, B1 and H. For hASC, initially we proceeded to the subcellular localization of hPLC $\delta$ 4, using confocal microscopy. This protein showed to be mainly nuclear, being the nuclear presence of hPLC $\delta$ 4 confirmed by cell fractionation. When hASC were submitted to cell differentiation, it was observed an increase in PLC $\delta$ 4 protein expression after adipogenic differentiation, but this increase was not observed for cells that were incubated with osteogenic inducers. hASC PLC $\delta$ 4 knockdown, as for SK-HEP-1, showed reduced cell proliferation, without cell death increase. However, for silenced cells it was observed an increase of cells on G1 and a reduction of cells on interphase and G2/M. PLC $\delta$ 4 silencing increased the percentage of senescent cells in hASC, what could explain the reduction in cell proliferation. Thus, these data show that human PLC $\delta$ 4 is involved in cellular differentiation and cellular proliferation, being these processes possibly mediated by nuclear  $\text{Ca}^{2+}$ .

Keywords: Human PLC $\delta$ 4. Nuclear calcium signaling. Calcium signaling. Cellular proliferation. Cellular differentiation. Cellular senescence.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Reguladores do fluxo e da atividade do $\text{Ca}^{2+}$ intracelular.....	21
Figura 2: $\text{Ca}^{2+}$ nuclear.....	23
Figura 3: Representação esquemática das classes de PLCs e seus domínios proteicos.....	25
Figura 4: Representação esquemática das vias de sinalização envolvidas na ativação de PLCs primárias e secundárias. ....	27
Figura 5: A PLC $\delta$ 4 é localizada no núcleo de células SK-HEP-1. ....	31
Figura 6: O silenciamento da PLC $\delta$ 4 inibe a hidrólise de $\text{PIP}_2$ nuclear induzida por EGF.....	32
Figura 7: EGF ativa PKCs nucleares. ....	33
Figura 8: Esquema da proposta de sinalização de cálcio nuclear induzida por EGF.....	34
Figura 9: Células SK-HEP-1 e células-tronco mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo (hASC). ....	36
Figura 10: O silenciamento de <i>PLC<math>\delta</math>4</i> reduz a proliferação de células SK-HEP-1.....	57
Figura 11: A transfecção com siPLC $\delta$ 4 não induz uma resposta de morte celular em células SK-HEP-1. ....	59
Figura 12: A redução do conteúdo de PLC $\delta$ 4 leva a um aumento de células SK-HEP-1 nas fases G e G2/M do ciclo celular.. ....	60
Figura 13: O silenciamento de PLC $\delta$ 4 altera a expressão de ciclinas na linhagem SK-HEP-1. ....	62
Figura 14: Caracterização imunofenotípica das células-tronco mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo (hASC). ....	64
Figura 15: Diferenciações adipogênica e osteogênica das células-tronco mesenquimais humanas (hASC).....	65
Figura 16: A expressão da proteína PLC $\delta$ 4 aumenta em hASC que passaram por diferenciação adipogênica.....	67
Figura 17: PLC $\delta$ 4 localiza-se predominantemente no núcleo de hASC. ....	69
Figura 18: Estímulo com EGF leva à translocação de EGFR e ao aumento da expressão de PLC $\delta$ 4 em hASC.....	71



Figura 19: A sequência de siPLCδ4 é eficiente na redução da expressão de PLCδ4 em hASC. ....	73
Figura 20: <i>Knockdown</i> de PLCδ4 reduz o crescimento celular em células-tronco mesenquimais. ....	75
Figura 21: Diminuição de PLCδ4 em células-tronco mesenquimais leva ao aumento do número de células na fase G1 e redução em S e G2/M. ....	77
Figura 22: O silenciamento de PLCδ4 reduz a quantidade de células EdU-positivas. ....	78
Figura 23: O silenciamento de PLCδ4 reduz a quantidade de células pH3-positivas. ....	79
Figura 24: O <i>knockdown</i> de PLCδ4 aumenta a porcentagem de células senescentes. ....	81
Figura 25: Os iniciadores para amplificação da sequência de cDNA de <i>PLCδ4</i> geram amplicons do tamanho esperado. ....	104
Figura 26: Avaliação da eficiência para dos iniciadores utilizados nas reações de PCR quantitativa em tempo real. ....	105
Figura 27: Análises de NLS e NES na sequência proteica de hPLCδ4. ....	107
Figura 28: Variantes anotadas no GenBank para hPLCδ4. ....	108

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos primários utilizados para Western Blot.....	44
Tabela 2: Sequências dos iniciadores utilizados para Real Time qPCR.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i> Grupamento de diferenciação
<b>CDK</b>	<i>Cyclin-Dependent Kinase</i> Cinase dependente de ciclina
<b>DAG</b>	<i>Diacylglycerol</i> Diacilglicerol
<b>EdU</b>	<i>5-ethynil-2'-deoxyuridine</i> 5-etinil-2'-deoxiuridina
<b>EGF</b>	<i>Epidermal Growth Factor</i> Fator de crescimento epidermal
<b>EGFR</b>	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> Receptor para o fator de crescimento epidermal
<b>ERK</b>	<i>Extracellular-Regulated Kinase</i> Cinase regulada por sinal extracelular
<b>GPCR</b>	<i>G Protein-Coupled Receptor</i> Receptor acoplado à proteína G
<b>hASC</b>	<i>Human Adipose-derived Stem Cell</i> Célula-tronco humana derivada de tecido adiposo
<b>IUBMB</b>	<i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i> União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
<b>InsP<sub>3</sub></b>	<i>Inositol 1, 4, 5-triphosphate</i> Inositol 1, 4, 5-trisfosfato
<b>InsP<sub>3</sub>R</b>	<i>Inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor</i> Receptor de inositol 1, 4, 5-trisfosfato
<b>mRNA</b>	<i>messenger RNA</i> RNA mensageiro
<b>NES</b>	<i>Nuclear Export Signal</i> Sinal de exclusão nuclear
<b>NLS</b>	<i>Nuclear Localization Sequence</i>

	Sinal de localização nuclear
<b>pH3</b>	<i>phospo-Histone H3</i> Histona H3 fosforilada
<b>PIP<sub>2</sub></b>	<i>Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate</i> Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
<b>PI-PLC</b>	<i>Phosphoinositide-specific phospholipase C</i> Fosfolipase C específica para fosfoinosítídeos
<b>PLC</b>	<i>Phospholipase C</i> Fosfolipase C
<b>PLB<math>\beta</math></b>	<i>Phospholipase C beta</i> Fosfolipase C beta
<b>PLC<math>\delta</math>4</b>	<i>Phospholipase C delta 4</i> Fosfolipase C delta 4
<b>PLC<math>\epsilon</math></b>	<i>Phospholipase C epsilon</i> Fosfolipase C epsilon
<b>PLC<math>\gamma</math></b>	<i>Phospholipase C gamma</i> Fosfolipase C gama
<b>PLC<math>\eta</math></b>	<i>Phospholipase C eta</i> Fosfolipase C eta
<b>PLC<math>\zeta</math></b>	<i>Phospholipase C zeta</i> Fosfolipase C zeta
<b>PKC</b>	<i>Protein Kinase C</i> Proteína cinase C
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i> Ácido ribonucleico
<b>RTK</b>	<i>Receptor tyrosine kinase</i> Receptor tirosina cinase
<b>RyR</b>	<i>Ryanodine Receptor</i> <i>Receptor de Rianodina</i>
<b>siPLC<math>\delta</math>4</b>	<i>siRNA for PLC<math>\delta</math>4</i> RNA de interferência cujo alvo é PLC $\delta$ 4

<b>siRNA</b>	<i>small interfering RNA</i> RNA de interferência
<b>siSCR</b>	<i>Scrambled siRNA</i> RNA de interferência sem alvo
<b>TBST</b>	<i>Tris-buffered saline solution with Tween® 20</i> Solução salina tamponada com Tris, contendo Tween® 20

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>20</b>
1.1. O íon cálcio (Ca <sup>2+</sup> ) e a sinalização intranuclear	20
1.2. Fosfolipases C (PLCs)	24
1.3. Fosfolipase C delta 4 (PLCδ4)	28
1.4. Células SK-HEP-1 e células-tronco mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo (hASC)	35
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>38</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>39</b>
3.1. Objetivo geral	39
3.2. Objetivos específicos	39
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>40</b>
4.1. Cultivo de SK-HEP-1	40
4.2. Isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo (hASC)	40
4.3. Caracterização imunofenotípica de hASC	41
4.4. Transfecção com siRNA	42
4.5. Extração de proteínas totais	42
4.6. Estímulo com EGF e fracionamento celular	43
4.7. Western Blot	43
4.8. Extração de RNA, tratamento com DNase I e síntese de cDNA	45
4.9. Real Time qPCR (Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real quantitativa)	45
4.10. Curva de crescimento	47
4.11. Morte celular	47
4.12. Avaliação da proliferação e ciclo celular	48
4.13. Análises <i>in silico</i> de predição de localização subcelular e de domínios proteicos	49
4.14. Imunofluorescência	50
4.15. Diferenciação das células-tronco	50
4.15.1. Meio adipogênico	50
4.15.2. Meio osteogênico	50

4.15.3.	Indução da diferenciação celular .....	51
4.15.4.	Avaliação das diferenciações celulares por colorações específicas ..	51
4.15.4.1.	Coloração Oil Red O (Óleo Vermelho) – Diferenciação adipogênica	51
4.15.4.2.	Coloração Von Kossa – Diferenciação osteogênica .....	52
4.16.	Ensaio de avaliação da redução de resazurina em resofurina.....	52
4.17.	Ensaio de incorporação de 5-etinil-2'-deoxiuridina (EdU) .....	52
4.18.	Ensaio de quantificação de histona H3 fosforilada Ser10 (pH3 S10p) .....	53
4.19.	Ensaio de senescência (atividade de $\beta$ -galactosidase associada à senescência (SA- $\beta$ -Gal)).....	54
4.20.	Análise estatística .....	55
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>56</b>
5.1.	Capítulo I – Caracterização de PLC $\delta$ 4 em células SK-HEP-1 .....	56
5.1.1.	O silenciamento de PLC $\delta$ 4 reduz a taxa de crescimento das células SK-HEP-1	56
5.1.2.	A redução da proliferação das células transfectadas com siPLC $\delta$ 4 não está relacionada a um aumento da morte celular .....	56
5.1.3.	O <i>knockdown</i> de <i>PLC<math>\delta</math>4</i> leva ao acúmulo de células nas fases G1 e G2/M do ciclo celular .....	58
5.1.4.	A diminuição da expressão de <i>PLC<math>\delta</math>4</i> afeta a expressão de ciclinas....	61
5.2.	Capítulo II – Células-tronco mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo (hASC).....	63
5.2.1.	Caracterização das células-tronco mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo (hASC) .....	63
5.2.2.	A expressão de PLC $\delta$ 4 aumenta com o decorrer da diferenciação adipogênica .....	66
5.2.3.	PLC $\delta$ 4 está predominantemente localizada no núcleo das hASC.....	68
5.2.4.	Após estímulo com EGF, há aumento dos níveis proteicos de PLC $\delta$ 4 na célula, sem alteração de sua compartimentalização .....	70
5.2.5.	Células-tronco transfectadas com siPLC $\delta$ 4 apresentam redução do crescimento celular, mas não possuem aumento da morte celular .....	72
5.2.6.	O <i>knockdown</i> de <i>PLC<math>\delta</math>4</i> leva à parada do ciclo celular.....	76
5.2.7.	siPLC $\delta$ 4 reduz a quantidade de células em interfase e mitose .....	76
5.2.8.	A redução da expressão de <i>PLC<math>\delta</math>4</i> induz a senescência em hASC .....	80
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>82</b>



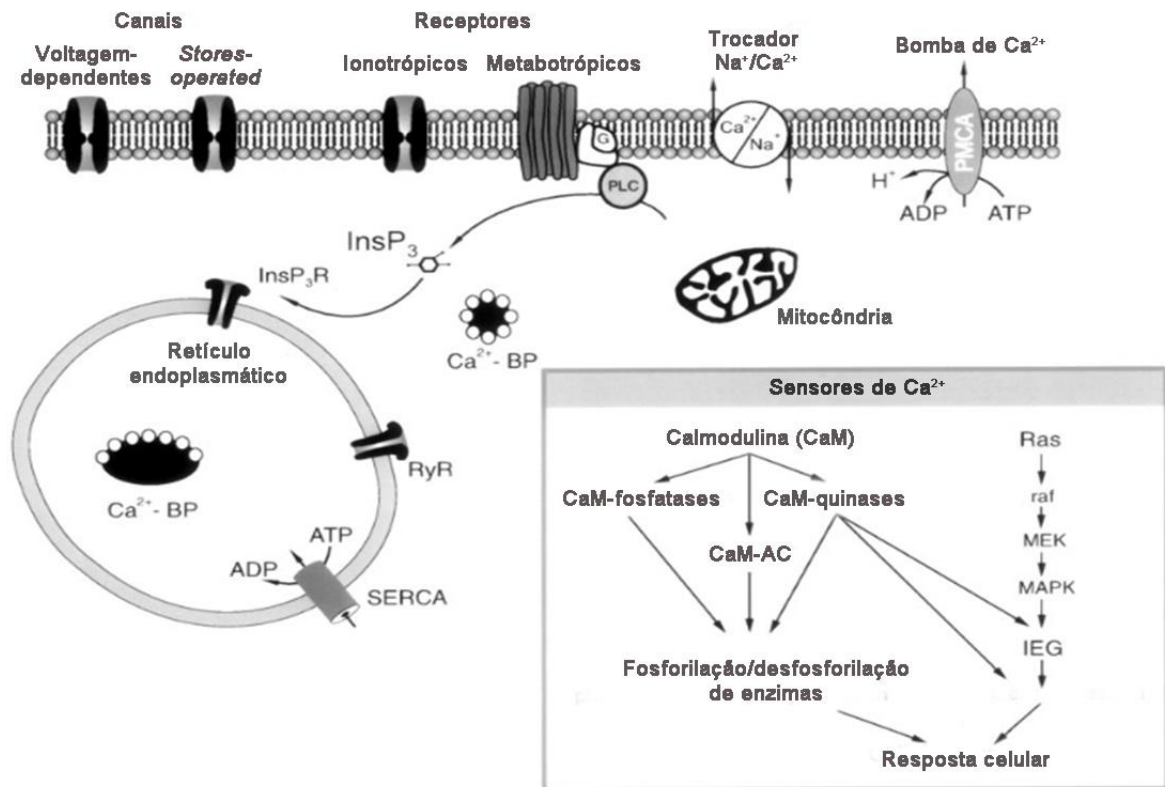
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>91</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>102</b>
8.1.	Aceite do comitê de ética .....	102
8.2.	Gel PCR iniciadores hPLCδ4 .....	104
8.3.	Testes de eficiência para os iniciadores - Real Time qPCR.....	105
8.4.	Análises NLS e NES .....	106
8.5.	Variantes hPLCδ4 .....	108
8.6.	Artigo “Epidermal growth factor (EGF) triggers nuclear calcium signaling through intra-nuclear phospholipase C delta-4 (PLCD4) that is involved in cell proliferation”, De Angelis et al., não publicado. ....	109
8.7.	Artigo “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.”, Faraco et al., 2017. ....	110
8.8.	Manuscrito.....	111

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. O íon cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e a sinalização intranuclear

O  $\text{Ca}^{2+}$  é um importante segundo mensageiro que está envolvido na regulação de diversos eventos, como contração muscular, proliferação celular, fertilização do óvulo e secreção (Berridge et al., 2000). Sua versatilidade deve-se à sua capacidade de ser finamente modulado, sendo que diferentes padrões de distribuição espaço-temporal, de concentração e de velocidade da transmissão do sinal gerado podem levar a respostas celulares distintas (Berridge et al., 2000). Além disso, altas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  podem ser tóxicas, levando à morte celular, o que também faz com que este íon seja altamente regulado nas células (Berridge et al., 2000).

Existem várias moléculas que regulam o fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  nas células (Figura 1). Algumas participam do influxo ou efluxo deste íon pela membrana plasmática e outras de seu transporte pelos estoques intracelulares. Por exemplo, os canais iônicos, que permitem a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  do meio extracelular para o meio intracelular e os receptores de rianodina (RyR) e de inositol 1, 4, 5-trisfosfato ( $\text{InsP}_3\text{R}$ ), que regulam a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo endoplasmático (Berridge, 2002; Parys and De Smedt, 2012). O aumento dos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  pode se dar pela geração de inositol 1, 4, 5-trisfosfato ( $\text{InsP}_3$ ), resultante da hidrólise de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato ( $\text{PIP}_2$ ) por fosfolipases C específicas para fosfoinosítídeos (PI-PLCs), que levam à liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos receptores de  $\text{InsP}_3$  ( $\text{InsP}_3\text{R}$ ) (Fedorenko et al., 2014). Esta via é ativada por receptores acoplados à proteína G, ou por receptores da família de tirosina cinase (RTKs), via PLCs. O  $\text{Ca}^{2+}$  liberado liga-se a moléculas sensoras, como as calmodulinas e as calcineurinas, que alteram a atividade celular, sendo que a intensidade e a duração das respostas variam de acordo com a sensibilidade e a especificidade destas proteínas sensoras (Berridge et al., 2003). As calmodulinas e calcineurinas, por exemplo, podem ativar diversas vias de sinalização, como as mediadas pelos fatores de transcrição fator nuclear de células T ativadas (NFAT) e fator nuclear potenciador da cadeia leve  $\kappa$  de células B ativadas (NF $\kappa$ B), entre outros, regulando a expressão gênica (Humeau et al., 2017).

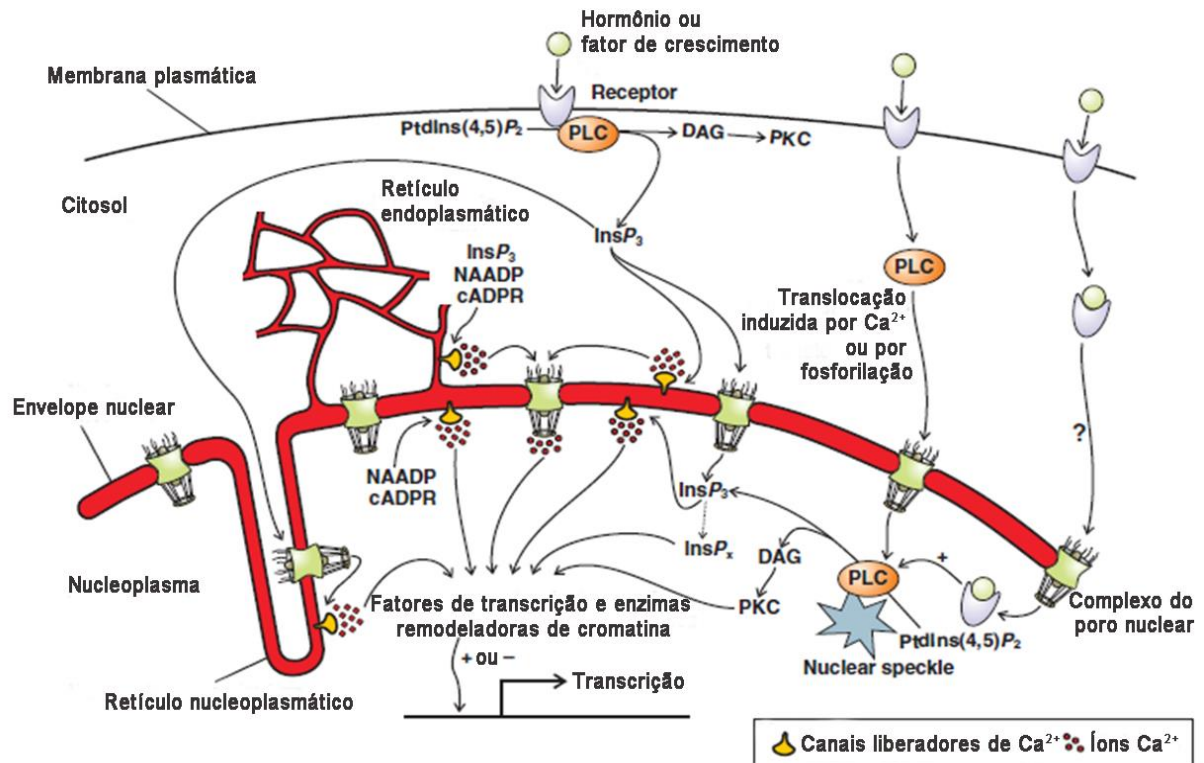


**Figura 1: Reguladores do fluxo e da atividade do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.** Existem diversas moléculas que controlam o fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  nas células, como os canais iônicos na membrana plasmática que permitem a entrada do  $\text{Ca}^{2+}$ , os receptores de  $\text{InsP}_3$  e rianodina no retículo endoplasmático, que levam à liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma, as PLCs (fosfolipases C; ativadas por receptores ligados à proteína G, ou por receptores tirosina cinase (RTKs) que geram  $\text{InsP}_3$  a partir de  $\text{PIP}_2$ , levando à ativação dos receptores de  $\text{InsP}_3$ , trocadores e bombas na membrana plasmática que jogam  $\text{Ca}^{2+}$  para o meio extracelular, entre outros. Além disso, existem moléculas sensoras, como as calmodulinas, que alteram a atividade celular após ligarem-se ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Adaptado de Verkhatsky et al., 1998 (Verkhatsky et al., 1998).

Certos eventos regulados pelo  $\text{Ca}^{2+}$  ocorrem especificamente no núcleo das células (Figura 2), e várias evidências apontam que o  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear e o  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico podem regular diferentes processos (Gomez-Ospina et al., 2006; Hardingham et al., 1997; Malviya and Rogue, 1998; Pusch et al., 2002; Rodrigues et al., 2007). A sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear pode ser resultado da difusão de um sinal do citoplasma para o núcleo, ou de um sinal gerado no próprio núcleo (Malviya and Rogue, 1998). Sendo assim, o núcleo deve conter tanto estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  quanto a maquinaria necessária para gerar sua sinalização.

O  $\text{Ca}^{2+}$  é estocado no lúmen do envelope nuclear, que é uma estrutura contígua com o retículo endoplasmático (Echevarria et al., 2003). Esta estrutura pode ter invaginações das duas membranas nucleares ou somente da membrana nuclear interna, e tem sido proposto o nome de retículo nucleoplasmático para esta organela (Lee et al., 2006; Malhas et al., 2011; Wu and Bers, 2006). No retículo nucleoplasmático podem ser encontrados os receptores de rianodina e de  $\text{InsP}_3$  (Echevarria et al., 2003; Leite et al., 2003; Marius et al., 2006; Tasker et al., 2000). Além disso, o núcleo contém enzimas e substratos necessários para a produção de  $\text{InsP}_3$  (Gomes et al., 2008). Estudos demonstram a detecção de  $\text{PIP}_2$  no núcleo (Payraastre et al., 1992; Vann et al., 1997), bem como a presença de isoformas nucleares de PLCs, como  $\gamma 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\delta 1$  e  $\delta 4$  (Faenza et al., 2013).

Apesar das evidências de que o núcleo possui os componentes necessários para a sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  independente do citosol, pouco se sabe sobre como essa sinalização é desencadeada. As PLCs poderiam estar envolvidas na sinalização primária de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear, uma vez que a ativação de  $\text{InsP}_3$  é o mecanismo mais amplamente implicado na liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  no núcleo (Bootman et al., 2009). As PLCs clivam  $\text{PIP}_2$  em diacilglicerol (DAG) e  $\text{InsP}_3$  (Berridge and Irvine, 1984). O DAG pode ativar proteínas cinases C (PKCs) que fosforilam diversas proteínas associadas à diferenciação celular, proliferação e transformação neoplásica e o  $\text{InsP}_3$  liga-se aos seus receptores presentes no envelope nuclear, levando à liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  no núcleo (Poli et al., 2016). No núcleo,  $\text{Ca}^{2+}$  pode estimular a transcrição através da proteína de ligação ao elemento de resposta a AMP cíclico (CREB), na presença de calmodulinas. Isto pode levar à ativação



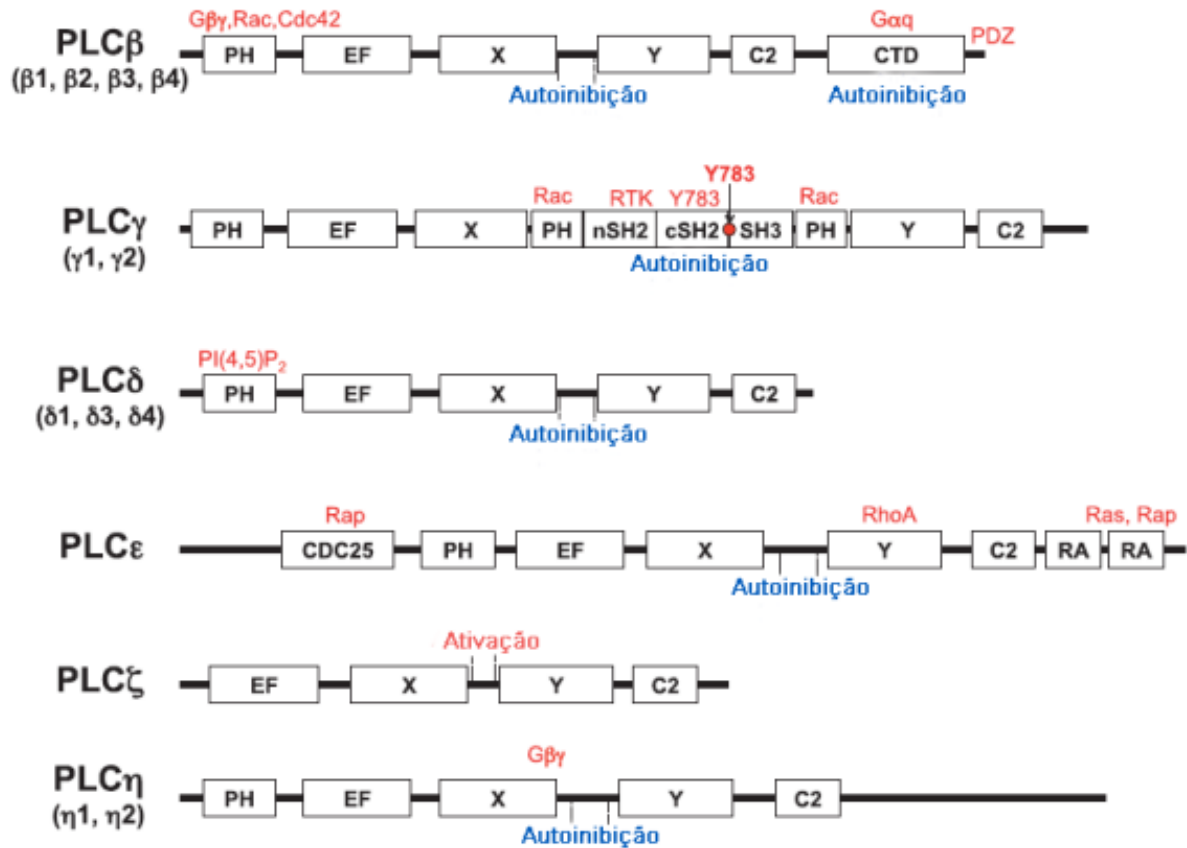
**Figura 2:  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear.** Certos eventos regulados por  $\text{Ca}^{2+}$  ocorrem especificamente no núcleo das células, e várias evidências apontam que o  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear e o  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico podem regular diferentes processos. A sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear pode resultar tanto de uma sinalização global, vinda da membrana plasmática e/ou do citosol, quanto de um sinal local. Para isso, o núcleo deve conter estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  e a maquinaria para gerar sua sinalização. O lúmen do envelope nuclear contém estoques de  $\text{Ca}^{2+}$ ; o retículo nucleoplasmático contém receptores de rianodina e de  $\text{InsP}_3$ . O núcleo também contém PLCs, que geram  $\text{InsP}_3$  e DAG neste compartimento celular, sendo que DAG ativa as PKCs, amplificando o sinal. Por fim, esta sinalização culmina na ativação ou inativação de genes envolvidos nos mais diversos processos celulares, como proliferação e diferenciação celular. Adaptado de Bootman et al., 2009 (Bootman et al., 2009).

de NFAT e NF $\kappa$ B, que por sua vez influenciam a proliferação celular (Humeau et al., 2017).

## 1.2. Fosfolipases C (PLCs)

As fosfolipases C específicas para fosfoinosítídeos (PI-PLCs; 1-fosfatidil-1D-*myo*-inositol-4,5-bisfosfato inositoltrifosfohidrolases; International Union of Biochemistry and Molecular Biology, EC 3.1.4.11) consistem, em mamíferos, de uma família proteica de treze isozimas, divididas em seis classes:  $\beta$  (1-4),  $\gamma$  (1-2),  $\delta$  (1,3,4),  $\epsilon$  (1),  $\zeta$  (1) e  $\eta$  (1,2), de acordo com sua estrutura (Nakamura and Fukami, 2017) (Figura 3). Todas as isozimas de PI-PLCs catalisam a reação de clivagem de PIP<sub>2</sub> em InsP<sub>3</sub> e DAG, mas cada isozima possui funções fisiológicas únicas (Nakamura and Fukami, 2017). Estas funções variadas derivam do fato de que as diferentes isozimas de PLCs possuem diferentes domínios proteicos adicionais, além dos domínios presentes em todas as isozimas, determinando suas funções diversas, o que também é determinado pela expressão diferencial das isozimas nos tecidos dos organismos (Yang et al., 2013). A classe  $\delta$  é considerada a mais basal, por ter a estrutura mais simples, possuindo os domínios PH, EF-hand, X, Y e C2, sugerindo que esta classe tenha dado origem às demais PLCs (Fukami et al., 2003; Nakamura and Fukami, 2017).

As PLCs contêm os domínios X e Y nos quais se encontram os sítios catalíticos das enzimas, que clivam PIP<sub>2</sub>, além de vários domínios regulatórios, que contribuem para os mecanismos regulatórios específicos (Yang et al., 2013) (Figura 3). Ao redor dos sítios catalíticos existem vários resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, como leucina, tirosina, fenilalanina e triptofano, que permitem a inserção dessas enzimas em superfícies membranares para exercerem suas atividades catalíticas (Rebecchi and Pentylala, 2000). As PLCs são enzimas solúveis, mas que podem ser translocadas para membranas em resposta a estímulos específicos (Fukami et al., 2003). As sequências entre os domínios X e Y são altamente variáveis entre as isozimas, sendo algumas altamente suscetíveis à hidrólise, o que sugere que esta região esteja envolvida na regulação de cada subtipo de PLC (Rebecchi and Pentylala, 2000). Os domínios PH (homólogo de plecstrina) são domínios encontrados em proteínas de alguma forma relacionadas a membranas, funcionariam como adaptadores ou conectores, ligando a proteína à



**Figura 3: Representação esquemática das classes de PLCs e seus domínios proteicos.**

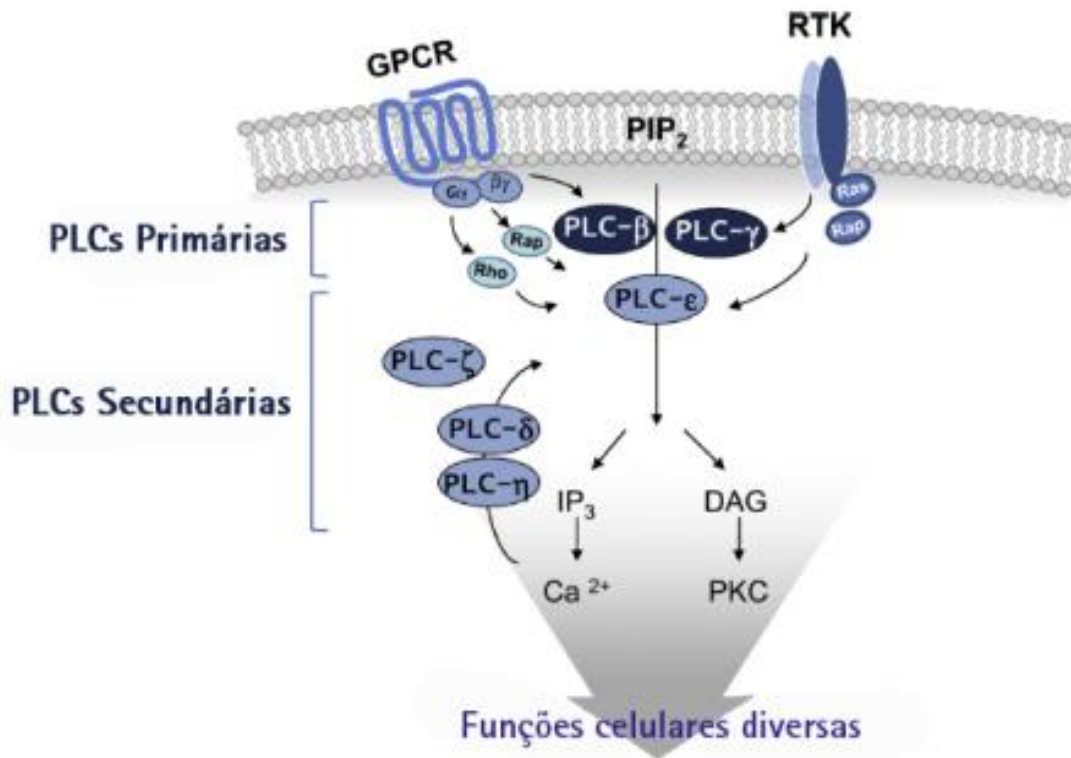
Na figura são mostrados os esquemas representativos dos sítios catalíticos e dos domínios regulatórios das classes de PLCs, bem como as moléculas de vias de sinalização distintas que interagem com estes domínios (em vermelho). Regiões autoinibitórias estão indicadas em azul. PH, domínio homólogo de plecstrina; EF, domínio EF-hand; X e Y, domínios catalíticos X e Y; C2, domínio C2; SH, domínio homólogo de src; CDC25, domínio homólogo de CDC25; RA, domínio de ligação a Ras. Adaptado de Nakamura & Fukami, 2017 (Nakamura and Fukami, 2017).



membrana. Quando presentes em enzimas PLCs, tais domínios ligam-se a fosfoinosítídeos e às subunidades  $\beta\gamma$  de proteínas G heterotriméricas (Rebecchi and Pentylala, 2000). Domínios EF-hand são domínios presentes em proteínas que se ligam ao cálcio e podem ter um importante papel regulatório em PLCs. Os domínios C2 estão relacionados com vias de sinalização de lipídeos, e também têm relação funcional com a ligação à bicamada lipídica de proteínas que os contêm (Rebecchi and Pentylala, 2000).

Em relação à ativação, as PLCs são separadas em primárias e secundárias: PLCs primárias são ativadas diretamente por receptores que se ligam a moduladores extracelulares, enquanto as secundárias são ativadas por sinais intracelulares (Yang et al., 2013) (Figura 4). Os subtipos PLC $\beta$  são ativados por receptores ligados à proteína G (GPCR) por diversos mecanismos, e as PLC $\gamma$  são ativadas por receptores tirosina cinase (RTK) (Rhee, 2001). A PLC $\epsilon$  é ativada por proteínas recrutadas pela sinalização de GPCRs e RTKs, enquanto que evidências apontam que as classes  $\delta$  e  $\eta$  são reguladas por Ca<sup>2+</sup>, por um mecanismo de retroalimentação (do inglês, *feedback*) positivo da atividade das outras PLCs (Kim et al., 2011; Kim et al., 1999b).

Apesar da ativação das PLCs citoplasmáticas ser bem esclarecida, o mesmo não ocorre para as PLCs nucleares. Evidências apontam que essa ativação seria diferente do que acontece com as isoformas citosólicas. A única isozima que tem sua ativação nuclear estabelecida é a PLC $\gamma$ 1, que em núcleos de células hepáticas de camundongos é ativada por receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) nuclear (Klein et al., 2004). Para a variante nuclear de PLC $\beta$ 1 de ratos foi proposto em 2001 por Xu e colaboradores que esta seria fosforilada pela cinase regulada por sinal extracelular (ERK), após estímulo com fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1), mais uma vez apontando um possível mecanismo de ativação de PLCs nucleares por meio de RTKs. Essas evidências são fortalecidas por dados obtidos por nosso grupo, que mostram uma ligação entre o estímulo com fator de crescimento epidermal (EGF) e a ativação de PLC $\delta$ 4 em células tumorais (De Angelis et al., Anexo 8.6).



**Figura 4: Representação esquemática das vias de sinalização envolvidas na ativação de PLCs primárias e secundárias.** Diversos ligantes extracelulares ligam-se a receptores acoplados à proteína G (GPCR) ou a receptores tirosina cinase (RTK), desencadeando a ativação de sinais intracelulares. A PLCβ é ativada pelas subunidades Gα ou Gβγ de GPCR, e PLCγ é ativada pela interação de seus domínios SH2 com RTKs (PLCβ e PLCγ são PLCs primárias, ativadas diretamente por receptores). PLCε é estimulada por pequenas GTPases, RAP2B ou RHOA, que foram ativadas por receptores. As PLCs secundárias PLCδ e PLCη são ativadas por Ca<sup>2+</sup>. A ativação de PLCs, primárias e secundárias, desencadeiam a modulação de diversas funções celulares. Adaptado de Yang et al., 2013 (Yang et al., 2013).

Algumas isoformas de PLCs foram descritas como nucleares em certos tipos celulares: PLC $\beta$ 1, PLC $\gamma$ 1, PLC $\delta$ 1, PLC $\delta$ 4 e PLC $\zeta$  (Faenza et al., 2013; Leung et al., 2004). A atividade dessas PLCs nucleares tem sido relacionada à regulação de diversos processos celulares, como proliferação e diferenciação, bem como a doenças, como síndromes mielodisplásicas (PLC $\beta$ 1), doenças neurológicas (PLC $\gamma$ 1) e infertilidade (PLC $\zeta$  e PLC $\delta$ 1-4) (Ratti et al., 2017a), indicando a importância do estudo e da caracterização destas isoformas.

### 1.3. Fosfolipase C delta 4 (PLC $\delta$ 4)

A PLC $\delta$ 4 é uma isoforma de fosfolipase C pouco estudada até o momento, tem sido apontada como uma proteína nuclear em diferentes tipos celulares e parece estar envolvida em processos proliferativos ((Lee and Rhee, 1996; Leung et al., 2004; Nagano et al., 1999); De Angelis et al., Anexo 8.6). Assim como as demais PLCs, PLC $\delta$ 4 hidrolisa PIP<sub>2</sub> em InsP<sub>3</sub> e DAG, estando possivelmente ligada a processos de proliferação, diferenciação celular e transformação neoplásica. Foi primeiramente purificada de extratos de fígado em regeneração de ratos (Asano et al., 1994), e seu gene foi clonado por Liu e colaboradores em 1996 a partir de uma biblioteca de cDNA de fígado de rato em regeneração, indicando um possível envolvimento de PLC $\delta$ 4 na proliferação celular. Além disso, essa enzima é abundantemente expressa no cérebro e nos testículos de ratos (Lee and Rhee, 1996; Nagano et al., 1999).

O gene de *PLC $\delta$ 4* humano (*hPLC $\delta$ 4*) foi clonado de uma biblioteca de cDNA de oligodendroglioma e localiza-se no braço longo do cromossomo 2 na região 35 (2q35) (Kim et al., 1999a). Sua região promotora foi identificada em 2007 por Chae e colaboradores (Chae et al., 2007), e trata-se de um promotor sem TATA box e rico em GC. Apesar de ter sua localização cromossômica bem descrita, os estudos com a proteína hPLC $\delta$ 4 são escassos.

Pouco se sabe sobre a sinalização *downstream* de PLC $\delta$ 4 que geraria os efeitos na proliferação celular. Foi descrita a ação de PLC $\delta$ 4, juntamente com as PKCs  $\alpha$  e  $\epsilon$ , na regeneração de fígado murino (Akutagawa et al., 2006) e a superexpressão de hPLC $\delta$ 4 em uma linhagem de células de câncer de mama, MCF-

7, levou à ativação de PKC $\phi$  e à superexpressão dos receptores EGFR/erbB1 e HER2/erbB2, que ativaram constitutivamente a via ERK1/2 (Leung et al., 2004).

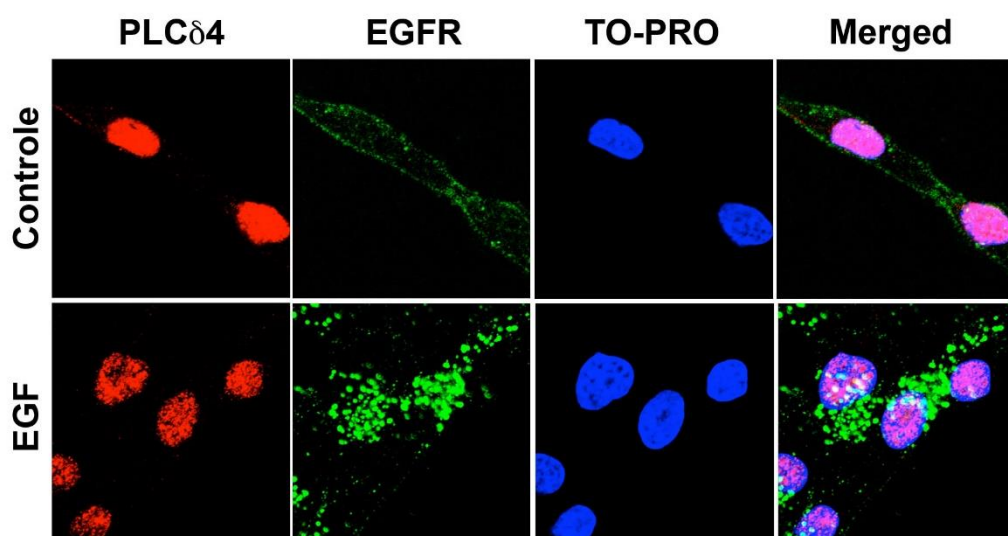
Até o momento, nenhum estudo foi publicado relatando o mecanismo de ativação desta PLC. O que foi mostrado sobre a classe delta de PLCs é que a atividade enzimática da PLC $\delta$ 1 pode ser regulada por fosforilação, por exemplo pela ERK, mas não pelo EGFR (Fujii et al., 2009). Para PLC $\delta$ 4 murina há estudos indicando a ativação da região promotora de PLC $\delta$ 4 por fatores de crescimento, como insulina (Fukami et al., 2000). Nosso grupo de pesquisa demonstrou que o estímulo com insulina leva à translocação do receptor de insulina para o núcleo, induzindo hidrólise de PIP $_2$  e sinais de Ca $^{2+}$  no núcleo de hepatócitos primários de ratos (Rodrigues et al., 2008). Além disso, foi mostrado que o receptor do fator de crescimento hepático (HGFR, ou cMET) após estímulo com seu ligante gera sinais de Ca $^{2+}$  via InsP $_3$  em uma linhagem de adenocarcinoma hepático (Gomes et al., 2008). Em conjunto, estes resultados sugerem que a translocação dos RTKs pode ser um fenômeno comum a esta família de receptores. A translocação dos RTKs ocorreu tanto em linhagem tumoral quanto em células primárias, o que sugere uma função destes receptores nucleares na biologia de células tumorais e de células hepáticas. Estas observações geraram a hipótese de que os RTKs poderiam ativar diretamente as PLCs nucleares.

O RTK com as vias endocíticas melhor caracterizadas é o EGFR. Assim, passamos a estudar o tráfego deste receptor em direção ao núcleo para testar a hipótese de que este receptor poderia ativar as PLCs nucleares. O EGFR é ativado pelo EGF e por outros ligantes. Tal receptor está envolvido na regulação da proliferação e da diferenciação celular, assim como em processos oncogênicos (Carpenter and Cohen, 1978; Catterton et al., 1979; Stoscheck and King, 1986). Vários estudos mostraram a localização nuclear de EGFR em diferentes tipos celulares, principalmente naqueles com alta capacidade proliferativa (Lin et al., 2001). Após o estímulo com EGF, EGFR transloca para o núcleo, onde gera sinais que alteram a atividade celular. Interage com proteínas, como o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e a proteína cinase dependente de DNA (DNA-PK), podendo fosforilá-las, além de interagir com fatores de transcrição, e promover a elevação da expressão de genes como: óxido nítrico sintase induzida (*iNOS*), *CCDN1*, que codifica a ciclina D1, e proto-oncogenes como o oncogene homólogo a

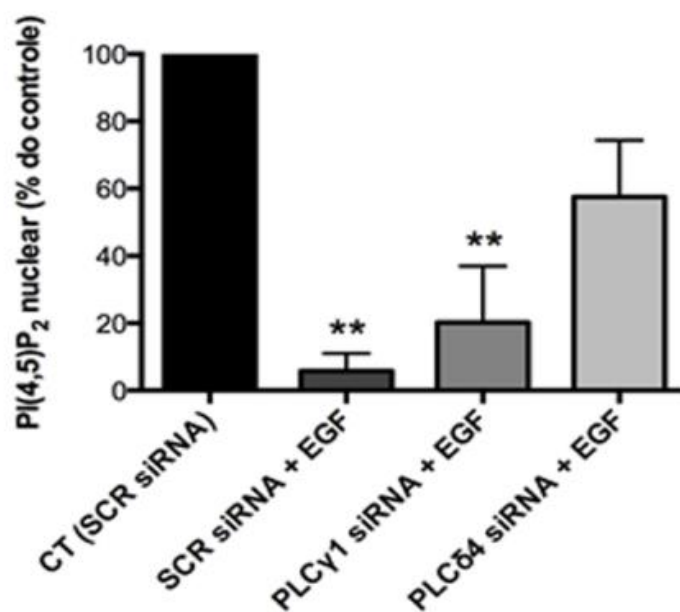
mielocitomatose viral v-myc (*c-Myc*), entre outros (Jaganathan et al., 2011; Lin et al., 2001; Lo et al., 2005). O EGFR nuclear está associado ao mau prognóstico no câncer, indução da tumorigênese, instabilidade cromossômica e resistência à quimioterapia (Brand et al., 2013). Algumas vias de sinalização citosólicas ativadas por EGFR são bem descritas, como a via das proteínas cinases dependentes de mitógenos extracelulares (MAPK) e o metabolismo de fosfoinosítídeos (Brand et al., 2013). Porém, quais vias de sinalização de  $Ca^{2+}$  são ativadas por EGFR no núcleo?

Ana Carolina de Angelis Campos, que finalizou seu doutorado em 2014, realizou experimentos de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) e imunofluorescência para identificar isoformas de PLCs nucleares. A fosfolipase C delta 4 (PLC $\delta$ 4) foi caracterizada como exclusivamente nuclear, em células SK-HEP-1 (linhagem celular derivada de adenocarcinoma hepático humano) (Figura 5). Também foi observado que o silenciamento de PLC $\delta$ 4 nestas células previne a hidrólise de PIP<sub>2</sub> nuclear, após estímulo com EGF (Figura 6). Neste mesmo modelo celular foi demonstrado que EGF ativa PKCs nucleares (Figura 7). Esses achados mostram que o complexo EGF/EGFR é capaz de ativar a maquinaria responsável pela ativação de  $Ca^{2+}$  nuclear via PLC $\delta$ 4 (Figura 8).

Dada a importância da sinalização de fosfoinosítídeos/ $Ca^{2+}$  no núcleo das células, decidimos estudar a função da enzima PLC $\delta$ 4, que é uma possível mediadora da sinalização de EGFR nuclear, podendo até ser um futuro alvo para terapias antitumorais. Para isso, utilizamos como modelos experimentais células-tronco mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo (hASC) e células tumorais humanas (SK-HEP-1), que possui fenótipo mesenquimal.

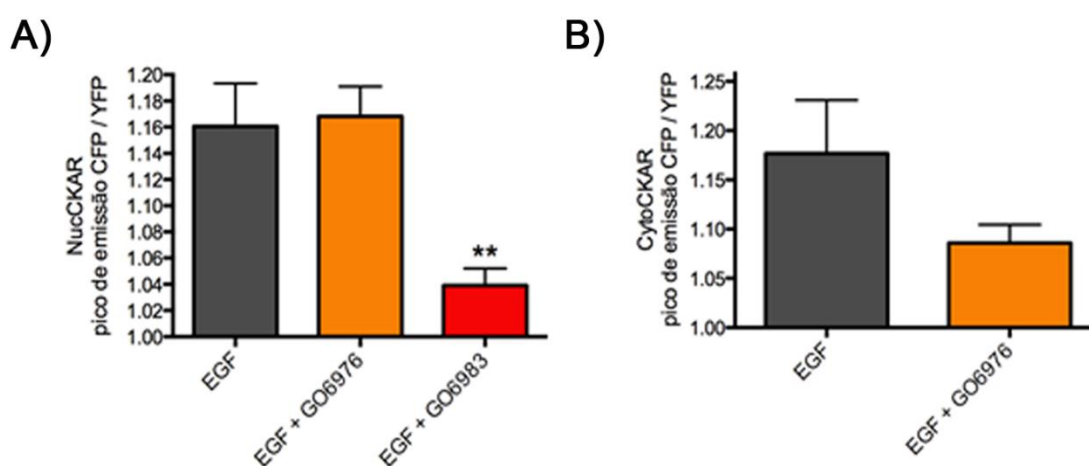


**Figura 5: A PLCδ4 é localizada no núcleo de células SK-HEP-1.** Imagens de microscopia confocal de células SK-HEP-1 controle (não estimuladas) e estimuladas com EGF por 10 minutos, marcadas com anti-PLCδ4 (vermelho), anti-EGFR (verde) e TO-PRO-3 (azul; marca o núcleo das células). Merged = sobreposição das 3 marcações. Aumento de 63x.

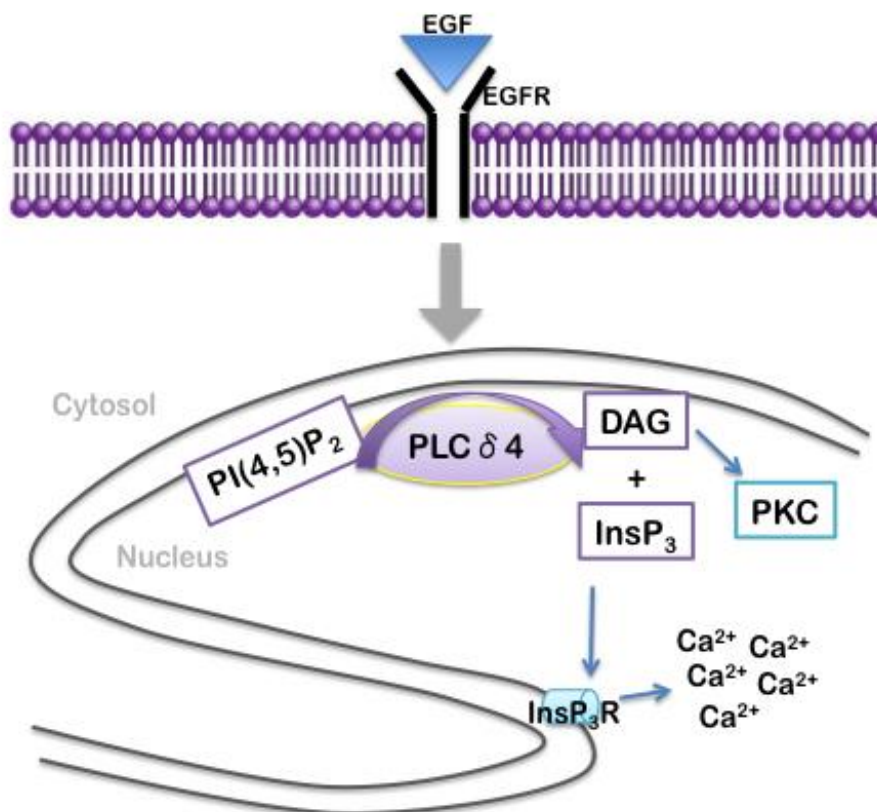


**Figura 6: O silenciamento da PLCδ4 inibe a hidrólise de PIP<sub>2</sub> nuclear induzida por EGF.** Gráfico de barras representando as variações de PIP<sub>2</sub> no núcleo de células SK-HEP-1 tratadas com scramble, PLCγ1 ou PLCδ4 siRNAs, estimuladas com EGF por 5 min, em relação às células não estimuladas. SCR = scramble. N = 3. \*\* = p < 0,005.





**Figura 7: EGF ativa PKCs nucleares.** Foram utilizados os sensores de atividade de PKC baseados em “förster resonance energy transfer” (FRET), CytoCKAR e NucCKAR, direcionados para o citosol ou núcleo, respectivamente. As células expressando NucCKAR foram tratadas com um inibidor de PKC de amplo espectro, Gö6983, ou um específico para as isoformas clássicas, Gö6976. **A)** Gráficos representando a média dos picos de emissão CFP/YFP da NucCKAR em resposta ao EGF nas células tratadas ou não com os inibidores. Os grupos tratados foram comparados com as células sem inibidores (cinza) pelo teste de Bonferroni. \*\* =  $p < 0,01$ . **B)** Gráfico representando a média dos picos de emissão CFP/YFP da CytoCKAR em resposta ao EGF nas células tratadas ou não com Go6976.



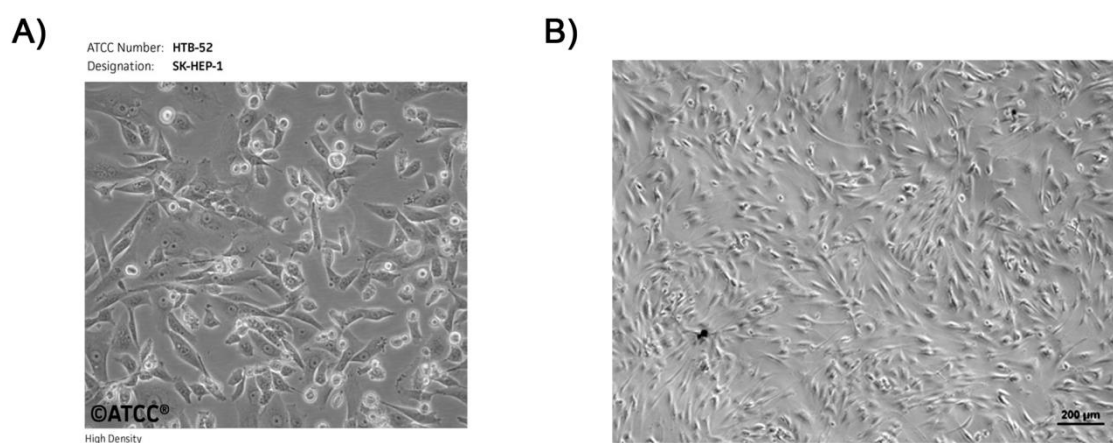
**Figura 8: Esquema da proposta de sinalização de cálcio nuclear induzida por EGF.** O EGF ativa a hidrólise de PIP<sub>2</sub> nuclear, a produção local de InsP<sub>3</sub> e a liberação de Ca<sup>2+</sup> intranuclear, que medeia a proliferação celular. Após estímulo com EGF, EGFR é ativado e inicia cascatas de transdutores de sinais. O EGFR pode ser translocado para o núcleo para induzir alvos *downstream*. PLCδ4 é uma enzima nuclear induzida pelo estímulo com EGF e leva à hidrólise de PIP<sub>2</sub>, que gera InsP<sub>3</sub> e DAG. InsP<sub>3</sub> liga-se a seus receptores, presentes na membrana nuclear interna, ativando a liberação de Ca<sup>2+</sup> no nucleoplasma. DAG pode ativar PKCs nucleares ou induzir a translocação de PKCs citosólicas para o núcleo. O cálcio e as PKCs podem ativar alvos *downstream* que resultam em proliferação celular.

#### **1.4. Células SK-HEP-1 e células-tronco mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo (hASC)**

A linhagem SK-HEP-1 foi isolada do líquido ascítico de um paciente do sexo masculino acometido com adenocarcinoma hepático. Foi classificada morfológicamente, em 1975 (Fogh and Trempe, 1975), como derivada de carcinoma hepatocelular. Entretanto, posteriormente não foram identificadas proteínas hepáticas nestas células (Carlson et al., 1985; Turner and Turner, 1980).

Heffelfinger e colaboradores realizaram uma nova caracterização de SK-HEP-1 em 1992 (Heffelfinger et al., 1992). Observaram a presença de três populações celulares em culturas *in vitro*: células fusiformes, células epitelóides e células pouco aderentes que cresciam sobre as demais células (Figura 9A). Análises imunohistoquímicas indicaram uma origem mesenquimal para estas células, o que foi confirmado anos depois por Eun e colaboradores (2014) (Eun et al., 2014), que detectaram a expressão dos marcadores de superfície de células-tronco mesenquimais (MSC) CD73, CD44, CD90, CD105, CD166,  $\alpha$ -SMA em SK-HEP-1. Além disso, foi observado o alto potencial tumorigênico e metastático de SK-HEP-1, uma vez que a injeção subcutânea destas células em camundongos imunodeficientes NOD/SCID/IL2rg foi capaz de gerar tumores metastáticos (Eun et al., 2014). Assim, recentemente a linhagem SK-HEP-1 foi definida como célula-tronco tumoral (CSC), sendo uma MSC transformada, com alta proliferação e alta capacidade de transformação neoplásica e metastática (Eun et al., 2014).

Células-tronco são células que possuem a capacidade de se diferenciarem em diversos tipos celulares e de se autorrenovarem (Bourin et al., 2013). Existem várias fontes de células-tronco humanas, como embrionárias, derivadas da medula óssea e derivadas de tecido adiposo. As células-tronco embrionárias são pluripotentes, isto é, podem se diferenciar em células derivadas dos três folhetos embrionários, tendo uma aplicação mais vasta em estudos científicos (Thomson et al., 1998). Porém, as questões éticas relacionadas à sua extração muitas vezes limitam o uso dessas células. As células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea são multipotentes (podem gerar certos tipos de tecidos) e possuem um modo de extração sem embargos éticos (Caplan, 2007), mas o processo é bem doloroso, o que afasta possíveis doadores de medula óssea, e a quantidade de células obtidas



**Figura 9: Células SK-HEP-1 e células-tronco mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo (hASC).** **A)** Morfologia de SK-HEP-1, mostrando as três populações que compõem a linhagem: uma menos aderente, circular, uma epitelóide e outra fusiforme. Foto retirada do site da ATCC (American Type Culture Collection; <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-52.aspx#characteristics>). **B)** Morfologia de hASC, com células alongadas, fibroblastóides. Barra de tamanho: 200  $\mu$ m. Imagem do acervo desta tese.

é baixa (Zuk, 2013). Assim, em 2001, Zuk e colaboradores (Zuk et al., 2001) isolaram pela primeira vez células-tronco mesenquimais humanas de tecido adiposo (hASC), mais fáceis de serem obtidas e com entraves éticos reduzidos.

Quando caracterizadas pela primeira vez, as hASC foram denominadas células de lipoaspirado processado (Zuk et al., 2001). Essas células são derivadas de populações aderentes da fração vascular estromal de lipoaspirado. Possuem aspecto fibroblastóide (Figura 9B) e podem diferenciar-se em diversas linhagens, como adipogênica, osteogênica, condrogênica, miogênica, neuronal, entre outras (Zuk, 2013). Em 2002, Zuk e colaboradores (Zuk et al., 2002) renomearam as células, passando a chamá-las de células-tronco mesenquimais humanas de tecido adiposo (hASC) e fizeram a caracterização bioquímica e molecular das mesmas, que foi revisada pelo mesmo grupo em 2013 (Zuk, 2013).

Desse modo, SK-HEP-1 foi utilizada como um modelo de célula mesenquimal transformada, com alta capacidade de proliferação, e hASC foram utilizadas como um modelo de célula mesenquimal normal, com capacidade de proliferação e diferenciação. Assim, os dois modelos, que são bem estabelecidos em nosso laboratório, foram selecionados dado o perfil mesenquimal de ambos e por apresentarem aspectos peculiares em relação aos processos celulares envolvidos na sinalização de PLCs.

## 2. JUSTIFICATIVA

O EGFR está envolvido no mecanismo de desenvolvimento de tumores. É normalmente encontrado superexpresso ou superativo em tumores de origem epitelial, sendo largamente utilizado como alvo de terapia anticâncer (Hynes and Lane, 2005). Porém, grande parte dos pacientes desenvolve resistência a essa terapia (Arteaga, 2003), e a localização nuclear de EGFR tem sido implicada nessa resistência (Hsu et al., 2009; Huang et al., 2011; Li et al., 2009). Assim, o EGFR nuclear poderia ser um alvo mais eficaz no tratamento contra o câncer.

Uma possível estratégia a ser testada seria interferir no modo como o EGFR sinaliza no núcleo. A sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear gera respostas similares às observadas para a sinalização de EGFR nuclear. Sendo assim, seria o  $\text{Ca}^{2+}$  um mediador dos efeitos gerados por EGFR no núcleo?

Como descrito na Introdução, há indícios de que o EGF desencadeia no núcleo a hidrólise de  $\text{PIP}_2$  e atividade de PKC (Figuras 6 e 7), e esses eventos parecem ser mediados pela PLC $\delta$ 4. Porém, várias questões relacionadas à PLC $\delta$ 4 humana precisam ser elucidadas, como: PLC $\delta$ 4 estaria envolvida na proliferação celular?; E na diferenciação celular?; Quais os mecanismos relacionados a PLC $\delta$ 4 e estes processos? Além disso, dadas as evidências do papel de várias isoformas de PI-PLCs nucleares em patologias diversas, o estudo e a caracterização dessas proteínas emergem como de interesse clínico (Ratti et al., 2017a).

A elucidação do mecanismo de sinalização da PLC $\delta$ 4 nuclear poderá contribuir para a compreensão dos mecanismos de resistência a terapias antitumorais, bem como possibilitar o desenvolvimento de novas terapias. Além disso, o avanço do entendimento das vias de sinalização e os efeitos funcionais de PLC $\delta$ 4 poderá aprimorar processos de diferenciação em células-tronco, podendo até mesmo auxiliar em técnicas de diferenciação utilizadas em engenharia de tecidos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Caracterizar funcionalmente a enzima hPLC $\delta$ 4 quanto ao seu envolvimento na proliferação e na diferenciação celular em células-tronco mesenquimais e células tumorais humanas.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Analisar os efeitos da diminuição da expressão de PLC $\delta$ 4 na proliferação, na morte e no ciclo celular, em células tumorais SK-HEP-1.
- Avaliar a expressão de ciclinas em SK-HEP-1 silenciadas para PLC $\delta$ 4.
- Estudar o perfil de expressão de PLC $\delta$ 4 em células-tronco indiferenciadas e submetidas à diferenciação adipogênica e à diferenciação osteogênica.
- Determinar a localização subcelular de PLC $\delta$ 4 em hASC por meio de microscopia confocal e análise de fracionamento celular.
- Identificar os efeitos da diminuição da expressão de PLC $\delta$ 4 na proliferação, no ciclo celular e na senescência celular em hASC.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Cultivo de SK-HEP-1

A linhagem celular derivada de adenocarcinoma hepático humano, denominada SK-HEP-1 (ATCC® HTB52), foi obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC). Essas células foram cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM; Sigma-Aldrich) suplementado com 5 mM de bicarbonato de sódio, 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB, ThermoFisher Scientific), 100 U.mL<sup>-1</sup> de penicilina e 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> de estreptomicina (Sigma-Aldrich) (meio DMEM completo), a 37°C em 5% CO<sub>2</sub>. A subcultura foi realizada com uma confluência celular de aproximadamente 70-80%, e as células utilizadas para os experimentos estavam entre as passagens 7 e 20.

### 4.2. Isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo (hASC)

As células-tronco mesenquimais foram obtidas do tecido adiposo subcutâneo removido durante cirurgias de lipoaspiração ou de abdominoplastia. Os pacientes voluntários foram operados na clínica STK - Núcleo de Cirurgia Plástica. O isolamento do tecido e das células, bem como seus usos posteriores, foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (CAAE: 55698116.2.0000.5149; Anexo 8.1).

O tecido removido da cirurgia de lipoaspiração foi lavado duas vezes com a solução tampão fosfato salina (PBS: 0,138 M NaCl, 0,01 M fosfato e 0,0027 M KCl, pH 7,4) 0,15M para remoção do sangue residual. A amostra oriunda da abdominoplastia foi submetida a remoção mecânica do tecido adiposo, com auxílio de tesoura reta, e então foi lavada duas vezes com PBS 0,15 M. Após as lavagens, o tecido foi centrifugado a 300 x g por 7 minutos a 25°C. O tecido adiposo isolado foi então digerido com 0,1% (p/v) de colagenase do tipo I (Sigma-Aldrich) por 60 minutos a 37°C, com vigorosa agitação manual a cada 15 minutos. A solução foi centrifugada a 300 x g por 10 minutos a 25°C, o precipitado foi ressuspensão em meio completo e transferido para garrafa de cultura T25 (Sarstedt), mantida em estufa com atmosfera úmida a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.



As células foram cultivadas em meio DMEM completo (suplementado com 0,25 µg.mL<sup>-1</sup> de anfotericina B (PSA) (Sigma- Aldrich)), mantidas em estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e o meio substituído a cada 3 dias. A subcultura foi realizada com uma confluência celular de aproximadamente 80%, nas passagens 1 e 2. As passagens 3 e 4 foram utilizadas para a realização dos experimentos.

### **4.3. Caracterização imunofenotípica de hASC**

A expressão de marcadores de superfície de células mesenquimais foi conduzida nas células-tronco por citometria de fluxo, utilizando o equipamento *Guava EasyCyte 6-2L* (Millipore). Após a remoção enzimática das células por tripsinização (tripsina EDTA 0,05%, ThermoFisher Scientific), estas foram centrifugadas a 300 x g por 10 minutos, ressuspensas e incubadas por uma hora em solução de bloqueio usando 1% de albumina de soro bovina (BSA; Sigma-Aldrich) e 5% (v/v) de soro de cabra (ThermoFisher Scientific) em PBS. As células foram centrifugadas novamente e ressuspensas em solução de 1% BSA em PBS contendo anticorpos monoclonais de camundongo, na diluição de 1:50, para os seguintes clusters de diferenciação (CDs): CD105, CD90 e CD45 (BD Bioscience) e CD11b (ImmunoTools). A amostra controle foi incubada com solução contendo apenas 1% BSA em PBS. Após incubação a 4°C por 30 minutos, as células foram centrifugadas e incubadas com anticorpo secundário Alexa Fluor® 488 ou Alexa Fluor® 647 da classe IgG anti camundongo (ThermoFisher Scientific), na diluição de 1:500. As células permaneceram a 4°C por 30 minutos. Em seguida, prosseguiu-se o procedimento com a centrifugação e lavagem com PBS 1X, seguida de diluição das células para a análise no citômetro.

A população de células desejada foi delimitada primeiramente através das regiões definidas pelos parâmetros dos espalhamentos frontais e laterais, gerados na avaliação de células controle, não submetidas a nenhuma marcação. O total de 5000 eventos foram capturados em cada análise. Para a definição da ausência de marcação de fluorescência foi utilizada a amostra controle, na qual os anticorpos primários foram omitidos, e os parâmetros foram ajustados em escala logarítmica. Para aquisição dos dados, os anticorpos primários foram conjugados ao Alexa Fluor® 488 e Alexa Fluor® 647 e os filtros de emissão utilizados foram 525/530 e 661/19, respectivamente. Para cada um dos marcadores analisados, a leitura foi

conduzida em triplicata. De acordo com Bourin e colaboradores (2013) (Bourin et al., 2013), na definição de MSC, as marcações para CD105 e CD90 devem ser maiores que 80% e para CD45 e CD11b devem ser menores que 2%. Os diagramas de dispersão obtidos pelas leituras do citômetro foram transformados em histogramas e a porcentagem média de eventos positivos para cada marcador foi definida em comparação às células não marcadas. As análises foram feitas no software *FlowJo* (versão 7.2.5; Tree Star).

#### **4.4. Transfecção com siRNA**

A diminuição da expressão da PLC- $\delta$ 4 humana foi obtida utilizando o seguinte siRNA: *ON-TARGETplus SMARTpool* (84812), *siRNA J-005065-01* (Dharmacon/ThermoFisher Scientific). O siRNA controle (Scramble siRNA) utilizado foi o *siGENOME Non-targeting siRNA pool #2* (Dharmacon/Thermo Scientific).

As células foram transfectadas utilizando o reagente de transfecção Lipofectamina RNAiMAX (ThermoFisher Scientific). A lipofectamina ou 25 nM de siRNA foram diluídos em meio reduzido *Opti-MEM* (ThermoFisher Scientific), incubados por 5 minutos, em seguida combinados na proporção 1:1 e incubados por mais 20 minutos. O complexo lipofectamina-siRNA foi então adicionado às células (a quantidade de células e o volume de meio variou de acordo com cada experimento), que haviam sido enzimaticamente removidas, encontrando-se em suspensão. Essas células foram mantidas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, em meio *Opti-MEM*, por 5 horas, para a adesão das mesmas. Após esse período, o meio foi substituído por DMEM completo e as células mantidas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, pelo tempo definido para cada experimento.

#### **4.5. Extração de proteínas totais**

A extração de proteínas totais das células foi feita com o tampão NETN, composto por 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5% Nonidet P-40 e 1% dos coquetéis de inibidores de proteases e fosfatases (Sigma-Aldrich). O lisado celular foi homogeneizado por 1 minuto com vórtex, incubado no gelo por 10 minutos, depois centrifugado a 16.100 x g, 20 minutos, a 4°C, para coleta do sobrenadante.

Após a extração, as proteínas foram dosadas pelo método de Bradford (Sigma-Aldrich), conforme recomendações do fabricante. As amostras foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até seu uso posterior.

#### **4.6. Estímulo com EGF e fracionamento celular**

Células-tronco mesenquimais foram plaqueadas em placas de 6 poços na densidade de  $2 \times 10^5$  células/poço em DMEM completo. 24 horas após o plaqueamento, o meio completo foi removido e substituído por meio DMEM sem soro, no qual as células foram mantidas por 16 horas. Após esse período, as células foram incubadas com EGF recombinante humano (Sigma-Aldrich) na concentração de  $200 \text{ ng.mL}^{-1}$  por 0, 5, 10, 20, 30 ou 40 minutos, a  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . Em seguida, foi feita a lavagem com PBS 1X gelado para a total remoção do meio e do ligante.

Após serem lavadas com PBS 1X, as células foram incubadas com tampão de lise (20 mM HEPES, pH 7,0, 10 mM KCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,5% Nonidet P-40 e 1% de inibidores de proteases). As amostras foram homogeneizadas por 1 minuto com vórtex, incubadas no gelo por 10 minutos e centrifugadas a  $1500 \times g$  por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , para a sedimentação do núcleo. O sobrenadante contendo a fração não-nuclear foi coletado e centrifugado a  $16000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$ , por 20 minutos, e o novo sobrenadante foi colocado em um novo tubo. O precipitado nuclear foi lavado 3 vezes com tampão de lise para a retirada de possíveis contaminantes da fração não-nuclear. Posteriormente, esse precipitado foi ressuspensão em tampão NETN (item anterior), sonificado por 1 minuto e centrifugado a  $16000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$ , por 20 minutos, tendo seu sobrenadante recolhido e guardado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para usos posteriores. A quantificação das proteínas foi feita utilizando-se o método de Bradford (Sigma-Aldrich).

#### **4.7. Western Blot**

Para a separação das proteínas foram utilizados géis de poli(acrilamida) desnaturantes (SDS-PAGE). O gel de separação era constituído de 8 a 10% de acrilamida/bisacrilamida 40% (p/v), Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 10% (p/v), 10% (p/v) persulfato de amônio (PSA) e 0,05% (v/v) TEMED. O gel de concentração era composto de 3,9% de acrilamida/bisacrilamida 40% (p/v), Tris-HCl 1,0 M pH 6,8, SDS 10% (p/v), 10% (p/v) persulfato de amônio (PSA) e 0,05% (v/v) TEMED. Foram

utilizados de 30-50 µg de proteínas na eletroforese em gel de poliacrilamida. Foi adicionado às amostras tampão de amostra 5X para SDS-PAGE (Tris-HCl 0,313 M pH 6,8, SDS 10% (p/v), 0,05% (p/v) azul de bromofenol, 10% (p/v) DTT, 50% (v/v) glicerol). Neste gel também foi aplicado o padrão de massa molecular pré-corado *Kaleidoscope* (Bio-Rad). O tampão de corrida para SDS-PAGE, composto de 0,03% Tris-HCl, 1,2% (p/v) glicina e 0,01% (p/v) SDS foi utilizado na cuba e a corrida eletroforética foi conduzida a 100 volts, por duas horas.

Em seguida, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF; Bio-Rad) pelo sistema de transferência semi-seco (Bio-Rad), por 90 minutos. A membrana foi então bloqueada com 5% leite desnatado em solução salina tamponada com Tris (Tris 20 mM e NaCl 200 mM, pH7,4 – TBS) com 0,5% Tween-20 (Sigma-Aldrich, TBST) por 1 hora e depois incubadas por 18 horas a 4°C com anticorpo primário diluído em TBST com 5% de leite desnatado. Os anticorpos utilizados estão listados na tabela 1. As membranas foram lavadas 3 vezes de 10 minutos em TBST antes de serem incubadas por 1 hora com anticorpo secundário, a 25°C. Os anticorpos secundários anti coelho ou anti camundongo eram conjugados com peroxidase na diluição de 1:2000 (Sigma-Aldrich). Após a incubação com os anticorpos secundários as membranas foram novamente lavadas em TBST, 3 vezes de 10 minutos. As bandas foram reveladas por reação de quimioluminescência com *Pierce™ ECL Plus* (Thermo Scientific), usando filmes BioMax® MR (Carestream). Os filmes foram escaneados e as análises quantitativas foram realizadas com o auxílio do software *ImageJ* (Schneider et al., 2012). A expressão relativa das proteínas foi calculada utilizando-se  $\alpha$ -tubulina ou histona H3 como normalizadores.

**Tabela 1:** Anticorpos primários utilizados para Western Blot.

<b>Antígeno</b>	<b>Tipo</b>	<b>Espécie</b>	<b>Diluição</b>	<b>Fornecedor</b>
$\alpha$ -tubulina	Monoclonal	Camundongo	1:2000	Sigma-Aldrich
Ciclina A	Monoclonal	Camundongo	1:500	Cell Signaling
Ciclina B1	Policlonal	Coelho	1:500	Cell Signaling
Ciclina D1	Monoclonal	Coelho	1:500	Cell Signaling

Ciclina D2	Monoclonal	Coelho	1:500	Cell Signaling
Ciclina D3	Monoclonal	Camundongo	1:500	Cell Signaling
Ciclina E	Monoclonal	Camundongo	1:500	Cell Signaling
Ciclina E2	Policlonal	Coelho	1:500	Cell Signaling
Ciclina H	Policlonal	Coelho	1:500	Cell Signaling
EGFR	Policlonal	Coelho	1:250	Santa Cruz Biotech
Histona H3	Policlonal	Coelho	1:5000	Sigma-Aldrich
PLC $\delta$ 4	Policlonal	Coelho	1:200	Santa Cruz Biotech

#### 4.8. Extração de RNA, tratamento com DNase I e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído das células utilizando-se o reagente TRIzol (ThermoFisher Scientific), de acordo com as recomendações do fabricante. A quantidade e a pureza do RNA extraído foram analisadas por densidade óptica em 260 nm e 280 nm utilizando o leitor *Multiskan GO* (ThermoFisher Scientific). As amostras de RNA foram tratadas com DNase RQ1 (Promega), seguindo as instruções do fabricante, para a remoção de DNA genômico contaminante. Essas amostras foram novamente analisadas no espectrofotômetro em relação à quantidade e pureza. 1,5  $\mu$ g de RNA foi utilizado para a reação de transcrição reversa, com o kit *High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (ThermoFisher Scientific), utilizando primers randômicos para a síntese de cDNA.

#### 4.9. Real Time qPCR (Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real quantitativa)

Os cDNAs sintetizados conforme o item 4.8 foram utilizados para a análise de qPCR, para a avaliação da expressão relativa do gene *PLC $\delta$ 4*. Utilizou-se o equipamento *CFX96 Touch™ RT-PCR* (Bio-Rad), do Laboratório de Equipamentos Multiusuários do Departamento de Bioquímica e Imunologia (Multidbiq).

Foram desenhados iniciadores para os genes *PLC $\delta$ 4* (alvo) e *RPL13A* (normalizador), utilizando a plataforma *Primer-BLAST* (Ye et al., 2012). As

sequências de iniciadores para *GAPDH* (normalizador) foram retiradas do artigo de Thibeaux e colaboradores (2014) (Thibeaux et al., 2014). Os iniciadores foram quimicamente sintetizados pela empresa Integrated DNA Technologies (IDT) e encontram-se relacionados na tabela 2.

**Tabela 2:** Sequências dos iniciadores utilizados para Real Time qPCR.

<b>Gene</b>	<b>Iniciador</b>	<b>Sequência</b>	<b>Tamanho fragmento</b>
<b><i>GAPDH</i></b> <b>(NM_001256799;</b> <b>Thibeaux et al.,</b> <b>2014)</b>	GAPDH F	5'-ACAAC TTTGGTATCGTGGAAGG- 3' (22 pb)	101 pb
	GAPDH R	5'-GCCATCACGCCACAGTTTC-3' (19 pb)	
<b><i>RPL13A</i></b> <b>(AB082924)</b>	RPL13A F	5'-TATGAGTGAAAGGGAGCC-3' (18 pb)	82 pb
	RPL13A R	5'-ATGACCAGGTGGAAAGTC-3' (18 pb)	
<b><i>PLCδ4</i></b> <b>(NM_032726)</b>	hPLCd4 fw	5'-AGGTGGATGTATGGGATGGACC- 3' (22 pb)	130 pb
	hPLCd4 rev	5'-GGGTAGTCTGATGTCTGGAAGG- 3' (22 pb)	

Todos os iniciadores foram primeiramente testados com em uma PCR *endpoint* (5 minutos de desnaturação inicial a 94°C, 40 ciclos de desnaturação (94°C por 1 min), anelamento (60°C por 1 min) e extensão (72°C por 1 min), 10 minutos de extensão final a 72°C). As amostras foram aplicadas em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, e a eletroforese foi feita a 90 V, por 40 minutos. Após análise sob luz UV, foi observado para todos os iniciadores uma banda única em gel, do tamanho esperado, refletindo a especificidade de sequência dos mesmos (Anexo 8.2, Figura 25, contém o gel para os primers de PLCδ4).

Para a reação de qPCR, os iniciadores foram adicionados ao cDNA e aos reagentes do kit *GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix* (Promega), o qual contém o agente fluorescente intercalador de DNA *BRYT Green<sup>®</sup>*, de acordo com as instruções do fabricante. As condições da PCR em tempo real foram as seguintes: 95°C por 2 minutos, 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. A curva de *melting* foi feita iniciando-se a 65°C por 5 segundos e elevando 0,5°C até atingir 95°C. Para a validação e otimização das reações, foram realizadas curvas de eficiência dos iniciadores e as curvas de concentração (Anexo 8.3, Figura 26).

Após a padronização das reações, foram realizados os experimentos. Quantidades iguais de cDNA foram utilizadas nas análises para todas as amostras. O software *CFX Manager 3.0* (Bio-Rad) foi utilizado para a análise dos resultados. A expressão relativa de PLC $\delta$ 4 foi calculada utilizando-se o software *REST-MCS<sup>®</sup>* versão 2 (Pfaffl, 2001; Pfaffl et al., 2002).

#### **4.10. Curva de crescimento**

Células SK-HEP-1 foram plaqueadas em placas de 6 poços, na concentração de  $5 \times 10^5$  células/poço e transfectadas com siRNA (item 4.4). Passadas 48 ou 72 horas após a transfecção, as células foram tripsinizadas, ressuspensas em 1 mL de meio DMEM e contadas em câmara de Neubauer, utilizando azul de Tripán 0,4% (p/v) para determinação da viabilidade. Os resultados foram plotados em um gráfico de tempo (horas) *versus* número de células ( $\times 10^5$ ).

Células-tronco mesenquimais foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de  $1 \times 10^4$  células/poço e transfectadas com siRNA (item 4.4). A cada 2 dias as células foram tripsinizadas, ressuspensas em 1 mL de meio DMEM e contadas em câmara de Neubauer, utilizando azul de Tripán 0,4% (p/v) para exclusão de células mortas. Os resultados foram plotados em um gráfico de tempo (horas) *versus* número de células ( $\times 10^4$ ).

#### **4.11. Morte celular**

Células SK-HEP-1, plaqueadas em placas de 6 poços na concentração de  $5 \times 10^5$  células/poço, 3 poços por grupo, foram transfectadas de acordo com a metodologia descrita no item 4.4. Como controle positivo de morte celular, as células

foram incubadas com uma solução de 200 nM de estaurosporina (CalBiochem), por 4 ou 24 horas. A estaurosporina é um inibidor de cinases de amplo espectro responsável pela indução do processo de apoptose (Lawrie et al., 1997). Em seguida, as células foram incubadas por 1 hora com Anexina V-FITC (ThermoFisher Scientific; marcador inicial de apoptose) e iodeto de propídeo (ThermoFisher Scientific; marcador de apoptose tardia ou de necrose). As imagens foram fotodocumentadas no microscópio invertido de fluorescência Olympus IX70, utilizando objetivas de 10X e 20X. Cada tratamento foi realizado em triplicata e foram feitas três imagens para cada poço. As células marcadas com Anexina V-FITC, iodeto, duplo marcadas e as imagens de contraste de fase foram contadas. Os dados gerados foram plotados em gráficos de porcentagens de células marcadas, em relação ao número de células totais.

#### **4.12. Avaliação da proliferação e ciclo celular**

Células SK-HEP-1 foram semeadas em placas de 6 poços, na concentração de  $5 \times 10^5$  células/poço, 3 poços por grupo, e transfectadas com siRNA para PLC $\delta$ 4 ou scrambled siRNA (item 4.4). Após 48 horas, as células foram coletadas por tripsinização e contadas em triplicata. Um total de  $1 \times 10^5$  células foram fixadas com etanol 70%, centrifugadas a  $400 \times g$  por 10 minutos, lavadas com PBS 1X, lisadas com 300  $\mu$ L de uma solução hipotônica contendo 0,5% (v/v) de Triton X-100 (Sigma-Aldrich), centrifugadas novamente, e coradas com 50  $\mu$ g.mL $^{-1}$  de iodeto de propídeo (ThermoFisher Scientific) e 0,2 mg.mL $^{-1}$  RNase A (ThermoFisher Scientific) (Riccardi and Nicoletti, 2006). As células foram incubadas a 4°C por 1 hora e analisadas no citômetro de fluxo *Guava EasyCyte 6-2L* (Millipore). O grupo controle (não transfectado) foi utilizado para o ajuste dos parâmetros de espalhamento frontal e lateral, necessário para a determinação da população de estudo. A análise foi feita em escala logarítmica. As amostras foram excitadas utilizando o laser de 488 e a fluorescência emitida detectada foi utilizando o filtro de emissão 525/30. Foi feita a leitura de 5000 eventos pelo citômetro para esta padronização. Os resultados foram analisados utilizando o software *FlowJo* (versão 7.2.5). Estes resultados foram plotados em gráficos de porcentagem de células em G1, S ou G2, em relação ao número total de células.



Alternativamente, as células-tronco foram marcadas com a sonda TO-PRO3, como descrito abaixo. As células-tronco foram plaqueadas em placas de 6 poços,  $2 \times 10^5$  células/poço, 3 poços por grupo, e transfectadas com siPLC $\delta$ 4 ou siSCR (item 4.4). Após 48 horas, as células foram enzimaticamente removidas e foi realizada a contagem das mesmas.  $1,5 \times 10^5$  células foram centrifugadas a  $200 \times g$  por 5 minutos à temperatura ambiente. O precipitado celular foi ressuspensão em 500  $\mu$ L de PBS 1X e foram adicionados 4,5 mL de álcool etílico 70% às amostras, as quais foram centrifugadas a  $400 \times g$  por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas com 5 mL de PBS 1X e novamente um passo de centrifugação a  $400 \times g$  por 10 minutos foi realizado. As células foram ressuspensas em uma solução de 500  $\mu$ L de PBS e 500  $\mu$ L de solução de extração de DNA (0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1% Triton X-100, pH 7,8), e incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente (Riccardi and Nicoletti, 2006). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a  $400 \times g$  por 5 minutos e o precipitado foi ressuspensão em 250  $\mu$ L de solução corante (0,25  $\mu$ M TO-PRO3<sup>®</sup> (ThermoFisher Scientific) e 0,2 mg.mL<sup>-1</sup> RNase A (ThermoFisher Scientific), em PBS 1X. As amostras foram incubadas por 30 minutos, no escuro, à temperatura ambiente. Feito isto, procedeu-se a análise no citômetro de fluxo *Guava EasyCyte 6-2L* (Millipore), como descrito acima, mas as amostras foram excitadas com o laser 633 e para a fluorescência emitida foi utilizado o filtro de emissão 661/19.

#### **4.13. Análises *in silico* de predição de localização subcelular e de domínios proteicos**

Para a predição da localização subcelular de hPLC $\delta$ 4 foi utilizada a sequência de *Homo sapiens* EAW10628.1 (número de acesso no GenBank), que foi analisada pelos softwares *NucPred* (Brameier et al., 2007) e *SeqNLS* (Lin and Hu, 2013). Também foram encontrados *hits* de NES com o software *NetNES* (la Cour et al., 2004).

O alinhamento de sequências foi feito por meio do uso da interface *Multalin* (Corpet, 1988). A análise de domínios foi feita com o software *Prosite* (Sigrist et al., 2002). Foram utilizadas as sequências EAW10627.1 (número de acesso no GenBank da variante 1), EAW10628.1 (número de acesso no GenBank da variante 2) e EAW10629.1 (número de acesso no GenBank da variante 3).

#### 4.14. Imunofluorescência

As células-tronco foram plaqueadas na concentração de  $2 \times 10^5$  células por poço, em placas de 6 poços contendo lamínulas. Após 24 horas de cultivo, as células foram fixadas com 4% (p/v) de paraformaldeído em PBS por 15 minutos, lavadas três vezes com PBS 1X e, em seguida, permeabilizadas com 0,1% (v/v) Triton X-100 em PBS por 5 minutos. As lamínulas foram incubadas por 1 hora na solução de bloqueio (PBS contendo 1% (p/v) de albumina de soro bovino (BSA) e 5% (v/v) de soro de cabra, ThermoFisher Scientific). Após o bloqueio, as células foram incubadas com anticorpo primário diluído em PBS 1% (p/v) de BSA. O anticorpo utilizado foi o anti fosfolipase C $\delta$  policlonal feito em coelho (1:200, Santa Cruz Biotechnology). Após 18 horas foram realizadas três lavagens com PBS 1X e incubação por 1 hora em PBS 1% BSA contendo anticorpo secundário IgG anti coelho conjugado a Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (1:500, ThermoFisher Scientific). Após 5 lavagens com PBS 1X, as lamínulas foram montadas usando a solução de montagem *SlowFade Gold Antifade* com Dapi (ThermoFisher Scientific).

As imagens de imunofluorescência foram obtidas no microscópio confocal Zeiss 5 LIVE (Carl Zeiss) no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do ICB/UFMG (CAPI), utilizando-se lasers de 488 e 532 nm para excitação das sondas, com objetiva de imersão em óleo de 63x, abertura numérica de 1,4 e a íris foi mantida em torno de 1 unidade Airy. As imagens foram analisadas através do uso dos softwares *Image Browser* ou *ZEN* (Carl Zeiss).

#### 4.15. Diferenciação das células-tronco

##### 4.15.1. Meio adipogênico

A diferenciação adipogênica foi conduzida com o meio indutor composto pelo meio DMEM completo acrescido dos seguintes fatores indutores:  $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de dexametasona,  $100 \text{ U.mL}^{-1}$  de insulina,  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de indometacina e  $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$  de isobutil-1-metilxantina (IBMX) (Sekiya et al., 2004).

##### 4.15.2. Meio osteogênico

A diferenciação osteogênica foi conduzida com o meio indutor composto pelo meio DMEM completo acrescido dos seguintes fatores indutores:  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de

ácido ascórbico,  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\beta$ -glicerofosfato e  $0,1 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$  de dexametasona (Liu et al., 2007).

#### **4.15.3. Indução da diferenciação celular**

As células-tronco na terceira ou na quarta passagem foram semeadas em placas de seis poços, na concentração de  $5 \times 10^3$  células por poço. 24 horas após o plaqueamento foram adicionados os meios indutores de diferenciação, adipogênico ou osteogênico, os quais foram renovados a cada 2 dias, por um período de 21 dias. No sétimo, no décimo quarto e no vigésimo primeiro dia de incubação com o meio indutor de diferenciação, as proteínas totais das células foram extraídas para análise por western blot seguindo os procedimentos definidos nos itens 4.4 e 4.5. Como controle negativo, células-tronco foram mantidas em meio DMEM completo pelos mesmos períodos de tempo e seguindo a mesma cinética de renovação do meio. Além disso, no vigésimo primeiro dia de diferenciação, as células foram submetidas a processos de colorações específicas para a avaliação da presença de mineralização e acúmulo intracelular de lipídeos, indicadores de êxito nas diferenciações osteogênica e adipogênica das células-tronco, respectivamente.

#### **4.15.4. Avaliação das diferenciações celulares por colorações específicas**

##### **4.15.4.1. Coloração Oil Red O (Óleo Vermelho) – Diferenciação adipogênica**

Ao término do período de indução adipogênica, as células foram lavadas com PBS  $0,15 \text{ M}$  e fixadas com solução  $10\%$  (p/v) de formalina por 1 hora. Em seguida, foram lavadas abundantemente com água destilada. Foram adicionados  $2 \text{ mL}$  de isopropanol  $60\%$  (v/v) por poço e a placa foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. Uma solução de uso de Óleo Vermelho O, composta por 3 partes da solução estoque ( $300 \text{ mg}$  de Óleo Vermelho O em  $100 \text{ mL}$  de 2-propanol  $99\%$ ) para 2 partes de água destilada, foi preparada. Após o preparo, essa solução estoque foi mantida em repouso por 10 minutos e filtrada em papel filtro. O 2-propanol foi retirado e  $2 \text{ mL}$  de corante foram adicionados por poço, com incubação de 5 minutos. Seguiram-se mais lavagens com água destilada e contracoloração com hematoxilina, por 1 minuto. As células foram lavadas novamente e observadas no

microscópio Olympus IX70, nos aumentos de 4, 10 e 20 vezes, para fotodocumentação.

#### **4.15.4.2. Coloração Von Kossa – Diferenciação osteogênica**

Ao término do período de indução osteogênica, as células foram lavadas com PBS 0,15 M e fixadas com solução 4% (v/v) de paraformaldeído (PFA) em PBS por 1 hora. Em seguida, foram lavadas abundantemente com água destilada. Foi adicionado 1 mL/poço da solução 5% (p/v) de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) em água e as células foram expostas a luz ultravioleta, por 1 hora. Seguiram-se mais lavagens com água destilada e posterior adição de solução 5% (p/v) de tiosulfato de sódio em água, por 5 minutos. As células foram lavadas novamente e contracoradas com eosina por 40 segundos. As culturas foram fotodocumentadas no microscópio (Olympus IX70; aumentos de 4, 10 e 20X).

#### **4.16. Ensaio de avaliação da redução de resazurina em resofurina**

hASC foram plaqueadas na concentração de  $1 \times 10^4$  células por poço, 3 poços por grupo, em placas de 96 poços, e transfectadas conforme o item 4.4. Após 24, 48, ou 72 horas de incubação em estufa a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , o meio foi retirado e substituído por uma contendo o reagente *Celltiter Blue* (Promega) e meio DMEM, seguido por duas horas de incubação em estufa. Este ensaio utiliza a redução da resazurina (pouco fluorescente) em resorufina (muito fluorescente) como indicador do estado de oxirredução celular em ensaios de viabilidade. Em seguida, as placas foram analisadas no fluorímetro *Synergy 2* (Bio-Tek), do Laboratório de Equipamentos Multiusuários do Departamento de Bioquímica e Imunologia (Multidbiq), utilizando os filtros de 485/20 para excitação e 590/35 para emissão. Os dados gerados foram plotados em gráficos com valores de fluorescência das células transfectadas em relação às células não transfectadas.

#### **4.17. Ensaio de incorporação de 5-etinil-2'-deoxiuridina (EdU)**

Para a avaliação das células em proliferação, isto é, aquelas nas quais seu material genético está sendo duplicado, comumente são utilizados análogos de nucleotídeos, que são incorporados ao DNA e podem de alguma forma ser detectados e quantificados. Análogos de timidina são os mais utilizados e o EdU (5-

etnil-2'-deoxiuridina), que possui um término alcalino como substituinte do grupo metil 5', está dentro deste grupo (Salic and Mitchison, 2008).

hASC foram plaqueadas em placas de 96 poços na densidade de  $1 \times 10^4$  células por poço, para os ensaios de 48 horas pós-transfecção, e  $2,5 \times 10^3$  células por poço para os ensaios de 7 dias pós-transfecção, 3 poços por grupo em cada ensaio, sendo transfectadas de acordo com o item 4.4. Para a marcação e a quantificação de células EdU-positivas utilizou-se o kit *Click-iT EdU* (ThermoFisher Scientific).

Após o período de incubação desejado, foi realizado o pulso com 200  $\mu$ L por poço de 10  $\mu$ M de EdU em meio sem soro, por uma hora, a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Decorrido o tempo de incubação, as células foram fixadas com formaldeído 3,7% (v/v) em PBS, por 15 minutos. Após duas lavagens com PBS 1X, seguiu-se a permeabilização das células com 0,1% (v/v) Triton-X 100 por 15 minutos. As células foram novamente lavadas com PBS 1X e em seguida incubadas com a solução de detecção de EdU, contendo Azida-Alexa 555, por 30 minutos, ao abrigo da luz. Procedeu-se a lavagem das células com o *Click-it reaction rinse buffer* e a incubação com a solução de corante nuclear *HCS Nuclear Mask Blue* (1:2000) por 30 minutos, no escuro. As células foram lavadas duas vezes com PBS 1X, fotodocumentadas com a objetiva de 4x no microscópio Olympus IX70, com o uso da câmera QIClick e do software *Image Pro Plus 7.01* (Media Cybernetics). Os filtros utilizados para a excitação (Ex) e emissão (Em) dos fluoróforos foram Ex 350/50 e Em 455/50 para *HCS Nuclear Mask Blue* e Ex 555/25 e Em 605/52 para Azida-Alexa 555. Coletou-se 3 fotos por grupo, por ensaio, e os ensaios foram repetidos três vezes. O número de células totais por campo (marcação nuclear *HCS Nuclear Mask Blue*) e o número de células EdU-positivas (Azida-Alexa 555) foram contados, processados e apresentados em gráficos da porcentagem de células EdU-positivas em relação ao número total de células.

#### **4.18. Ensaio de quantificação de histona H3 fosforilada Ser10 (pH3 S10p)**

A histona H3 fosforilada no resíduo de serina na posição 10 é um marcador de mitose (Wei et al., 1998). Desse modo, foi feita a marcação desta proteína

fosforilada, através do ensaio de imunofluorescência, para a quantificação de células nessa fase do ciclo celular.

As células-tronco foram semeadas em placas de 96 poços, na concentração de  $1 \times 10^4$  células por poço, para os ensaios de 48 horas pós-transfecção, e  $2,5 \times 10^3$  células por poço para os ensaios de 7 dias pós-transfecção, 3 poços por grupo em cada ensaio, e transfectadas de acordo com o item 4.4.

Após o período de incubação desejado, as células foram lavadas com PBS 1X, fixadas com 4% (p/v) de paraformaldeído em PBS por 15 minutos, lavadas três vezes com PBS 1X e permeabilizadas com 0,1% (v/v) Triton X-100 em PBS por 5 minutos. Feito isto, as células foram incubadas na solução de bloqueio (PBS contendo 1% de BSA e 5% de soro de cabra, ThermoFisher Scientific), por 1 hora. Após o bloqueio, as células foram incubadas com anticorpo primário anti-pH3 (histona H3 fosforilada; S10p) de coelho policlonal (1:500) (Millipore). Após 18 horas, procedeu-se três lavagens com PBS 1X e incubação por 1 hora na solução de PBS 1% BSA contendo anticorpo secundário conjugado a Alexa Fluor® 488 IgG anti coelho (1:1000, ThermoFisher Scientific) e o marcador nuclear Hoechst 33258 (1:7500, Invitrogen). Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS 1X e fotografadas no microscópio Olympus IX70, no aumento de 4x com o uso da câmera QIClick e do software *Image Pro Plus 7.01* (Media Cybernetics). Para detecção da excitação e emissão dos fluoróforos foram utilizados os filtros: Ex 350/50 e Em 455/50 para Hoescht e Ex 490/20 e Em 525/36 para Alexa Fluor® 488. Foram tiradas 3 fotos por grupo, por ensaio, e os ensaios foram repetidos três vezes. O número de células totais por campo (marcação nuclear, Hoescht) e o número de células pH3-positivas (marcação com Alexa Fluor® 488) foram contados, gerando gráficos da porcentagem de células pH3-positivas em relação ao número total de células.

#### **4.19. Ensaio de senescência (atividade de $\beta$ -galactosidase associada à senescência (SA- $\beta$ -Gal))**

Dimri e colaboradores (1995) (Dimri et al., 1995) observaram que células senescentes expressam uma  $\beta$ -galactosidase, detectável em pH 6, que células não-senescentes não expressam, sendo, portanto, denominada  $\beta$ -galactosidase associada à senescência (SA- $\beta$ -Gal). A partir dessa descoberta a SA- $\beta$ -Gal passou a ser um marcador de senescência largamente utilizado.

Células-tronco mesenquimais foram plaqueadas em placas de 24 poços, na densidade de  $1 \times 10^4$  células por poço, 2 poços por grupo, e transfectadas (item 4.4). 48 horas ou 7 dias após a transfecção essas células foram coradas para a detecção da atividade de  $\beta$ -galactosidase associada à senescência (SA- $\beta$ -Gal), utilizando-se o *Senescence Cells Histochemical Staining Kit* (Sigma-Aldrich). As células foram lavadas duas vezes com PBS 1X e então incubadas com tampão de fixação 1X (formaldeído 20%, glutaraldeído 2%, 70,4 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 14,7 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,37 M NaCl e 26,8 mM KCl) por 6 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, realizou-se três lavagens com PBS 1X e a adição às células da mistura de coloração (1 mL de solução de coloração 10X, 125  $\mu\text{L}$  de Reagente B (Ferricianeto de Potássio), 125  $\mu\text{L}$  de Reagente C (Ferrocianeto de Potássio), 0,25 mL de solução de X-Gal e 8,5 mL de água ultrapura). As células foram incubadas por 2 horas a  $37^\circ\text{C}$ , na ausência de luz e de  $\text{CO}_2$ . Decorrido o período de incubação, a mistura de coloração foi substituída por PBS 1X e as células foram fotodocumentadas no microscópio Olympus IX70, no aumento de 4x com o uso da câmera QIClick e do software *Image Pro Plus 7.01* (Media Cybernetics). Coletou-se 2 fotos por poço, por ensaio, e os ensaios foram realizados em triplicata biológica. O número de células totais por campo e o número de células senescentes (coloração azul perinuclear) foram contados, gerando gráficos da porcentagem de células senescentes em relação ao número total de células.

#### **4.20. Análise estatística**

Todos os dados mostrados representam pelo menos três experimentos independentes. As análises foram realizadas utilizando-se o software *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software, Inc). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão e comparados por análise de variância (One-way ou Two-way ANOVA) com teste de comparação múltipla de Bonferroni, ou por teste *t* de Student (para amostras paramétricas) ou comparados por teste de Kruskal-Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn, ou por teste de Mann-Whitney (para amostras não-paramétricas). A significância estatística foi definida por valores de  $p < 0,05$ .

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Capítulo I – Caracterização de PLC $\delta$ 4 em células SK-HEP-1**

#### **5.1.1. O silenciamento de PLC $\delta$ 4 reduz a taxa de crescimento das células SK-HEP-1**

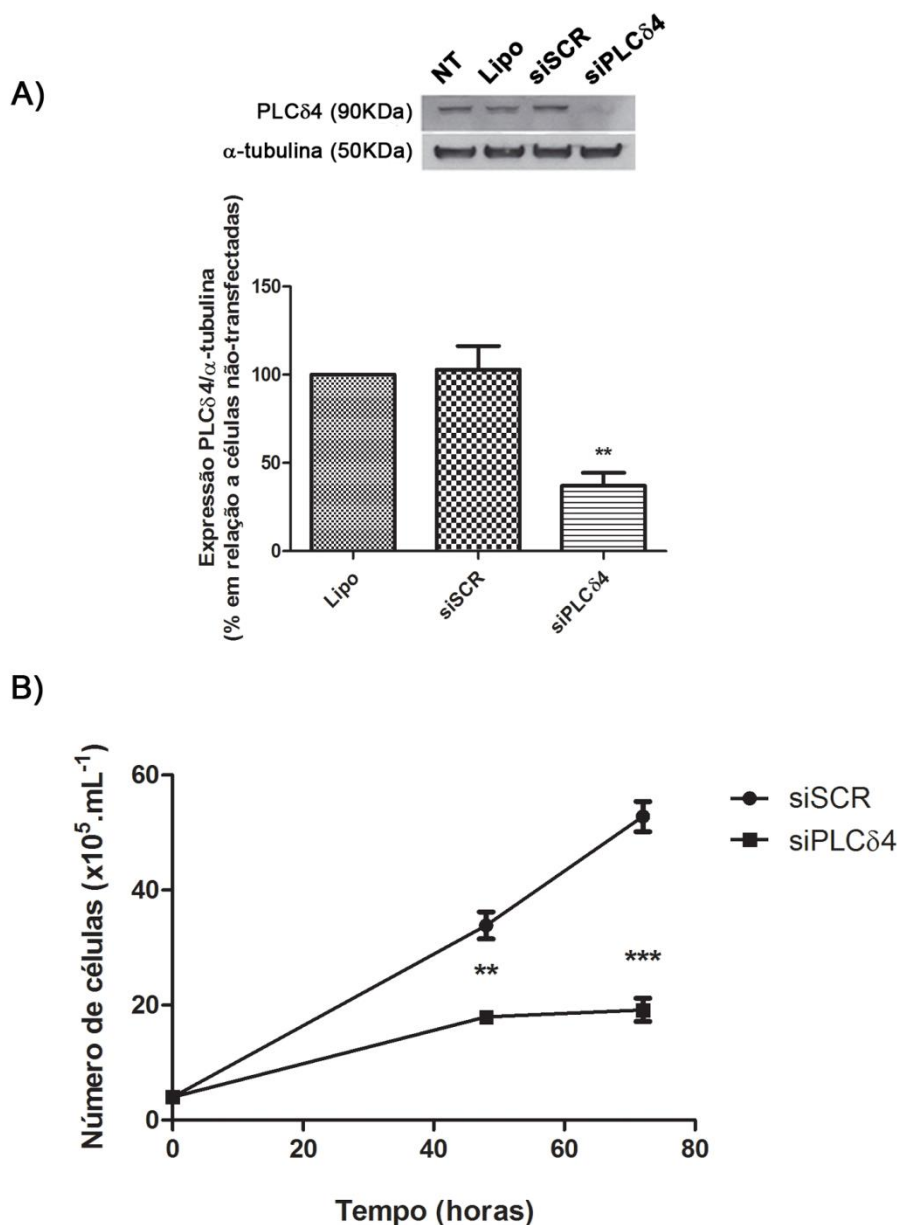
Com o objetivo de avaliar se PLC $\delta$ 4 está relacionada à proliferação celular, foram conduzidas curvas de crescimento das células SK-HEP-1 com expressão reduzida desta proteína. Assim, células desta linhagem foram transfectadas com siRNA scramble (siSCR) ou siRNA para PLC $\delta$ 4 (siPLC $\delta$ 4). A eficiência do silenciamento de PLC $\delta$ 4 nas células foi definida pela avaliação da expressão proteica, sendo observada uma redução de cerca de 60% no nível da proteína PLC $\delta$ 4, em relação ao grupo de células não tratadas (redução de  $103 \pm 13,37$  SEM em siSCR para  $37,05 \pm 7,44$  SEM em siPLC $\delta$ 4), 48 horas após a transfecção (Figura 10A).

As células foram tripsinizadas 48 ou 72 horas após a transfecção com os siRNAs, e contadas em câmara de Neubauer, utilizando azul de Tripán para avaliação da viabilidade celular. Tanto no tempo de 48 quanto no tempo de 72 horas observou-se uma diminuição de 47% e 64%, respectivamente, no crescimento das células transfectadas com siPLC $\delta$ 4, em relação ao controle (siSCR) (Figura 10B). Tal redução no crescimento das células silenciadas para PLC $\delta$ 4 poderia estar ocorrendo devido a um aumento da morte celular, ou em decorrência do bloqueio das células em alguma fase do ciclo celular.

#### **5.1.2. A redução da proliferação das células transfectadas com siPLC $\delta$ 4 não está relacionada a um aumento da morte celular**

A fim de investigarmos se a redução da proliferação das culturas transfectadas com siPLC $\delta$ 4 ocorreu devido a um aumento da morte celular, foram feitos experimentos de marcação das células com Anexina V-FITC, que marca células apoptóticas, e com iodeto de propídeo, que indica células em apoptose tardia e/ou necróticas. Desse modo, decorridas 48 horas da transfecção com siRNA, as células foram incubadas com esses marcadores.





**Figura 10: O silenciamento de PLC $\delta$ 4 reduz a proliferao de células SK-HEP-1.** **A)** Western Blot dos extratos de proteínas totais de células após 48 horas da transfeco com siSCR ou siPLC $\delta$ 4. O silenciamento de PLC $\delta$ 4 reduziu a quantidade da proteína PLC $\delta$ 4, em relao às células controle. NT: células não-transfectadas e nem tratadas com lipofectamina; Lipo: células tratadas com lipofectamina, o reagente de transfeco; siSCR: células transfectadas com *scramble* siRNA; siPLC $\delta$ 4: células transfectadas com siRNA para PLC $\delta$ 4. One-way ANOVA com teste de comparao múltipla de Bonferroni. **B)** Curva de crescimento de SK-HEP-1 transfectada com siRNAs. Após 48 e 72 horas da transfeco, as células foram contadas em Câmara de Neubauer, utilizando azul de Tripa para excluso de viabilidade. Pode-se observar que tanto para 48 quanto para 72 horas as células transfectadas com siPLC $\delta$ 4 (●) tiveram um crescimento menor do que as células transfectadas com siScramble (siSCR; ■). Teste *t* de Student não pareado. \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . Foram realizados 3 experimentos independentes.

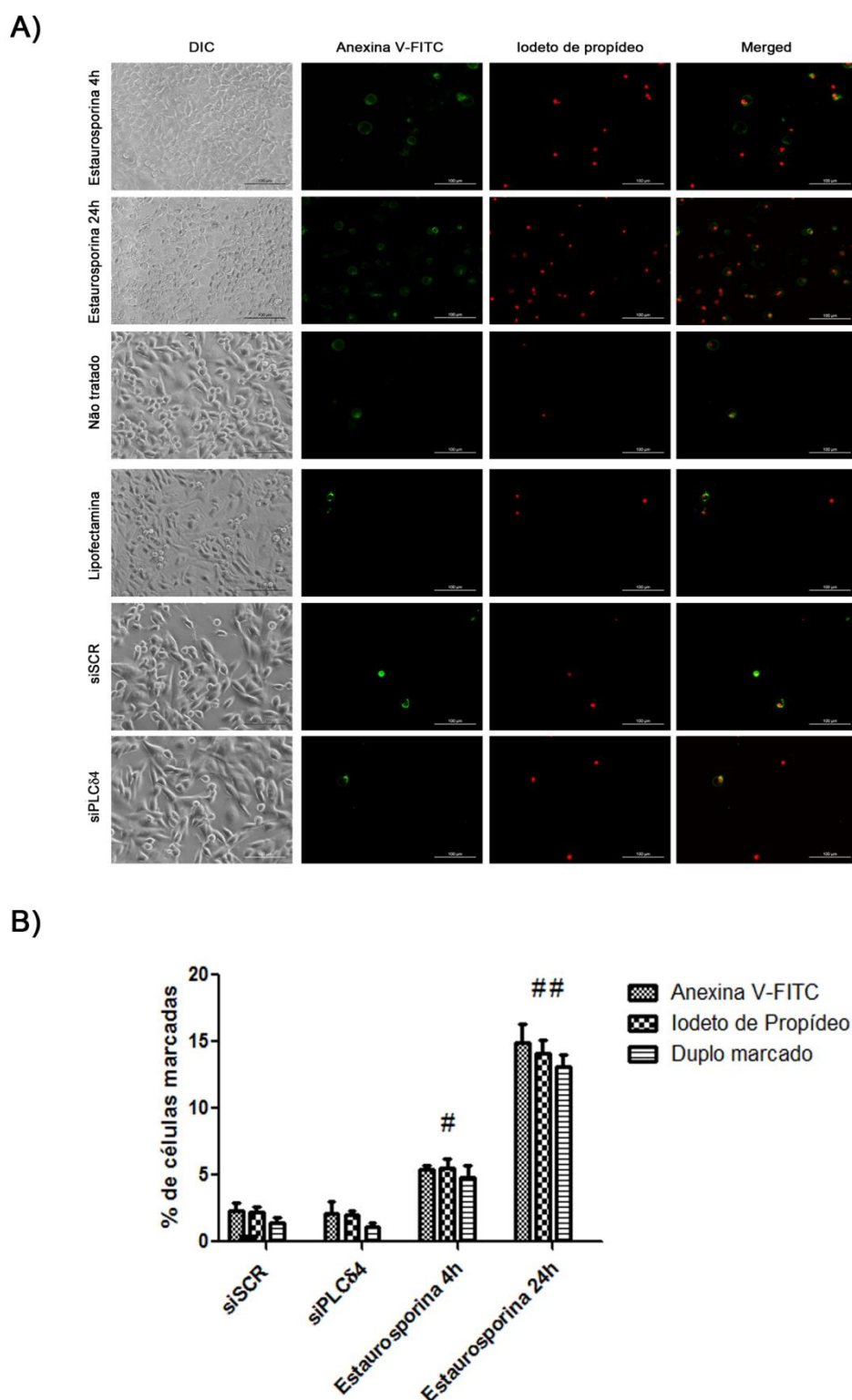
Na figura 11A, podem-se observar as imagens feitas dessas células. Para as células sem tratamento (não tratado), tratadas apenas com lipofectamina, ou tratadas com siRNA scramble (siSCR) ou para PLC $\delta$ 4 (siPLC $\delta$ 4) parece não haver uma diferença, entre os diferentes grupos, de marcação com Anexina V-FITC (em verde) e iodeto de propídeo (em vermelho). Em contrapartida, as células tratadas com estaurosporina (inibidora de cinases), usada como controle positivo de apoptose, apresentaram marcação em ambos os tempos, em comparação com os demais grupos experimentais.

A quantificação das marcações celulares, mostrada na Figura 11B, evidencia a ausência de diferença das marcações entre as células transfectadas com siSCR e transfectadas com siPLC $\delta$ 4, enquanto que ambos os grupos diferiram dos grupos tratados com estaurosporina 4 e 24 horas. Sendo assim, a redução do crescimento de células *knockdown* para PLC $\delta$ 4, em relação ao controle siSCR, parece não estar relacionada a um aumento da morte celular por mecanismos de apoptose ou necrose.

### **5.1.3. O *knockdown* de PLC $\delta$ 4 leva ao acúmulo de células nas fases G1 e G2/M do ciclo celular**

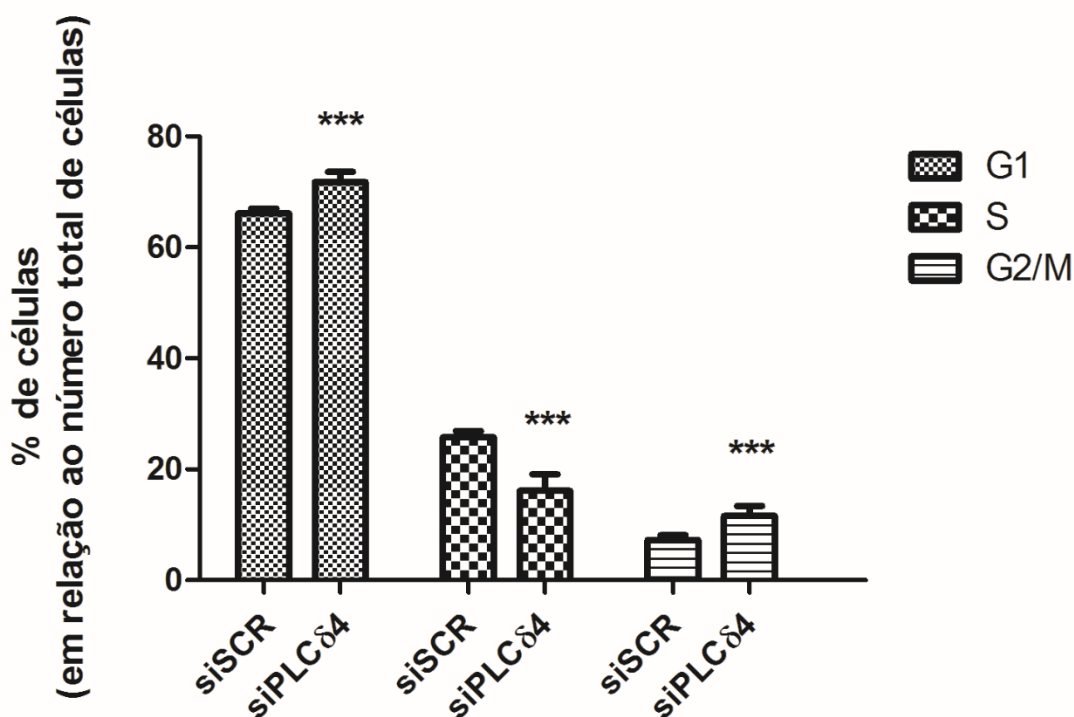
Uma vez que a redução do crescimento de células siPLC $\delta$ 4 parece não estar relacionada ao aumento da morte das mesmas, seguimos com a avaliação do perfil do ciclo celular. Desse modo, as células transfectadas com siSCR ou siPLC $\delta$ 4 foram lisadas, marcadas com iodeto de propídeo e analisadas por citometria de fluxo para avaliação da quantidade de DNA em diferentes fases do ciclo celular.

Como apresentado na figura 12, as células transfectadas com siPLC $\delta$ 4, quando comparadas com o controle siSCR, estão acumuladas nas fases G1 e G2/M do ciclo celular ( $p < 0,001$ ), com uma redução do número de células na fase S ( $p < 0,001$ ). Esse resultado sugere que o número de células siPLC $\delta$ 4 entrando na fase de duplicação do DNA (fase S) está reduzido, o que poderia explicar a diminuição da proliferação das mesmas.



**Figura 11: A transfecção com siPLC $\delta$ 4 não induz uma resposta de morte celular em células SK-HEP-1.** Após 48 horas da transfecção, células SK-HEP-1 foram incubadas com Anexina V-FITC e iodeto de propídeo. Células tratadas com estaurosporina por 4 ou 24 horas foram utilizadas como controle positivo de morte celular. **A)** Painel das imagens do ensaio. As células marcadas com Anexina V-FITC estão em verde, e as marcadas com iodeto de propídeo estão em vermelho. DIC = imagem de contraste de interferência diferencial. Barra de tamanho = 100  $\mu$ m. Merged = sobreposição das imagens de Anexina V-FITC e iodeto de propídeo. **B)** Quantificação de células

positivas para as marcações avaliadas. As porcentagens de células marcadas com Anexina V-FITC ou iodeto de propídeo, ou duplamente marcadas com Anexina V-FITC e iodeto de propídeo, foram expressas em relação ao número total de células por campo. Não houve diferença entre siPLC $\delta$ 4 e siSCR, enquanto o grupo tratado com estaurosporina diferiu tanto do grupo siPLC $\delta$ 4 quanto de siSCR. One-way ANOVA com teste de comparação múltipla de Bonferroni. # =  $p < 0,01$ ; ## =  $p < 0,001$ . n=3.

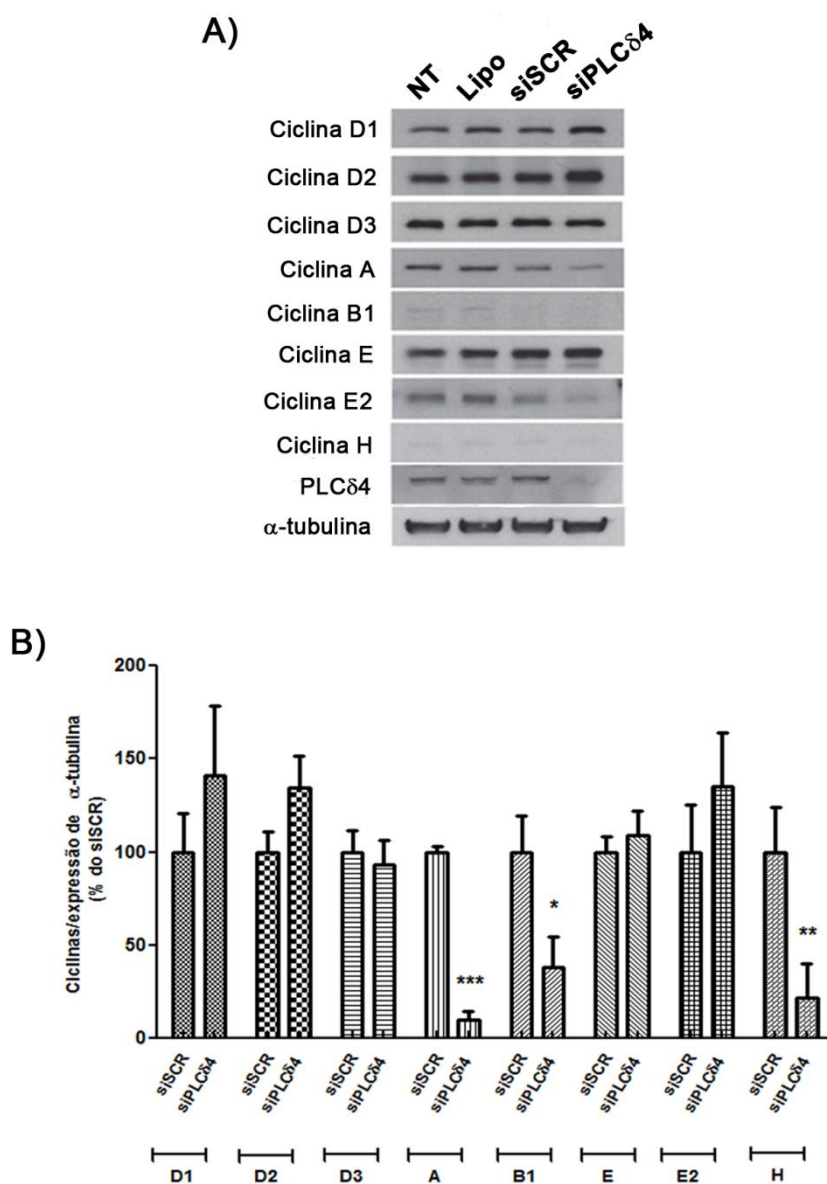


**Figura 12: A redução do conteúdo de PLC $\delta$ 4 leva a um aumento de células SK-HEP-1 nas fases G e G2/M do ciclo celular.** Células SK-HEP-1 foram plaqueadas e transfectadas com siSCR ou siPLC $\delta$ 4. Após 48 horas da transfecção, essas células foram tripsinizadas, contadas, fixadas, lisadas e incubadas com solução hipotônica contendo iodeto de propídeo. Em seguida, foram analisadas no citômetro de fluxo. Houve um acúmulo significativo das células transfectadas com siPLC $\delta$ 4 nas fases G1 e G2/M do ciclo celular, com redução das mesmas na fase S comparadas ao grupo siSCR. Os resultados foram analisados utilizando o software FlowJo, sendo expressos como uma porcentagem de eventos, em relação ao número total de eventos (n=3). Two-way ANOVA com teste de comparação múltipla de Bonferroni. \*\*\* =  $p < 0,001$ .

#### **5.1.4.A diminuição da expressão de *PLCδ4* afeta a expressão de ciclinas**

Para melhor elucidarmos a parada das células siPLCδ4 nas fases G1 e G2/M, seguimos para a quantificação da expressão das ciclinas nessas células. As ciclinas são proteínas que regulam a atividade de cinases dependentes de ciclinas (CDKs), as enzimas responsáveis pela progressão do ciclo celular. As células SK-HEP-1 foram transfectadas com os siRNAs citados anteriormente e 48 horas após a transfecção tiveram suas proteínas totais extraídas, e estas foram avaliadas por Western Blot.

Das oito ciclinas analisadas, três tiveram a expressão reduzida em células tratadas com siPLCδ4, em relação ao controle: A, B1 e H (Figura 13). A ciclina A está envolvida com a fase S do ciclo celular; a ciclina B1 está relacionada ao checkpoint G2/M; a ciclina H é uma ciclina regulatória, envolvida com todas as fases do ciclo celular. Esses resultados indicam que a alteração no conteúdo de PLCδ4 altera a progressão do ciclo celular, afetando a expressão de ciclinas, porém sem indução de apoptose ou necrose.



**Figura 13: O silenciamento de PLCδ4 altera a expressão de ciclinas na linhagem SK-HEP-1.** Extratos proteicos totais das células não transfectadas (NT), tratadas com lipofectamina (Lipo), siRNA scramble (siSCR) ou siRNA para PLCδ4 (siPLCδ4) foram resolvidas em gel de poliacrilamida e transferidas para membrana de PVDF. **A)** As membranas foram incubadas com os anticorpos específicos para as ciclinas A, B1, D1, D2, D3, E, E2, H e para PLCδ4 e α-tubulina, sendo a última utilizada como controle. **B)** Quantificações relativas da expressão das ciclinas normalizada pela expressão de α-tubulina, das células transfectadas com siPLCδ4 em relação (porcentagem) às células transfectadas com siSCR. Houve diferença estatística na expressão das ciclinas A, B1 e H. Teste *t* de Student não pareado. \* =  $p < 0,1$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . Foram realizados três experimentos independentes.

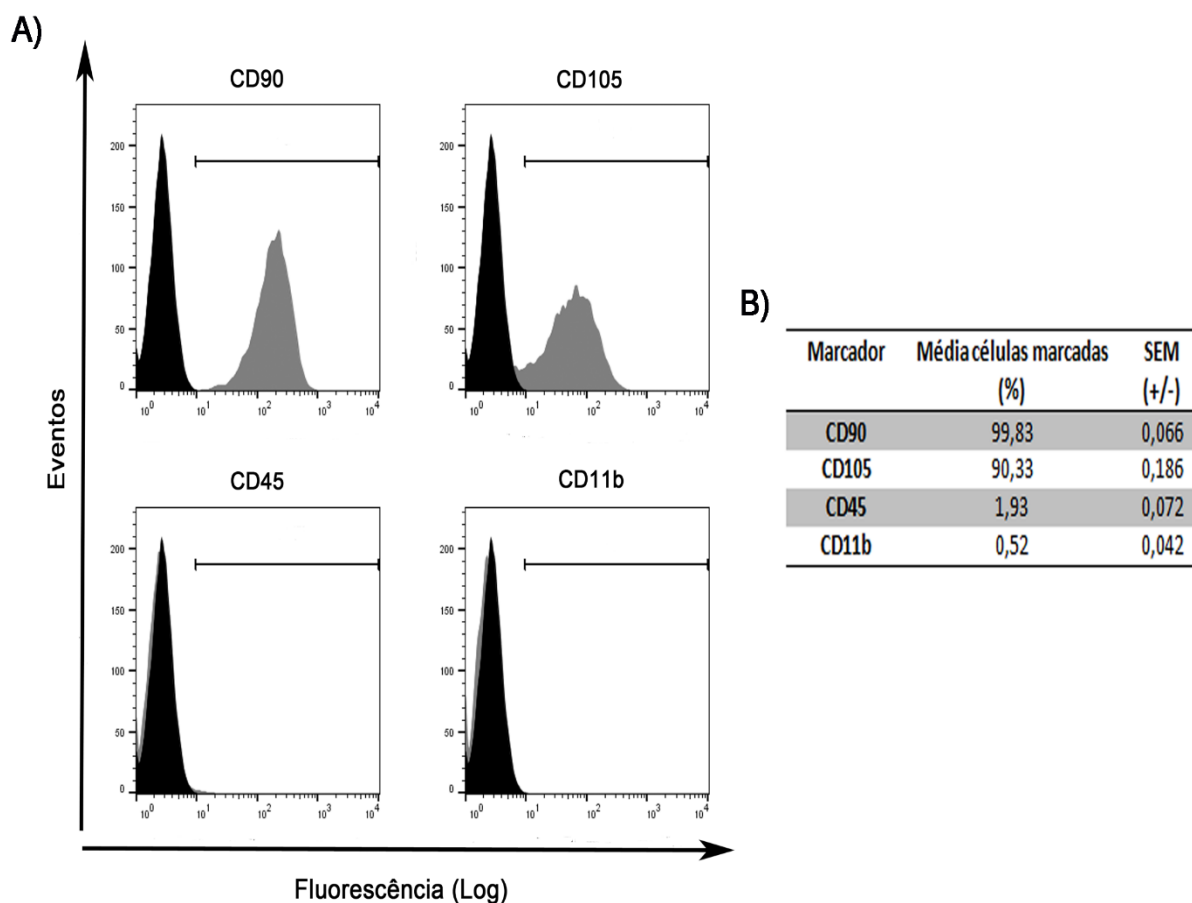
## **5.2. Capítulo II – Células-tronco mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo (hASC)**

### **5.2.1. Caracterização das células-tronco mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo (hASC)**

Após a extração das células-tronco derivadas de tecido adiposo, para a comprovação destas como sendo células-tronco mesenquimais multipotentes, foram seguidas as diretrizes da Sociedade Internacional de Terapia Celular, revisadas por Bourin e colaboradores em 2013 (Bourin et al., 2013). Segundo tais diretrizes, as células estromais mesenquimais multipotentes derivadas de tecido adiposo devem: ser aderentes ao plástico em cultura; apresentar no mínimo dois marcadores negativos (expressão menor que 2%), dentre CD45, CD31, CD235a e CD11b (este último deve possuir expressão negativa ou muito baixa); apresentar no mínimo dois marcadores positivos (expressão maior que 80%), dentre CD13, CD29, CD73, CD90, CD44 e CD105; diferenciar-se nas linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica *in vitro*. A primeira característica observada nas células extraídas em nosso laboratório foi a adesão ao plástico (Figura 9B).

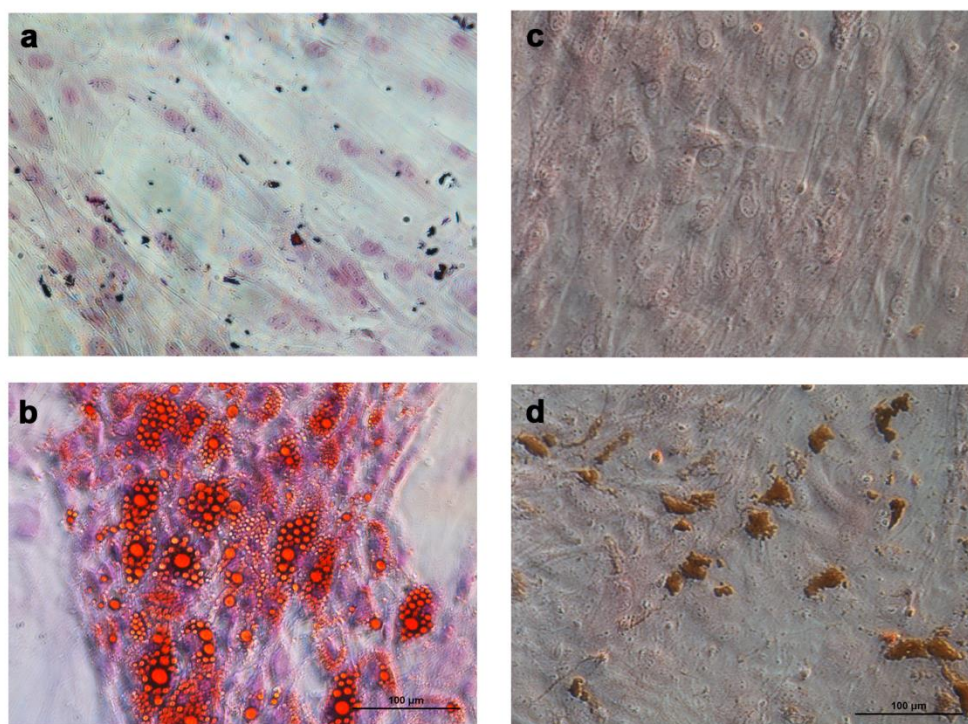
No experimento de citometria de fluxo, utilizamos os marcadores de superfície celular CD90 e CD105 (positivos) e CD45 e CD11b (negativos). Na figura 14, pode-se observar que todos os marcadores apresentaram porcentagens de células positivas dentro do esperado para células-tronco mesenquimais, sendo de 99,8% ( $\pm 0,1$  SEM) para CD90, 90,3% ( $\pm 0,2$  SEM) para CD105, 1,9% ( $\pm 0,1$  SEM) para CD45 e 0,5% ( $\pm 0,0$  SEM) para CD11b.

Além de possuírem os marcadores de superfície característicos de células-tronco mesenquimais, as células extraídas também foram capazes de se diferenciarem nas linhagens adipogênica e osteogênica, como mostrado na figura 15. As células foram incubadas durante 21 dias em meio indutor de adipogênese ou de osteogênese. Decorrido este período de indução, as células foram coradas com corantes específicos: Óleo Vermelho O, que cora lipídeos intracelulares, e coloração de Von Kossa, que cora nódulos de mineralização.



**Figura 14: Caracterização imunofenotípica das células-tronco mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo (hASC).** As células-tronco foram tripsinizadas e incubadas com anticorpos primários anti-CD90, anti-CD105, anti-CD45 e anti-CD11b. Em seguida, foram incubadas com anticorpo secundário Alexa Fluor 488 ou Alexa Fluor 647 e analisadas por citometria de fluxo. **A)** Histogramas expressando a fluorescência (em escala logarítmica) versus o número de eventos lidos no citômetro. As curvas correspondem ao controle negativo (células que não foram incubadas com anticorpo primário) e em cinza são as células incubadas com os respectivos anticorpos primários. A barra na parte superior dos gráficos delimita a área na qual as células foram consideradas positivas. Representativo de uma das extrações. **B)** Tabela com a quantificação, em porcentagem em relação ao número total de células, das células positivas para cada marcador e o erro padrão (SEM) associado.  $n = 3$ .





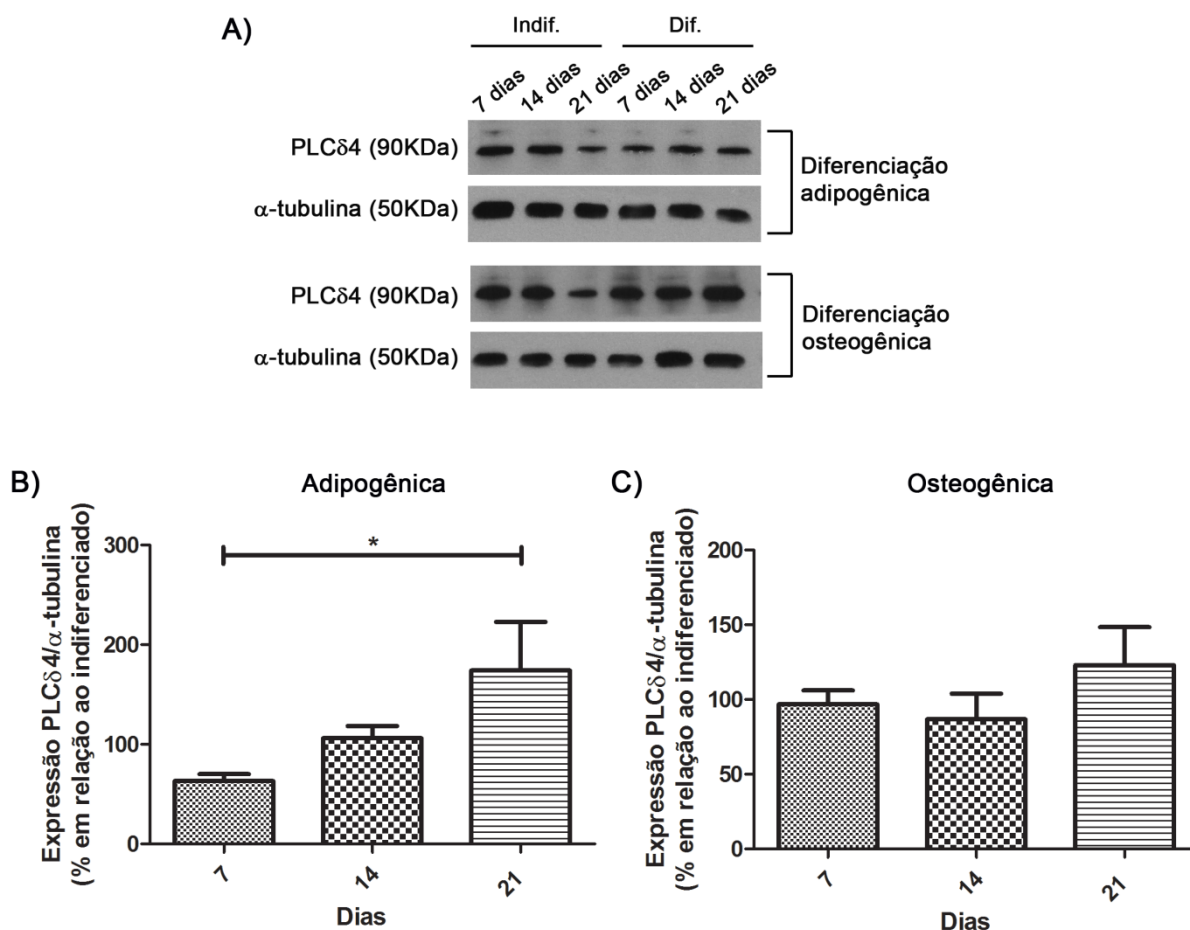
**Figura 15: Diferenciações adipogênica e osteogênica das células-tronco mesenquimais humanas (hASC).** Após 21 dias de cultivo nos meios indutores de diferenciação, as células foram coradas para os respectivos marcadores celulares de diferenciação e foram capturadas imagens de contraste de fase das mesmas, com objetiva de 20X. **a e b)** Células submetidas à coloração de óleo Vermelho O (lipídeos). Em (a), células cultivadas em meio DMEM completo apresentaram exclusivamente a marcação com hematoxilina. Em (b) as células cultivadas com indutores de adipogênese apresentaram marcações dos lipídeos intracelulares em vermelho. Os lipídeos foram corados em vermelho e os núcleos em roxo. **c e d)** Células submetidas à coloração de Von Kossa (mineralização). Em (c) as células cultivadas em meio DMEM completo, sendo evidenciada apenas a coloração com eosina (rosa). Em (d), células incubadas com indutores de osteogênese apresentaram nódulos de mineralização, corados em marrom. Imagens ilustrativas de um de três experimentos independentes realizados. Barra de tamanho = 100  $\mu\text{m}$ .

As células incubadas em meios indutores de diferenciação apresentaram as colorações para as respectivas diferenciações: adipogênica (presença de lipídeos corados em vermelho, Figura 15b, em comparação com células que não passaram por diferenciação, 15a) e diferenciação osteogênica (presença de nódulos de mineralização, em marrom, 15d, em comparação com células indiferenciadas, 15c). Coletivamente, esses resultados evidenciam o sucesso obtido no isolamento e no cultivo das células-tronco mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo (hASC).

#### **5.2.2.A expressão de PLC $\delta$ 4 aumenta com o decorrer da diferenciação adipogênica**

Como a capacidade de diferenciação é um aspecto característico de células-tronco mesenquimais, analisamos o envolvimento da proteína PLC $\delta$ 4 neste processo. As células foram diferenciadas do mesmo modo como descrito na figura 15.

Ensaio de Western Blot foram conduzidos para avaliar o perfil de expressão de PLC $\delta$ 4 em extratos proteicos após 7, 14 e 21 dias de cultivo em meios indutores de adipogênese ou osteogênese (Figura 16A). A análise estatística não revelou diferenças para a expressão de PLC $\delta$ 4 no decurso temporal para a diferenciação osteogênica (Figuras 16C), mas para a diferenciação adipogênica houve um aumento na expressão desta proteína, quando comparamos o sétimo dia de diferenciação com o vigésimo primeiro (Figuras 16B). Esse aumento na expressão indica um possível envolvimento de PLC $\delta$ 4 nos processos de diferenciação celular.



**Figura 16: A expressão da proteína PLC $\delta$ 4 aumenta em hASC que passaram por diferenciação adipogênica. A) Western blot dos extratos proteicos das células-tronco submetidas a diferenciação adipogênica ou osteogênica após 7, 14 e 21 dias de indução. Foram aplicadas no gel 30  $\mu$ g de proteínas e a membrana foi incubada com os anticorpos anti-PLC $\delta$ 4 e anti- $\alpha$ -tubulina. Indif. = células indiferenciadas. Dif. = células diferenciadas. Representativo de uma das extrações. B e C) Quantificações das bandas de Western Blot. A expressão de PLC $\delta$ 4 foi normalizada com a proteína controle  $\alpha$ -tubulina e os valores das células diferenciadas foram normalizados em relação às células indiferenciadas (em porcentagem). B) Quantificação da expressão relativa de PLC $\delta$ 4 nas células em diferenciação adipogênica. Houve diferença na expressão de PLC $\delta$ 4 entre o sétimo e o vigésimo primeiro dia de diferenciação. C) Quantificação da expressão relativa de PLC $\delta$ 4 em células que passaram por diferenciação osteogênica. Não houve diferença estatística na expressão de PLC $\delta$ 4 nos diferentes dias analisados. Teste de Kruskal-Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn. \* =  $p < 0,1$ . Foram realizados no mínimo três experimentos independentes.**

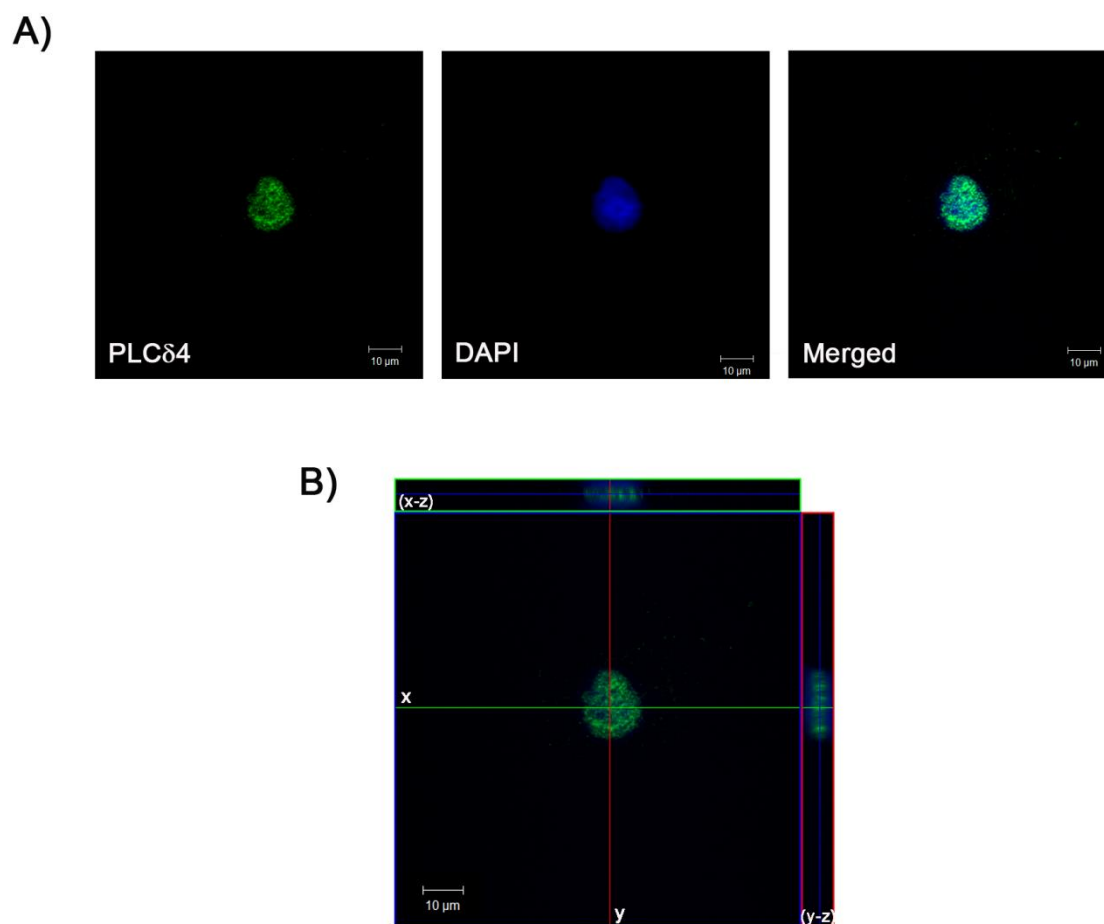
### 5.2.3. PLC $\delta$ 4 está predominantemente localizada no núcleo das hASC

A análise *in silico* da sequência proteica de hPLC $\delta$ 4 revelou a presença de sinais de localização nuclear (NLS – *Nuclear Localization Sequences*) e sinais de exclusão do núcleo (NES – *Nuclear Export Signal*) (Anexo 8.4, Figura 27) na sequência proteica de hPLC $\delta$ 4. O software *NucPred* (Brameier et al., 2007) apontou que há 86% de chance de hPLC $\delta$ 4 ser nuclear, baseado em sua sequência proteica, e o software *SeqNLS* (Lin and Hu, 2013) resultou em 86-89% de chance de a proteína possuir um NLS real. Também foram encontrados *hits* de NES com o software *NetNES* (la Cour et al., 2004).

Para a caracterização de PLC $\delta$ 4 nas células-tronco mesenquimais, a localização subcelular da proteína PLC $\delta$ 4 foi avaliada por microscopia confocal.

A proteína PLC $\delta$ 4 apresentou localização no núcleo das células hASC, como pode ser observado na Figura 17. Em A, PLC $\delta$ 4 está marcada com Alexa 488 (coloração verde; figura à esquerda), o núcleo da célula está marcado com DAPI (coloração azul, figura no centro) e as duas marcações se sobrepõem (Merged; figura à direita).

Para comprovar a compartimentalização nuclear de PLC $\delta$ 4, imagens seriadas foram coletadas e a reconstrução tridimensional realizada com o software *Image Browser* (Figura 17B). No plano medial, observam-se pontos verdes colocalizados com pontos azuis, indicando a localização da proteína em toda a extensão nuclear. Assim, a localização de PLC $\delta$ 4 em hASC se assemelha à localização em outros tipos celulares, como em células hepáticas de ratos (Liu et al., 1996), células de camundongo (Fiume et al., 2012) e inclusive à de células SK-HEP-1 (Figura 5), e corrobora as predições feitas nas análises *in silico*.

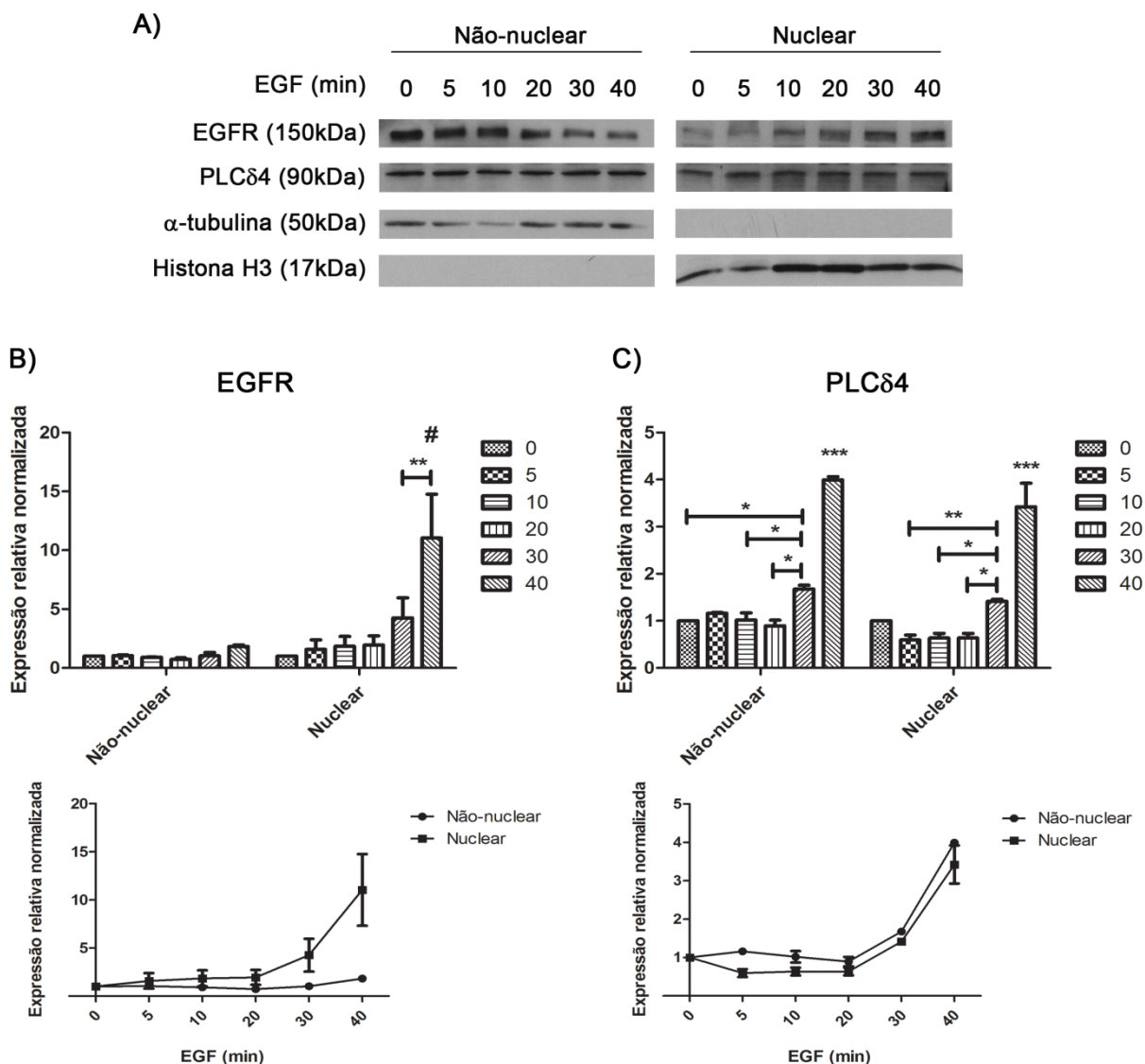


**Figura 17: PLCδ4 localiza-se predominantemente no núcleo de hASC.** As células-tronco foram incubadas com anticorpo primário anti-PLCδ4 e o secundário conjugado a Alexa 488 (verde). O núcleo foi marcado com a sonda DAPI (azul). **A)** PLCδ4 colocaliza-se com a marcação do núcleo de hASC, indicado pela imagem de sobreposição (Merged). Barra de tamanho = 10 μm. **B)** Reconstrução tridimensional. Painel central: plano medial em uma região no interior do núcleo. Acima: reconstrução 3D no plano x-z. À direita: reconstrução 3D no plano y-z. Escala: 10 μm. Imagem representativa de um dos experimentos realizados.

#### **5.2.4. Após estímulo com EGF, há aumento dos níveis proteicos de PLC $\delta$ 4 na célula, sem alteração de sua compartimentalização**

Nosso grupo de pesquisa caracterizou em trabalhos anteriores a translocação nuclear de EGFR em células tumorais (SK-HEP-1) (De Angelis et al., Anexo 8.6) e em células-tronco (hASC) (Faraco et al., 2017), após estímulo com EGF. Como descrito previamente na introdução, em células SK-HEP-1 o estímulo com EGF, além de levar à translocação de EGFR, está envolvido com o metabolismo de fosfoinosítídeos nucleares, possivelmente pela ação de PLC $\delta$ 4, mas não foi observada a translocação de PLC $\delta$ 4 para o núcleo destas células. A fim de investigarmos a distribuição celular de PLC $\delta$ 4 em hASC após estímulo com EGF, foram realizados ensaios de fracionamento celular para extração das proteínas presentes nas frações nucleares e não-nucleares.

Células, previamente privadas de soro, foram estimuladas com 200 ng.mL<sup>-1</sup> do ligante EGF por 0, 5, 10, 20, 30 ou 40 minutos. As frações resultantes, não-nuclear e nuclear, foram analisadas utilizando anticorpos anti-EGFR (reconhece a região carboxiterminal do EGFR, a qual compreende o domínio intracelular do receptor), anti- $\alpha$ -tubulina (proteína de localização citosólica) e anti-Histona H3 (proteína constituinte do core de histonas, nuclear). A ausência de  $\alpha$ -tubulina (50 kDa) na fração nuclear e Histona H3 (17 kDa) na fração não-nuclear é um indicativo da pureza das respectivas frações (Figura 18A). As bandas obtidas no Western Blot foram quantificadas, e os dados foram projetados em gráficos nas Figuras 18 B e C. Para EGFR, verifica-se um aumento desta proteína apenas na porção nuclear, indicativo da ocorrência de translocação desta proteína para o núcleo de hASC, sendo este aumento significativo com 40 minutos de estímulo com EGF (Figura 18B). A análise da expressão de PLC $\delta$ 4 revela um aumento de seu conteúdo proteico em ambas as frações celulares, a partir de 30 minutos de estímulo. Tal resultado é indicativo da ausência de eventos de translocação desta proteína (Figura 18C). Desse modo, o estímulo com EGF leva à translocação de EGFR para o núcleo de hASC, o que não acontece com PLC $\delta$ 4, mas esse estímulo leva ao aumento da expressão de PLC $\delta$ 4 em toda a célula.



**Figura 18: Estímulo com EGF leva à translocação de EGFR e ao aumento da expressão de PLCδ4 em hASC.** Células-tronco mesenquimais foram estimuladas com 200 ng.mL<sup>-1</sup> de EGF por 0, 5, 10, 20, 30 ou 40 minutos e tiveram suas proteínas extraídas por fracionamento celular. **A)** Western blot dos extratos proteicos das células-tronco estimuladas com EGF. Foram aplicadas no gel 30 µg de proteínas e a membrana foi incubada com os anticorpos anti-EGFR, anti-PLCδ4, anti-α-tubulina e anti-histona H3. Representativo de uma das extrações. **B e C)** As bandas de proteínas foram quantificadas e as expressões de EGFR e de PLCδ4 foram normalizadas com os conteúdos proteicos dos controles α-tubulina (não-nuclear) e histona H3 (nuclear) e os valores das células estimuladas foram normalizados em relação às células não estimuladas. **B)** Quantificação da expressão relativa de EGFR. Houve aumento na expressão de EGFR apenas na porção nuclear, com 40 minutos de estímulo, em comparação aos demais tempos de estímulo. **C)** Quantificação da expressão relativa de PLCδ4. Verifica-se um aumento na expressão de PLCδ4 a partir de 30 minutos de estímulo, para as duas frações analisadas. Two-way ANOVA com teste de comparação múltipla de Bonferroni. \* =  $p < 0,1$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; # =  $p < 0,001$ . Foram realizados no mínimo três experimentos independentes.

### **5.2.5. Células-tronco transfectadas com siPLC $\delta$ 4 apresentam redução do crescimento celular, mas não possuem aumento da morte celular**

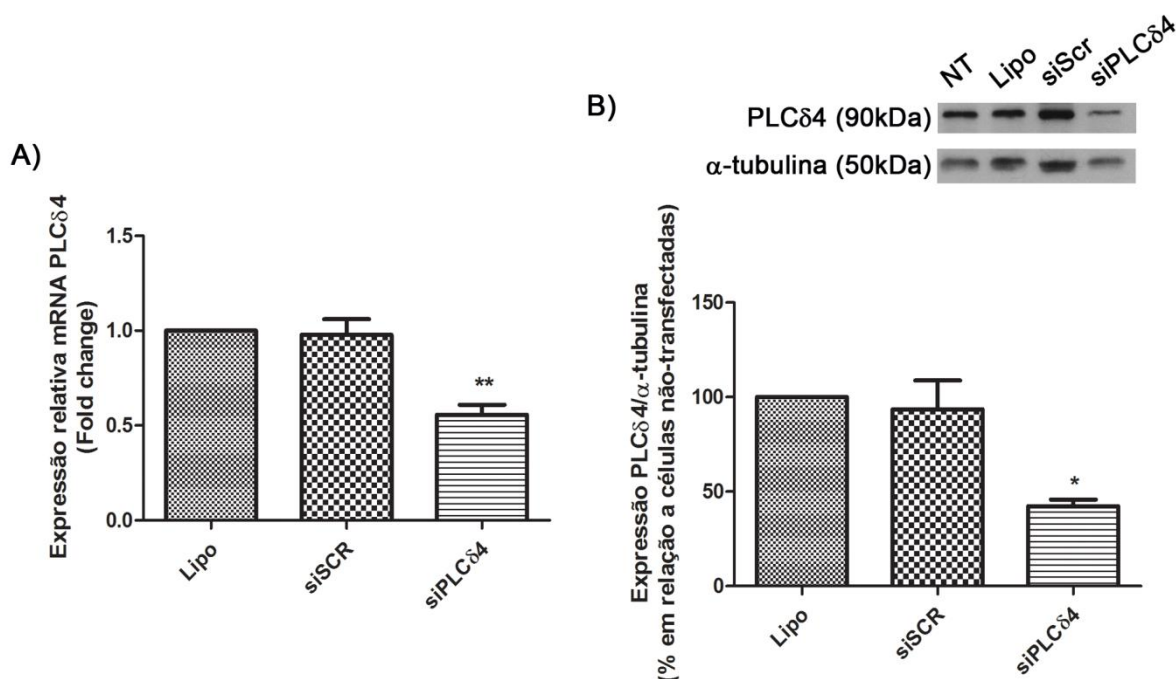
Assim como conduzido na linhagem SK-HEP-1, para prosseguirmos a caracterização de PLC $\delta$ 4 nas células-tronco mesenquimais o conteúdo desta proteína foi reduzido pela abordagem de RNA de interferência (siRNA).

Inicialmente, a validação da eficiência do *knockdown* de PLC $\delta$ 4 em hASC foi comprovada por ensaios de PCR quantitativa em tempo real (Real Time qPCR). As células-tronco foram transfectadas com *scramble* siRNA (siSCR), siRNA para PLC $\delta$ 4 (siPLC $\delta$ 4) ou tratadas apenas com lipofectamina (reagente de transfecção). 48 horas após a transfecção, o RNA das células foi extraído e utilizado para a síntese de cDNA. A expressão de PLC $\delta$ 4 foi normalizada pela expressão dos genes *GAPDH* e *RPL13A* e a amostra tratada com lipofectamina foi usada como calibradora. Na figura 19A, pode-se observar que as células transfectadas com siPLC $\delta$ 4 tiveram uma redução na expressão para cerca de metade do nível de expressão do mRNA de PLC $\delta$ 4 das amostras controle (redução de  $0,98 \pm 0,08$  SEM em siSCR para  $0,56 \pm 0,05$  SEM em siPLC $\delta$ 4).

A eficiência da redução do conteúdo proteico de PLC $\delta$ 4 (48 horas pós transfecção) foi avaliada pela técnica de Western Blot, com as membranas incubadas com anticorpos para PLC $\delta$ 4 e  $\alpha$ -tubulina. A expressão de PLC $\delta$ 4 apresentou uma diminuição de cerca de 50% em hASC silenciadas para PLC $\delta$ 4, quando comparadas aos grupos controle (redução de  $93,6 \pm 15,17$  SEM em siSCR para  $42,35 \pm 3,54$  SEM em siPLC $\delta$ 4) (Figura 19B).

Em conjunto, estes dados validam a eficiência da sequência de siPLC $\delta$ 4 em reduzir consideravelmente os níveis de expressão do mRNA e da proteína PLC $\delta$ 4.





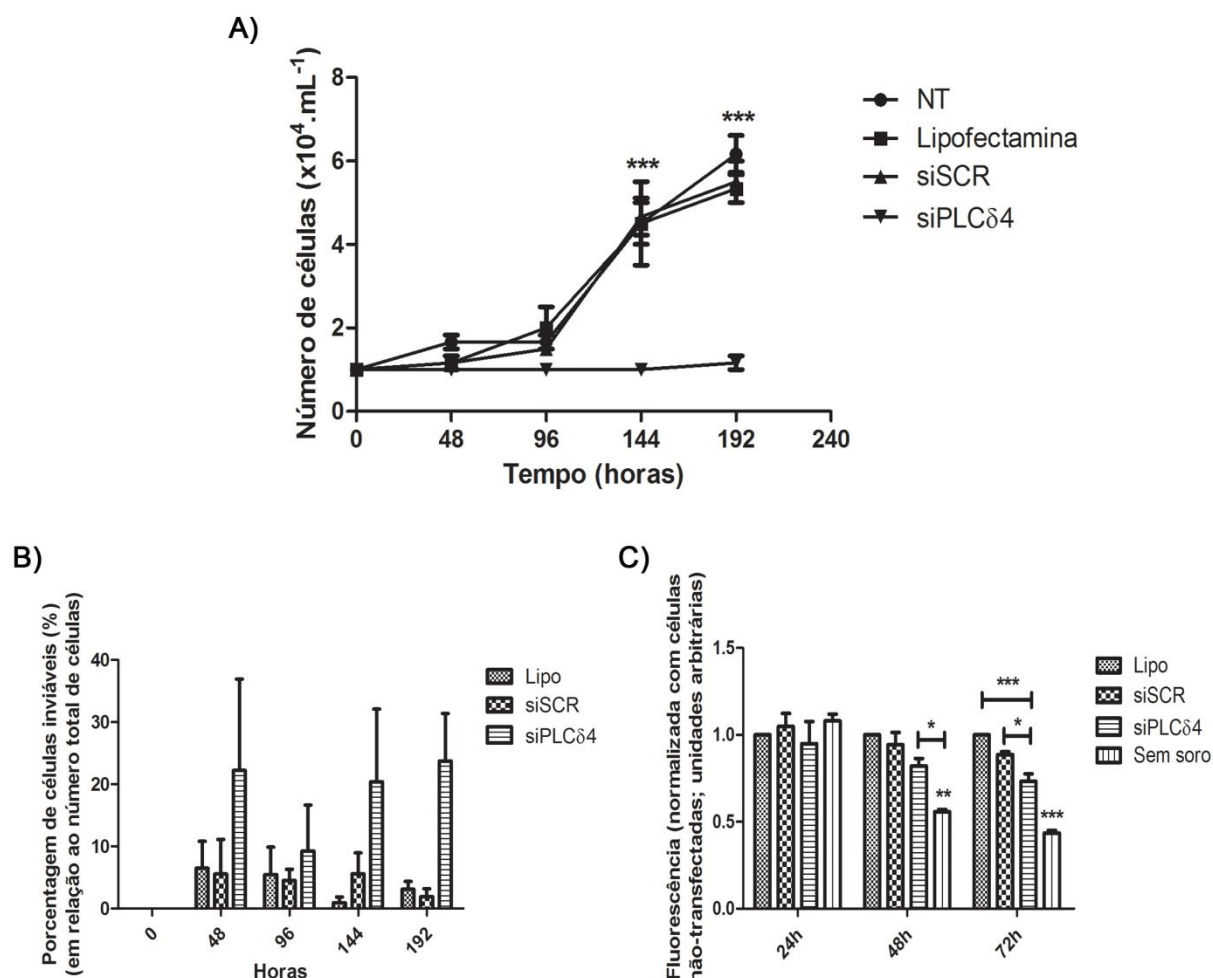
**Figura 19: A sequência de siPLCδ4 é eficiente na redução da expressão de PLCδ4 em hASC.** **A)** Expressão relativa do mRNA *PLCδ4* mensurada por PCR quantitativa em tempo real. 48 horas após a transfecção com 25 nM do *scramble* siRNA (siSCR) ou do siRNA para PLCδ4 (siPLCδ4), os RNAs totais foram extraídos das células e utilizados para a síntese de cDNA. A expressão de PLCδ4 foi normalizada com os genes *GAPDH* e *RPL13A* e as amostras tratadas exclusivamente com o agente de transfecção (lipofectamina) foram utilizadas como calibradoras. Houve redução da expressão de PLCδ4 nas células tratadas com siPLCδ4. **B)** Western blot dos extratos proteicos totais das células 48 horas após a transfecção. α-tubulina foi utilizada como um controle do carregamento proteico e os valores das células transfectadas foram normalizados em relação às células tratadas com lipofectamina (em porcentagem). A redução no conteúdo de proteínas PLCδ4 pode ser observado na amostra siPLCδ4, comparada aos controles. NT: células não-transfectadas e nem tratadas com lipofectamina; Lipo: células tratadas com lipofectamina, o reagente de transfecção; siSCR: células transfectadas com *scramble* siRNA; siPLCδ4: células transfectadas com siRNA para PLCδ4. One-way ANOVA com teste de comparação múltipla de Bonferroni. \* =  $p < 0,1$ ; \*\* =  $p < 0,01$ . Foram realizados 3 experimentos independentes para cada ensaio.

Uma vez confirmada a eficiência do silenciamento de PLC $\delta$ 4, foram conduzidas as análises funcionais com as células com conteúdo reduzido de PLC $\delta$ 4. O ensaio de crescimento celular revelou um padrão similar para os grupos controle (NT, células não transfectadas e não tratadas com lipofectamina; Lipo; siSCR), não sendo observada diferença entre eles (Figura 20A). Em contrapartida, a partir de 144 horas de cultivo, as células siPLC $\delta$ 4 apresentaram uma redução na proliferação celular, comparadas aos controles. Apesar da diminuição no crescimento celular, as células transfectadas com siPLC $\delta$ 4 não tiveram redução da viabilidade celular, pois os números de células coradas com azul de Tripán (células não viáveis incorporam o reagente, ficando azuis) não diferiu entre os grupos analisados (Figura 20B). Assim, a redução do crescimento de células siPLC $\delta$ 4 provavelmente está relacionada a alguma disfunção no ciclo celular destas células.

As células silenciadas para PLC $\delta$ 4 foram utilizadas em ensaios de redução de resazurina em resorufina (Figura 20C). A resazurina (azul, pouco fluorescente) é metabolizada nas mitocôndrias das células, sendo reduzida por NADPH ou NADH, gerando resofurina (rosa, altamente fluorescente), numa reação irreversível, que é utilizada como indicador de atividade mitocondrial (Riss et al., 2004).

No tempo de 24 horas após a transfecção não houve diferença de redução de resazurina entre os diferentes grupos analisados. Entretanto, decorridas 48 e 72 horas da transfecção, observou-se uma diminuição da atividade mitocondrial das células siPLC $\delta$ 4 em relação aos grupos lipofectamina e siSCR (Figura 20C).

A redução na atividade mitocondrial das células transfectadas com siPLC $\delta$ 4 corrobora o resultado da curva de crescimento (Figura 20A). Essa redução possivelmente está relacionada à diminuição do número total de células, quando comparadas aos controles, e não à redução da viabilidade celular. Em suma, a redução do crescimento de células siPLC $\delta$ 4 parece ser indicativo de alguma alteração no perfil do no ciclo celular dessas células.



**Figura 20: Knockdown de PLC $\delta$ 4 reduz o crescimento celular em células-tronco mesenquimais.** **A)** Curva de crescimento.  $1 \times 10^4$  células foram plaqueadas e transfectadas como descrito previamente. Essas células foram tripsinizadas a cada dois dias e contadas em câmara de Neubauer, utilizando Azul de Tripán para a exclusão de viabilidade. A partir do tempo 144 horas, observa-se redução significativa no crescimento das células siPLC $\delta$ 4. Curva representativa de um dos ensaios. **B)** Porcentagem de células inviáveis, contadas nos experimentos de curva de crescimento. **C)** As células foram transfectadas com siRNA e os ensaios conduzidos 24, 48 ou 72 horas após a transfecção. Os valores de fluorescência dos grupos foram normalizados com os apresentados pelo grupo Lipo. Houve redução no metabolismo mitocondrial das células transfectadas com siPLC $\delta$ 4, nos tempos de 48 e 72 horas, em relação às células tratadas com lipofectamina ou com *scramble* siRNA (siSCR). NT: células não-transfectadas e nem tratadas com lipofectamina; Lipo: células tratadas com lipofectamina, o reagente de transfecção; siSCR: células transfectadas com *scramble* siRNA; siPLC $\delta$ 4: células transfectadas com siRNA para PLC $\delta$ 4; Sem soro: células cultivadas em meio DMEM sem soro fetal bovino. ANOVA com teste de comparação múltipla de Bonferroni. \* =  $p < 0,1$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . Foram realizados 3 experimentos independentes.

### **5.2.6. O *knockdown* de PLC $\delta$ 4 leva à parada do ciclo celular**

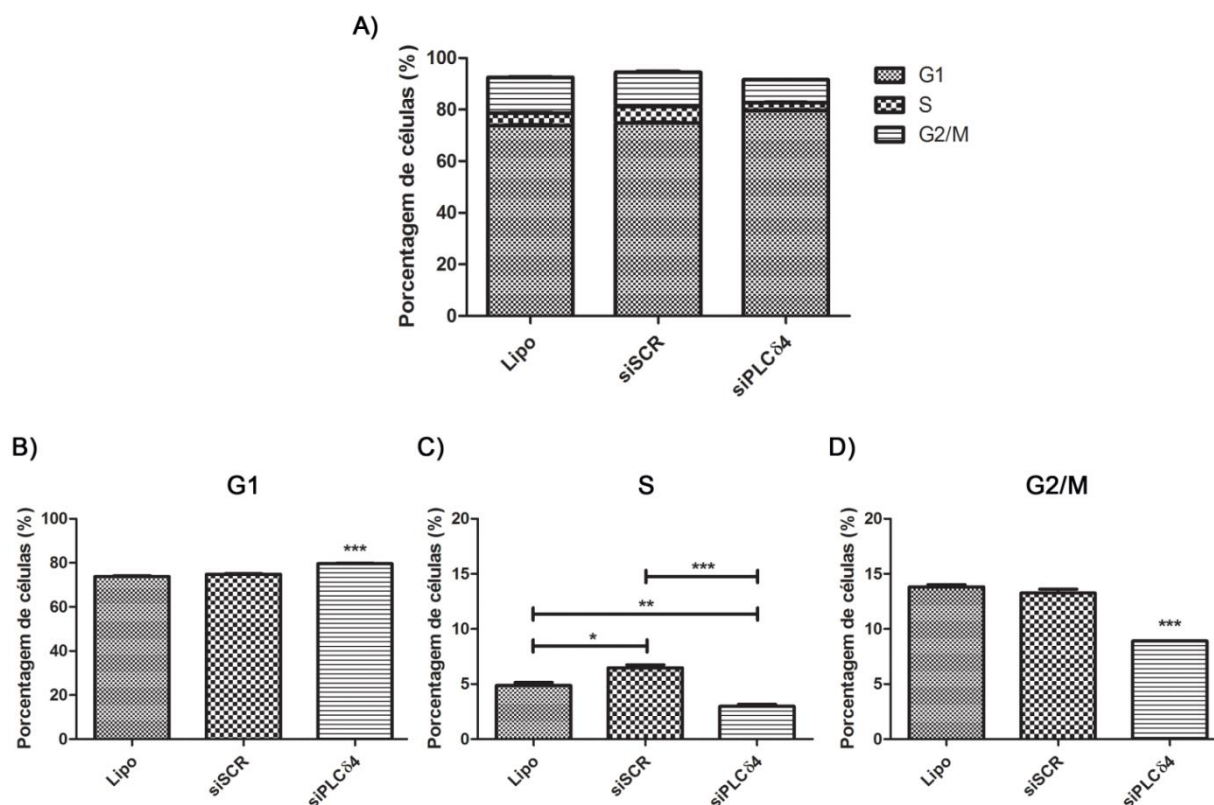
Uma vez que a diminuição do conteúdo de PLC $\delta$ 4 está relacionada à redução do crescimento celular, sem alterar o número de células inviáveis, foi conduzida a análise do perfil do ciclo celular destas células.

Decorridas 48 horas da transfecção, as células-tronco foram tripisinizadas e incubadas com o marcador nuclear To-Pro<sup>®</sup>3, para avaliação no citômetro de fluxo. Os dados foram analisados no *software FlowJo*, sendo gerados histogramas de distribuição das células de acordo com a fase do ciclo celular (G1, S e G2/M). As porcentagens de células em cada fase foram então analisadas. Na figura 21, é possível notar um perfil distinto de distribuição das fases do ciclo celular entre as células siPLC $\delta$ 4 e as células controle. Observa-se um aumento de células hASC siPLC $\delta$ 4 na fase G1 (Figura 21B), e uma diminuição das porcentagens dessas células em S e G2/M (Figura 21C e D), quando comparadas aos controles.

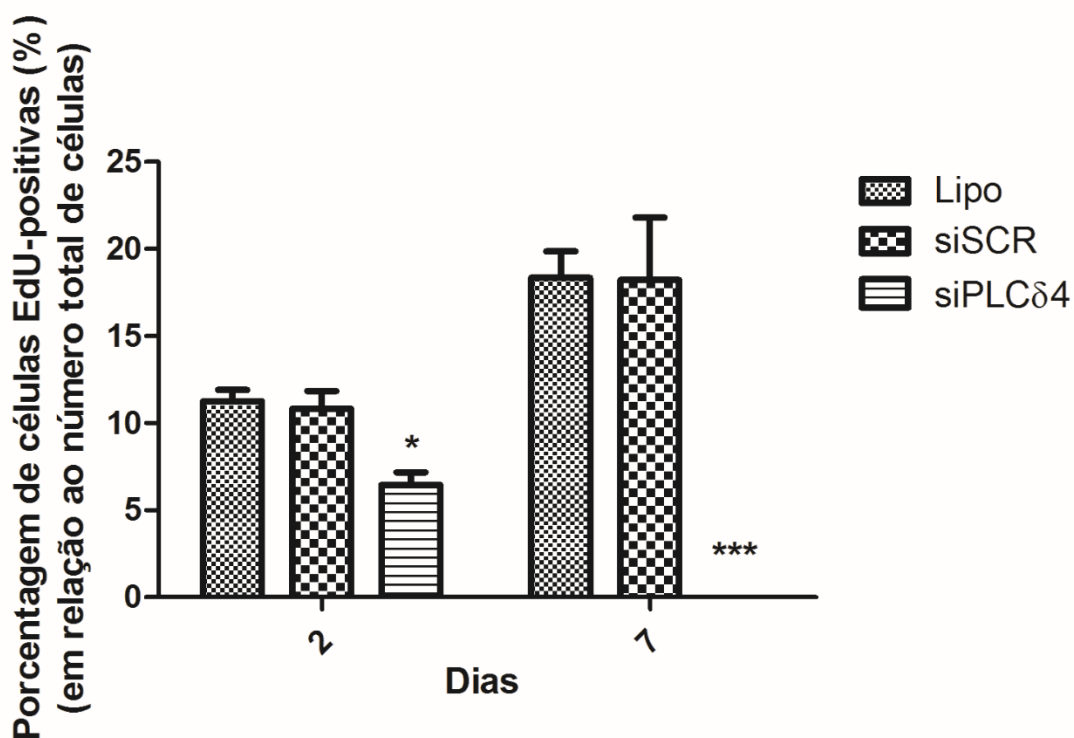
### **5.2.7. siPLC $\delta$ 4 reduz a quantidade de células em interfase e mitose**

Com o objetivo de confirmar os resultados obtidos na análise do perfil do ciclo celular, utilizamos ensaios com sondas específicas para as fases S e M, 5-etinil-2'-deoxiuridina (EdU) e histona H3 fosforilada (pH3), respectivamente. 2 e 7 dias após a transfecção, foram realizadas as marcações com as sondas e a fotodocumentação das células. A sonda Hoescht foi usada como marcador nuclear (Figuras 22 e 23).

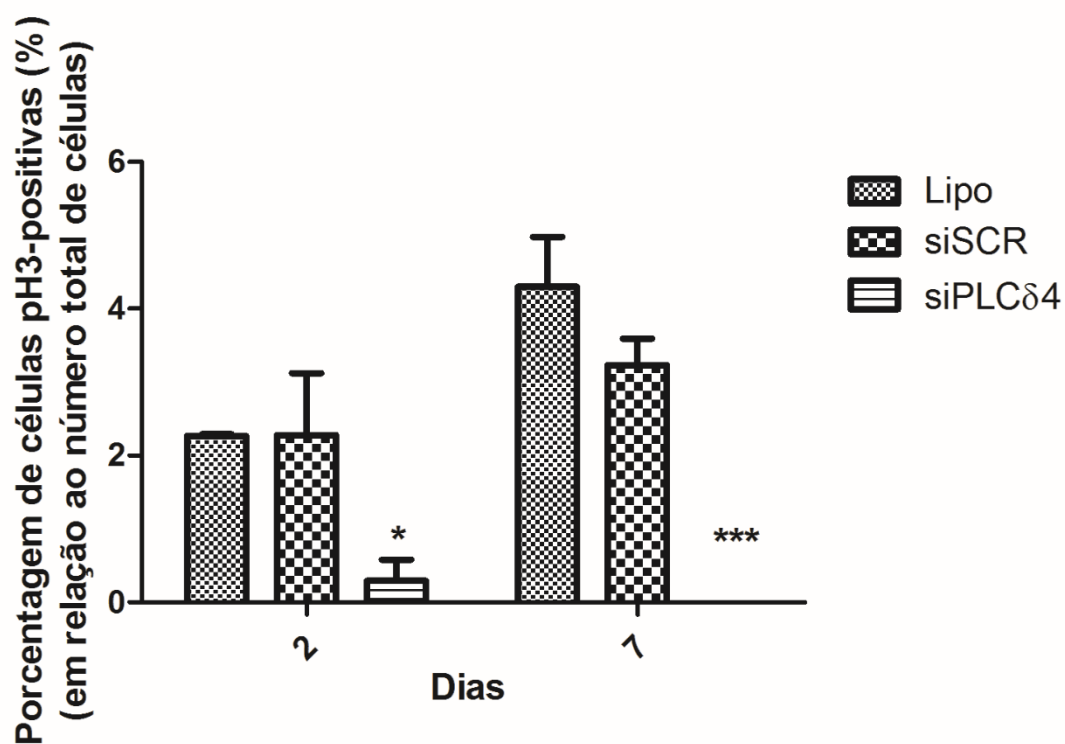
Observa-se que tanto os dados das marcações com EdU (fase S) quanto para pH3 (fase M), houve uma redução de tais marcações em células silenciadas para PLC $\delta$ 4 (Figuras 22 e 23), quando comparadas aos controles, nos dois tempos analisados. Em resumo, os dados indicam que as células *knockdown* para PLC $\delta$ 4 apresentam uma parada do ciclo celular, e que essa parada permanece durante dias após a transfecção com siRNA.



**Figura 21: Diminuição de PLC $\delta$ 4 em células-tronco mesenquimais leva ao aumento do número de células na fase G1 e redução em S e G2/M.** 48 horas após a transfecção, as células foram tripsinizadas, incubadas com o marcador nuclear To-Pro<sup>®</sup>3 e analisadas por citometria de fluxo. **A)** Gráfico mostrando a distribuição das fases do ciclo celular analisadas em todos os grupos amostrais. **B)** Percentagem de células, em relação ao número total de células, na fase G1 do ciclo celular. **C)** Fase S. **D)** Fases G2/M. Foram realizados 3 experimentos independentes e os gráficos apresentados são representativos de um dos ensaios. Lipo: células tratadas com lipofectamina, o reagente de transfecção; siSCR: células transfectadas com scramble siRNA; siPLC $\delta$ 4: células transfectadas com siRNA para PLC $\delta$ 4. One-way ANOVA com teste de comparação múltipla de Bonferroni. \* =  $p < 0,1$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .



**Figura 22: O silenciamento de PLCδ4 reduz a quantidade de células EdU-positivas.** Decorridos 2 ou 7 dias da transfecção, hASC foram incubadas com EdU (marca células em divisão) e Hoescht (marca núcleo das células). O gráfico (representativo de um dos ensaios) mostra as porcentagens de células duplo marcadas com EdU e Hoescht, em relação ao número total de células por campo (marcadas apenas com Hoescht). Houve diferença entre a marcação das células siPLCδ4 e os demais grupos. Lipo: células tratadas com lipofectamina, o reagente de transfecção; siSCR: células transfectadas com *scramble* siRNA; siPLCδ4: células transfectadas com siRNA para PLCδ4. One-way ANOVA com teste de comparação múltipla de Bonferroni. \* =  $p < 0,1$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . n=3.



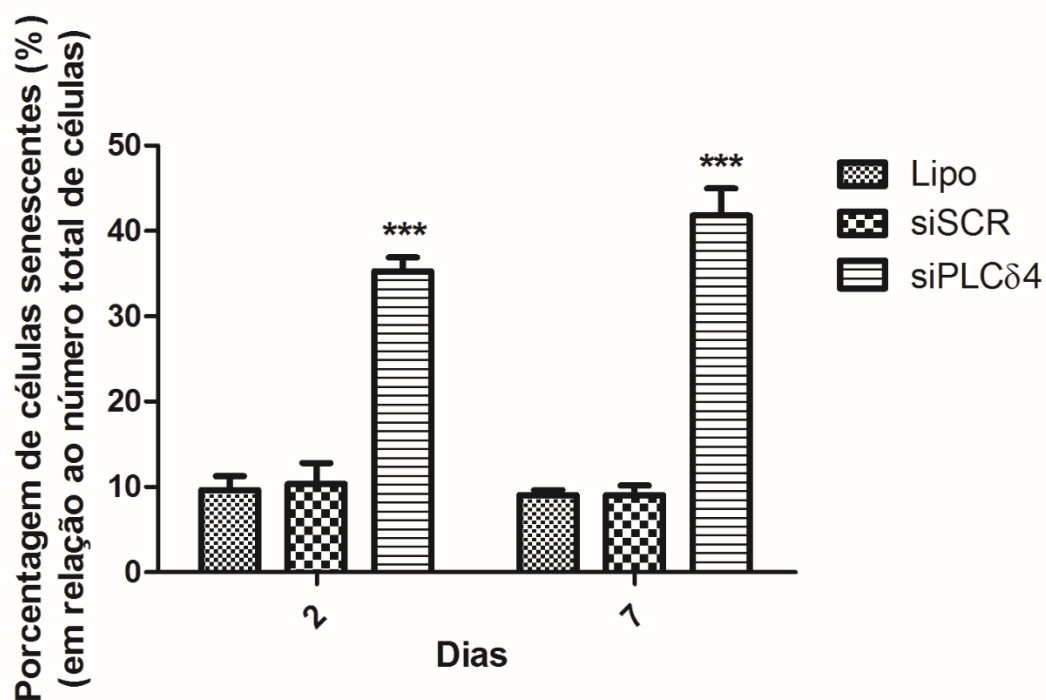
**Figura 23: O silenciamento de PLC $\delta$ 4 reduz a quantidade de células pH3-positivas.** Decorridos 2 ou 7 dias da transfecção, hASC foram incubadas com pH3 (marca células em mitose) e Hoescht (marca núcleo das células). Os gráficos (representativos de um dos ensaios) mostram as porcentagens de células duplo marcadas com pH3 e Hoescht, em relação ao número total de células por campo (marcadas apenas com Hoescht). Houve diferença entre a marcação das células siPLC $\delta$ 4 e os demais grupos. Lipo: células tratadas com lipofectamina, o reagente de transfecção; siSCR: células transfectadas com *scramble* siRNA; siPLC $\delta$ 4: células transfectadas com siRNA para PLC $\delta$ 4. One-way ANOVA com teste de comparação múltipla de Bonferroni. \* =  $p < 0,1$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . n=3.

### **5.2.8. A redução da expressão de *PLC $\delta$ 4* induz a senescência em hASC**

Há várias causas para as células pararem a progressão de seus ciclos celulares, sendo uma delas a senescência. Assim, decidimos investigar se esta seria a causa da parada do ciclo celular observada em hASC siPLC $\delta$ 4. Para tal, o ensaio de  $\beta$ -galactosidase associada à senescência (SA- $\beta$ -Gal) foi utilizado. Em pH 6, células senescentes expressam essa  $\beta$ -galactosidase, cuja atividade pode ser visualizada e mensurada através da adição de X-Gal às células. Caso X-Gal seja hidrolisada pela  $\beta$ -galactosidase, uma cor azul na região perinuclear é gerada (Dimri et al., 1995).

Células-tronco transfectadas foram submetidas ao ensaio de senescência 2 e 7 dias após a transfecção. As células foram fotografadas e para cada campo foram contados o número total de células e o número de células senescentes, gerando gráficos de porcentagem de células senescentes (Figura 24). Tanto para o tempo de 2 dias quanto para 7 dias pós transfecção foi observado um aumento do número de células senescentes no grupo transfectado com siPLC $\delta$ 4, em relação às células controle (Figura 24). Esse resultado apresenta uma possível explicação para a redução do crescimento das células siPLC $\delta$ 4 (Figura 20) e para a parada do ciclo celular das mesmas células (Figuras 21-23).





**Figura 24: O *knockdown* de PLCδ4 aumenta a porcentagem de células senescentes.** Quantificação da marcação das células, 2 dias e 7 dias após a transfecção. O gráfico (representativo de um dos ensaios) mostra as porcentagens de células marcadas em azul (senescentes), em relação ao número total de células por campo. Houve diferença entre o grupo siPLCδ4 e os demais grupos, para os dois tempos analisados. Lipo: células tratadas com lipofectamina, o reagente de transfecção; siSCR: células transfectadas com *scramble* siRNA; siPLCδ4: células transfectadas com siRNA para PLCδ4. One-way ANOVA com teste de comparação múltipla de Bonferroni. \*\*\* =  $p < 0,001$ . n=3.

## 6. DISCUSSÃO

As PI-PLCs são enzimas que clivam  $PIP_2$  em DAG e  $InsP_3$ , gerando cascatas de sinalização intracelular, envolvendo o íon  $Ca^{2+}$ . A sinalização desencadeada por este íon envolve processos de proliferação, diferenciação e morte celular (Berridge et al., 2000). Dessa forma, as PLCs também estão envolvidas nestes processos (Poli et al., 2016).

A PLC $\delta$ 4 é uma isoforma melhor caracterizada em modelos murinos, como ratos e camundongos. Nestes modelos, foi visto que PLC $\delta$ 4 participa de processos proliferativos e que se localiza principalmente no núcleo das células (Fiume et al., 2012; Liu et al., 1996). Porém, várias questões, como a ativação de PLC $\delta$ 4 e a sinalização gerada por esta proteína, permanecem sem respostas. Além disso, a PLC $\delta$ 4 humana (hPLC $\delta$ 4) não foi bem caracterizada, e poderia estar associada a patologias, como várias outras isoformas de PLCs, cujas modificações podem relacionar-se ao desenvolvimento de câncer, doenças neurodegenerativas e mioplasias (Nakamura and Fukami, 2017; Ratti et al., 2017a).

Desse modo, nesta tese foi descrito o envolvimento hPLC $\delta$ 4 em processos de proliferação e diferenciação celulares. Esta caracterização funcional foi conduzida em dois modelos celulares mesenquimais: SK-HEP-1 e hASC. SK-HEP-1 é uma linhagem, bem estabelecida, de células derivadas de adenocarcinoma hepático, que possui características tumorais e mesenquimais, sendo recentemente definidas como células-tronco tumorais. As hASC, por outro lado, são células primárias, isoladas de tecido adiposo proveniente de cirurgias plásticas. Para verificarmos se estávamos isolando corretamente essas células, foram analisadas as características determinadas pela Sociedade Internacional de Terapia Celular, como descrito por Bourin e colaboradores em 2013 (Bourin et al., 2013). Os isolamentos celulares foram bem-sucedidos, uma vez que seguiram os parâmetros estabelecidos pela literatura (Figura 14 e 15).

Em hASC, começamos a caracterização de PLC $\delta$ 4 a partir de um atributo funcional das células-tronco: a capacidade de diferenciação celular. A quantificação de PLC $\delta$ 4 por ensaios de Western Blot, indicou o aumento nos níveis dessa proteína com o passar do tempo de cultivo em meio indutor de diferenciação adipogênica, comparando o sétimo e o vigésimo primeiro dia de diferenciação. Em contrapartida,

na diferenciação osteogênica não houve diferenças estatísticas (Figura 16). O envolvimento de outras isoformas de PLCs nucleares ( $\beta 1$ ,  $\delta 1$  e  $\gamma 1$ ) com processos de diferenciação celular foi recentemente descrito por diversos autores, em vários tipos celulares e tipos de diferenciação, como miogênica, adipogênica, osteogênica, e até mesmo diferenciações hematopoiéticas, como eritróide e mielóide (Cocco et al., 2015; Cocco et al., 2016; Kotani et al., 2015; Kusuyama et al., 2018; O'Carroll et al., 2009; Ramazzotti et al., 2017). Durante muitos anos, a única evidência de que PLCs nucleares poderiam estar envolvidas na diferenciação celular resumia-se ao achado de Cocco e colaboradores, que em 1987 descreveram a relação entre fosfoinosítídeos nucleares e o grau de diferenciação de células hematopoiéticas de ratos (células Friend) (Cocco et al., 1987). Porém, atualmente o estudo específico da relação entre PLCs e diferenciação celular ganhou destaque nos trabalhos dos grupos de pesquisa, como citado acima. A isoforma de PLC melhor caracterizada dentre todas as proteínas da família PI-PLC, a  $\beta 1$ , por exemplo, teve sua expressão avaliada em células-tronco hematopoiéticas e em células-tronco mesenquimais submetidas a diferentes tipos de diferenciações (Ratti et al., 2017a). Células-tronco hematopoiéticas apresentaram uma redução de PLC $\beta 1$  nas células que passaram por diferenciação eritróide, enquanto que na diferenciação mielóide ocorreu um aumento na expressão dessa proteína. Para células-tronco mesenquimais, houve um aumento de expressão de PLC $\beta 1$  nas células induzidas para adipogênese, osteogênese e miogênese. Esses dados mostram que uma mesma isoforma de PLC pode ter diferentes modulações em distintos tipos celulares e tipos de diferenciação. Para melhor caracterizarmos o envolvimento de PLC $\delta 4$  com a diferenciação celular em hASC, pretendemos usar RNA de interferência para a sequência de PLC $\delta 4$ , e avaliar, por PCR quantitativa em tempo real (qPCR), a expressão de marcadores de adipogênese e/ou osteogênese após o período de diferenciação.

O estudo da localização subcelular de PLC $\delta 4$  em hASC por imunofluorescência indicou sua predominância nuclear, como observado na Figura 17. Essa localização assemelha-se à descrita para a proteína em outro tipo celular, SK-HEP-1 (De Angelis et al., Anexo 8.6), e em outros organismos, como em células hepáticas de ratos (Liu et al., 1996) e células de camundongo (Fiume et al., 2012). Foram encontrados sinais de exportação do núcleo e sinais de localização nuclear

na sequência proteica de hPLC $\delta$ 4 (Anexo 8.4, Figura 27), o que corrobora o que foi observado por imunofluorescência.

Outro resultado obtido neste trabalho que corrobora a localização nuclear de hPLC $\delta$ 4 é o de fracionamento celular (Figura 18). Pode-se observar que há PLC $\delta$ 4 tanto na fração proteica nuclear quanto na fração não-nuclear, em quantidades aparentemente similares em ambas as frações. Como adicionamos quantidades iguais de proteína de ambas as frações e o núcleo representa uma pequena parte da célula, pode-se hipotetizar que PLC $\delta$ 4 estaria em maior quantidade (analisando-se a quantidade de proteína por área) no núcleo do que no restante da célula. Além disso, é esperado a presença desta proteína na fração não-nuclear devido ao seu processo de tradução.

A presença de PLC $\delta$ 4 no núcleo e na porção não-nuclear das células-tronco poderia ser explicada pela existência, na sequência proteica de PLC $\delta$ 4, de NLS e NES, ou pela existência de mais de uma variante desta proteína, sendo uma predominantemente nuclear e outra citoplasmática. Para PLC $\delta$ 1 de cães, Yamaga e colaboradores (1999) (Yamaga et al., 1999) descreveram a existência de apenas uma variante, cuja localização nuclear ou citoplasmática era determinada pela ativação de uma sequência NES, que mais tarde descobriram ser ativada por sinais de Ca<sup>2+</sup> (Okada et al., 2005). Para PLC $\beta$ 1 humana, existem duas variantes da proteína, PLC $\beta$ 1a (citoplasmática; 150kDa) e PLC $\beta$ 1b (nuclear; 140kDa), que diferem entre si na porção C-terminal, na localização, e no fato de que PLC $\beta$ 1a possui NES (Bahk et al., 1998; Follo et al., 2006). Como descrito anteriormente, foram encontradas sequências NLS e NES na sequência de PLC $\delta$ 4, e no banco de dados do GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) há três variantes anotadas da proteína (Anexo 8.5, Figura 28). Duas variantes diferem entre si por apenas adição/deleção de três resíduos de aminoácidos, que não estão em regiões de NLS ou NES, mas uma terceira variante difere das demais por possuir apenas metade do número de aminoácidos que as outras variantes possuem. Essa perda de aminoácidos pela terceira variante faz com que ela apresente apenas o domínio X-Box e parte do domínio Y-Box de fosfolipases específicas para fosfoinosítídeos (Anexo 8.5, Figura 28). Dessa forma, as evidências sugerem que hPLC $\delta$ 4 encaixe-se no caso de uma única variante, que permanece no núcleo até que sua NES seja reconhecida e assegure seu transporte para o citoplasma e para a membrana

plasmática. Mais estudos precisam ser realizados para sustentar esta proposição, como por exemplo, a sequência consenso NES de hPLC $\delta$ 4 poderia ser mutada e então poderia ser analisado o efeito desta mutação na compartimentalização desta proteína.

O experimento de fracionamento celular, além de mostrar que PLC $\delta$ 4 pode estar localizada na fração não-nuclear, evidencia que os dois grupos de proteína respondem igualmente, em termos de expressão de PLC $\delta$ 4, ao estímulo com EGF (Figura 18). A partir de 30 minutos de estímulo com EGF, observa-se um aumento dos níveis de PLC $\delta$ 4, na fração nuclear e na fração não-nuclear. Este aumento é similar para as duas frações, indicando que não ocorre transporte da proteína entre os compartimentos celulares após estímulo com EGF. Na tese da aluna Ana Carolina de Angelis (2014) (De Angelis, 2014), foi reportado que em SK-HEP-1 também não ocorrem efeitos na translocação de PLC $\delta$ 4 pelo estímulo com EGF. O aumento de expressão de PLC $\delta$ 4 após estímulo com EGF, bem como os resultados De Angelis et al. (Anexo 8.6), em que o estímulo com EGF leva à redução de PIP<sub>2</sub> nuclear em SK-HEP-1, indicam uma possível interação entre EGFR nuclear e PLC $\delta$ 4 em células humanas. Esta interação não deve ser de forma direta, pois foram feitos ensaios de imunoprecipitação e *Proximity Ligation Assay* (Duolink<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich; com este kit é possível detectar interações entre duas proteínas através da amplificação de sondas de oligonucleotídeos que geram um amplicon circular, que pode ser observado por microscopia de fluorescência), nos quais não foram obtidos resultados positivos para a interação entre EGFR e PLC $\delta$ 4 (dados não mostrados). Além disso, o domínio SH2, que em PLC $\gamma$ 1 é responsável pela interação com EGFR, que ativa esta isoforma de fosfolipase C pela fosforilação de resíduos de tirosina, não está presente em PLC $\delta$ 4 (Vega et al., 1992). Interessantemente, o gene de *PLC $\delta$ 4* murino apresenta a ativação da sua região promotora por fatores de crescimento, como insulina (Fukami et al., 2000). Coletivamente, esses dados apontam para uma modulação indireta de hPLC $\delta$ 4 por EGFR, possivelmente envolvendo uma regulação transcricional ou pós-transcricional.

Apesar de não ocorrer translocação de PLC $\delta$ 4, o receptor de EGF (EGFR), após estímulo com seu ligante EGF, transloca para o núcleo, como pode ser observado pelo aumento dos níveis de EGFR nuclear após 40 minutos de estímulo, enquanto que os níveis de EGFR não-nuclear não se alteram com o tempo de

estímulo (Figura 18). A translocação nuclear de EGFR após estímulo com EGF e outros ligantes é um fenômeno que foi bem descrito pelo nosso grupo de pesquisa em células SK-HEP-1 ((Faria et al., 2016); De Angelis et al., Anexo 8.6) e em hASC (Faraco et al., 2017) e por isso foi utilizado como controle de estímulo com EGF neste trabalho.

A técnica de RNA de interferência (siRNA) foi utilizada neste trabalho para acessar a função de PLC $\delta$ 4 em células SK-HEP-1 e em células-tronco mesenquimais (Figuras 10 e 19).

Ensaio de curvas de crescimento das células SK-HEP-1 e hASC silenciadas para PLC $\delta$ 4 indicaram um crescimento menor destas em relação aos controles (Figuras 10 e 20). Essa redução no crescimento poderia ser explicada por um aumento na morte celular, que reduziria o número de células viáveis, ou por uma parada no ciclo celular, que faria com que as células parassem de proliferar. A primeira hipótese foi descartada, uma vez que não foi observado aumento na morte celular para SK-HEP-1 e hASC *knockdown* para PLC $\delta$ 4 (Figura 11 e marcação com azul de Tripán para hASC, Figura 20B). Entretanto, para os dois tipos celulares foi observada parada do ciclo celular das células silenciadas para PLC $\delta$ 4 (Figuras 12 e 21). Para hASC, esta parada provavelmente ocorreu em função da entrada das células no estágio de senescência (Figura 24), no qual as células, mesmo estando metabolicamente ativas, não se dividem (Althubiti et al., 2014).

A relação entre PLCs nucleares e a regulação do ciclo celular é bem descrita na literatura (Kaproth-Joslin et al., 2008) (Poli et al., 2016; Ratti et al., 2017a; Ratti et al., 2017b). Em 2003, em sua revisão sobre lipídeos e sinalização nuclear, Irvine já destacava a conexão entre as oscilações de lipídeos nucleares e a progressão do ciclo celular (Irvine, 2003). O ciclo celular pode ser definido como uma série de etapas que se sucedem, levando à divisão celular, ou seja, à geração de novas células. Em cada uma dessas etapas há moléculas responsáveis pela regulação do prosseguimento do ciclo celular, como ciclinas, CDKs (cinases dependentes de ciclinas), pRB (proteína retinoblastoma) e inibidores Cip/Kip (p16, p21 e p27) (Bloom and Cross, 2007). Desse modo, as PLCs interferem no ciclo celular através da interação ou da sinalização com estas moléculas regulatórias.

A isoforma nuclear de hPLC $\beta$ 1, hPLC $\beta$ 1b, possui picos de expressão nas transições G1/S e G2/M (Ratti et al., 2017b). Um dos mediadores da modulação do ciclo celular é o diacilglicerol (DAG) gerado como produto da atividade enzimática de PLC $\beta$ 1b sobre PIP $_2$ . O DAG, na transição G1/S, ativa o complexo ciclina D3-CDK4, mas na progressão G2/M o DAG leva à translocação de PKC $\alpha$  e ciclina B1 para o núcleo. Em fibroblastos de ratos, diferentemente de PLC $\beta$ 1, a superexpressão de PLC $\gamma$ 1 promove a síntese de DNA de forma independente da atividade de lipase (Smith et al., 1994). Para PLC $\delta$ 1 de ratos, Kaproth-Joslin e colaboradores, em 2008, utilizando shRNA (*short hairpin RNA*), descreveram a redução da proliferação de células Rat-1 e NIH 3T3 após o silenciamento de PLC $\delta$ 1, sem aumento de morte celular e com alteração na transição G1/S, devido à redução da atividade do complexo ciclina E-CDK2, mas sem alteração do complexo ciclina D-CDK4 (Kaproth-Joslin et al., 2008). Os autores, porém, não observaram um aumento da senescência, como visto em nosso trabalho (Figura 24). Na linhagem SK-HEP-1, observamos uma redução na expressão das ciclinas A (fase S), B1 (G2/M) e H (regulatória, envolvida em todas as fases do ciclo celular) em células com redução do conteúdo de PLC $\delta$ 4 (Figura 13). Esse resultado corrobora o perfil do ciclo celular destas células (Figura 12), com o aumento no número de células siPLC $\delta$ 4 em G1 e G2/M, indicando uma parada do ciclo entre G2/M e G1. Uma melhor caracterização das moléculas envolvidas nesta parada é necessária para determinarmos com precisão em qual ponto do ciclo celular as células estão acumuladas.

Para PLC $\delta$ 4, há estudos com células de ratos e células humanas tumorais. No caso de PLC $\delta$ 4 de ratos, foi observado que essa proteína, predominantemente nuclear, tem um aumento significativo em sua expressão na transição G1/S, e esse aumento permanece até o final da fase M, mas quando a célula entra em uma nova fase G1, a expressão de PLC $\delta$ 4 praticamente desaparece (Liu et al., 1996). Em fígados regenerativos de ratos (que passaram por hepatectomia parcial), foi descrito um aumento das atividades de PLC $\delta$ 4 e das PKCs  $\alpha$  e  $\epsilon$  em animais PLC $\delta$ 4 $^{+/+}$  na transição G1/S, o que não ocorreu em ratos PLC $\delta$ 4 $^{-/-}$  (Akutagawa et al., 2006). Nossos resultados de ciclo celular corroboram esses achados, uma vez que a redução dos níveis de PLC $\delta$ 4 levou à interrupção da progressão de G1 para S, tanto para SK-HEP-1 quanto para hASC (Figuras 12 e 21). No caso de hASC, a redução da marcação de EdU (fase S) e pH3 (mitose) (Figuras 22 e 23) para células siPLC $\delta$ 4

é um indicativo da inibição da progressão do ciclo a partir da fase G1. Além disso, essa resposta inibitória mantém-se estabilizada, uma vez que mesmo decorridos 7 dias do evento da transfecção, os níveis de EdU e pH3 permanecem baixos nas células siPLC $\delta$ 4.

Também foi observado para as células de ratos que a expressão de PLC $\delta$ 4 poderia ser estimulada pela adição de soro às células, indicando que fatores mitogênicos podem induzir sua expressão (Liu et al., 1996). Um desses fatores poderia ser EGF, o que se assemelha ao que foi observado no fracionamento de hASC após estímulo com EGF (Figura 18), em que a expressão de PLC $\delta$ 4 aumenta com o estímulo. A superexpressão de hPLC $\delta$ 4 em uma linhagem de células de câncer de mama, MCF-7, levou à ativação de PKC $\phi$  e à superexpressão dos receptores EGFR/erbB1 e HER2/erbB2, que ativaram constitutivamente a via ERK1/2 (Leung et al., 2004).

Em relação ao aumento da porcentagem de células senescentes em células hASC *knockdown* para PLC $\delta$ 4 (Figura 24), não foi encontrado na literatura a descrição de eventos similares para PLCs. Entretanto, em células de câncer de mama humano, BT474 e MCF-7, foi observado que o silenciamento de PIP4K (cinase que fosforila PI4P, gerando PIP $_2$ ) levou ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células, direcionando-as para senescência (Emerling et al., 2013). A senescência celular é um estado em que as células param de se dividir, levando a um perfil de resistência à apoptose, frequentemente com aumento da síntese de proteínas, aumento do metabolismo glicolítico, redução da oxidação de ácidos graxos, aumento de EROs e aumento da secreção de fatores associados à senescência (SASP) (Kirkland and Tchkonja, 2017). Geralmente, a combinação de mais de um ensaio é necessária para a confirmação da senescência celular, e existem vários ensaios que podem ser realizados: SA- $\beta$ -Gal, avaliar a expressão de p16<sup>INK4A+</sup> e de p21<sup>Cip1</sup> (moléculas envolvidas na regulação do ciclo celular e com expressão aumentada nas células senescentes), ou de fatores SASP (fenótipo secretório de células senescentes, como metaloproteinases e IL-6), focos de danos ao DNA ( $\gamma$ H2.AX), DAMPS (*Damage associated molecular pattern*; padrão de moléculas associadas a dano, como localização de HMGB-1), entre outras abordagens (Kirkland and Tchkonja, 2017). Assim, pretendemos medir a expressão



de *p16<sup>INK4A+</sup>* e de *p21<sup>Cip1</sup>* por PCR quantitativa em tempo real nas células hASC transfectadas com siPLC $\delta$ 4 para sustentar o ensaio de SA- $\beta$ -Gal (Figura 24). A senescência de células siPLC $\delta$ 4, observada a partir de 2 dias da transfecção, poderia explicar os efeitos não transitórios vistos na redução do crescimento celular (Figura 20) e na redução dos níveis de EdU e pH3 (Figuras 22 e 23), os quais permaneceram reduzidos em relação aos controles mesmo 7 dias após a transfecção. O silenciamento de PLC $\delta$ 4 modifica o metabolismo celular a partir do momento em que o siRNA é adicionado às células e essa modificação é mantida mesmo com a retirada do siRNA, mostrando que os efeitos da redução de PLC $\delta$ 4 parecem ser persistentes.

Analisando-se os dados conjuntamente, pode-se concluir que as diferentes famílias e isoformas de PI-PLCs estão envolvidas com a proliferação e a diferenciação celular, mas os mecanismos de regulação destes fenômenos diferem entre as famílias e entre as isoformas de PLCs e às vezes dependem até mesmo do tipo celular utilizado. Ademais, como a atividade das PLCs está relacionada a processos centrais para a fisiologia celular, defeitos na expressão ou na atividade das mesmas estão associados a patologias.

O envolvimento da forma nuclear de PLC $\beta$ 1 em Síndromes Mielodisplásicas (SMD) é bem descrito. SMD são um grupo heterogêneo de patologias que afetam as células hematopoiéticas e podem levar a neutropenia, hemorragia, infecções e anemia (Ratti et al., 2017a). Pacientes com alto risco de desenvolverem leucemia mielóide aguda derivada de SMD possuem expressão reduzida de PLC $\beta$ 1 nuclear, sendo esta enzima um possível marcador da progressão de SMD (Ratti et al., 2017a).

Disfunções em PLC $\zeta$  e PLC $\delta$ 1-4 foram relacionadas com infertilidade e letalidade embrionária. Amostras de espermatozoides de homens inférteis que possuíam alterações na quantidade e na qualidade de PLC $\zeta$  falharam na indução de oscilações de Ca<sup>2+</sup> (geradas pela atividade da PLC), e, portanto, na ativação do ovócito (Amdani et al., 2016). Em camundongos, PLC $\delta$ 4 mostrou-se necessária para a mobilização de Ca<sup>2+</sup> essencial para a reação acrossômica (Fukami et al., 2003). Camundongos duplo-nocaute para PLC $\delta$ 1 e PLC $\delta$ 3 resultaram em letalidade embrionária, devido à malformação da placenta (Nakamura et al., 2005).

Defeitos na sinalização de qualquer PI-PLC, potencialmente, poderiam levar ao desenvolvimento de tumores, uma vez que estas enzimas participam do controle do ciclo celular. Leung e colaboradores, em 2004, analisaram amostras pareadas de cDNAs humanos de tumores e de células normais e observaram que hPLC $\delta$ 4 era superexpressa nos tecidos derivados de cânceres de mama e testiculares (Leung et al., 2004). Além disso, descreveram que a superexpressão de PLC $\delta$ 4 levou à proliferação mais rápida de células MCF-7 em meio sem soro, à formação de colônias em *soft* ágar e à formação de esferoides densamente compactados, em placas de baixa aderência, indicando um possível papel de hPLC $\delta$ 4 na oncogênese.

Em suma, esse trabalho fornece evidências para o papel funcional da hPLC $\delta$ 4 nas células mesenquimais tumorais e tronco. Esta fosfolipase C predominantemente nuclear sinaliza para respostas efetivas que induzem a proliferação e diferenciação celular. Configura-se como perspectiva de estudo a sinalização gerada por hPLC $\delta$ 4, respondendo os seguintes questionamentos: como hPLC $\delta$ 4 é ativada?; Onde hPLC $\delta$ 4 localiza-se no núcleo celular?; Quais são as vias de sinalização ativadas por hPLC $\delta$ 4?; hPLC $\delta$ 4 está envolvida na gênese de alguma doença?.

## 7. REFERÊNCIAS

Akutagawa, A., Fukami, K., Banno, Y., Takenawa, T., Kannagi, R., Yokoyama, Y., Oda, K., Nagino, M., Nimura, Y., Yoshida, S., Tamiya-Koizumi, K., 2006. Disruption of phospholipase Cdelta4 gene modulates the liver regeneration in cooperation with nuclear protein kinase C. *Journal of biochemistry* 140, 619-625.

Althubiti, M., Lezina, L., Carrera, S., Jukes-Jones, R., Giblett, S.M., Antonov, A., Barlev, N., Saldanha, G.S., Pritchard, C.A., Cain, K., Macip, S., 2014. Characterization of novel markers of senescence and their prognostic potential in cancer. *Cell death & disease* 5, e1528.

Amdani, S.N., Yeste, M., Jones, C., Coward, K., 2016. Phospholipase C zeta (PLCzeta) and male infertility: Clinical update and topical developments. *Advances in biological regulation* 61, 58-67.

Arteaga, C.L., 2003. EGF receptor as a therapeutic target: patient selection and mechanisms of resistance to receptor-targeted drugs. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 21, 289s-291s.

Asano, M., Tamiya-Koizumi, K., Homma, Y., Takenawa, T., Nimura, Y., Kojima, K., Yoshida, S., 1994. Purification and characterization of nuclear phospholipase C specific for phosphoinositides. *The Journal of biological chemistry* 269, 12360-12366.

Bahk, Y.Y., Song, H., Baek, S.H., Park, B.Y., Kim, H., Ryu, S.H., Suh, P.G., 1998. Localization of two forms of phospholipase C-beta1, a and b, in C6Bu-1 cells. *Biochimica et biophysica acta* 1389, 76-80.

Berridge, M.J., 2002. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell calcium* 32, 235-249.

Berridge, M.J., Bootman, M.D., Roderick, H.L., 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 4, 517-529.

Berridge, M.J., Irvine, R.F., 1984. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312, 315-321.

Berridge, M.J., Lipp, P., Bootman, M.D., 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 1, 11-21.

Bloom, J., Cross, F.R., 2007. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 149-160.

Bootman, M.D., Fearnley, C., Smyrniak, I., MacDonald, F., Roderick, H.L., 2009. An update on nuclear calcium signalling. *Journal of cell science* 122, 2337-2350.

Bourin, P., Bunnell, B.A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A.J., March, K.L., Redl, H., Rubin, J.P., Yoshimura, K., Gimble, J.M., 2013. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* 15, 641-648.

Brameier, M., Krings, A., MacCallum, R.M., 2007. NucPred--predicting nuclear localization of proteins. *Bioinformatics* 23, 1159-1160.

Brand, T.M., Iida, M., Luthar, N., Starr, M.M., Huppert, E.J., Wheeler, D.L., 2013. Nuclear EGFR as a molecular target in cancer. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 108, 370-377.

Caplan, A.L., 2007. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *Journal of cellular physiology* 213, 341-347.

Carlson, R.L., Ben-Porath, E., Shouval, D., Strauss, W., Isselbacher, K.J., Wands, J.R., 1985. Antigenic characterization of human hepatocellular carcinoma. Development of in vitro and in vivo immunoassays that use monoclonal antibodies. *The Journal of clinical investigation* 76, 40-51.

Carpenter, G., Cohen, S., 1978. Human epidermal growth factor: binding of the polypeptide to human fibroblasts and stimulation of cell proliferation. *National Cancer Institute monograph*, 149-156.

Catterton, W.Z., Escobedo, M.B., Sexson, W.R., Gray, M.E., Sundell, H.W., Stahlman, M.T., 1979. Effect of epidermal growth factor on lung maturation in fetal rabbits. *Pediatric research* 13, 104-108.

Chae, S.W., Kim, J.M., Yun, Y.P., Lee, W.K., Kim, J.S., Kim, Y.H., Lee, K.S., Ko, Y.J., Lee, K.H., Rha, H.K., 2007. Identification and analysis of the promoter region of the human PLC-delta4 gene. *Molecular biology reports* 34, 69-77.

Cocco, L., Finelli, C., Mongiorgi, S., Clissa, C., Russo, D., Bosi, C., Quaranta, M., Malagola, M., Parisi, S., Stanzani, M., Ramazzotti, G., Mariani, G.A., Billi, A.M., Manzoli, L., Follo, M.Y., 2015. An increased expression of PI-PLCbeta1 is associated with myeloid differentiation and a longer response to azacitidine in myelodysplastic syndromes. *Journal of leukocyte biology* 98, 769-780.

Cocco, L., Gilmour, R.S., Ognibene, A., Letcher, A.J., Manzoli, F.A., Irvine, R.F., 1987. Synthesis of polyphosphoinositides in nuclei of Friend cells. Evidence for polyphosphoinositide metabolism inside the nucleus which changes with cell differentiation. *The Biochemical journal* 248, 765-770.

Cocco, L., Manzoli, L., Faenza, I., Ramazzotti, G., Yang, Y.R., McCubrey, J.A., Suh, P.G., Follo, M.Y., 2016. Modulation of nuclear PI-PLC $\beta$ 1 during cell differentiation. *Advances in biological regulation* 60, 1-5.

Corpet, F., 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic acids research* 16, 10881-10890.

De Angelis, A.C.C., 2014. "Regulação do cálcio nuclear pelo receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR)." Tese defendida pelo Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Imunologia, ICB-UFMG.

Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., et al., 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 9363-9367.

Echevarria, W., Leite, M.F., Guerra, M.T., Zipfel, W.R., Nathanson, M.H., 2003. Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nature cell biology* 5, 440-446.

Emerling, B.M., Hurov, J.B., Poulgiannis, G., Tsukazawa, K.S., Choo-Wing, R., Wulf, G.M., Bell, E.L., Shim, H.S., Lamia, K.A., Rameh, L.E., Bellinger, G., Sasaki, A.T., Asara, J.M., Yuan, X., Bullock, A., Denicola, G.M., Song, J., Brown, V., Signoretti, S., Cantley, L.C., 2013. Depletion of a putatively druggable class of phosphatidylinositol kinases inhibits growth of p53-null tumors. *Cell* 155, 844-857.

Eun, J.R., Jung, Y.J., Zhang, Y., Zhang, Y., Tschudy-Seney, B., Ramsamooj, R., Wan, Y.J., Theise, N.D., Zern, M.A., Duan, Y., 2014. Hepatoma SK Hep-1 cells exhibit characteristics of oncogenic mesenchymal stem cells with highly metastatic capacity. *PloS one* 9, e110744.

Faenza, I., Fiume, R., Piazzini, M., Colantoni, A., Cocco, L., 2013. Nuclear inositide specific phospholipase C signalling - interactions and activity. *The FEBS journal* 280, 6311-6321.

Faraco, C.C.F., Faria, J., Lima, M.K., de Miranda, M.C., de Melo, M.I.A., da Fonseca Ferreira, A., Rodrigues, M.A., Gomes, D.A., 2017. 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. *Journal of structural biology*.

Faria, J., de Andrade, C., Goes, A.M., Rodrigues, M.A., Gomes, D.A., 2016. Effects of different ligands on epidermal growth factor receptor (EGFR) nuclear translocation. *Biochemical and biophysical research communications* 478, 39-45.

Fedorenko, O.A., Popugaeva, E., Enomoto, M., Stathopoulos, P.B., Ikura, M., Bezprozvanny, I., 2014. Intracellular calcium channels: inositol-1,4,5-trisphosphate receptors. *European journal of pharmacology* 739, 39-48.

Fiume, R., Ramazzotti, G., Faenza, I., Piazzzi, M., Bavelloni, A., Billi, A.M., Cocco, L., 2012. Nuclear PLCs affect insulin secretion by targeting PPARgamma in pancreatic beta cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26, 203-210.

Fogh, J., Trempe, G., 1975. New human tumor cell lines, in: Fogh, J. (Ed.), *Human Tumor Cells in Vitro*. Springer, Boston, MA, Boston, MA.

Follo, M.Y., Bosi, C., Finelli, C., Fiume, R., Faenza, I., Ramazzotti, G., Gaboardi, G.C., Manzoli, L., Cocco, L., 2006. Real-time PCR as a tool for quantitative analysis of PI-PLCbeta1 gene expression in myelodysplastic syndrome. *International journal of molecular medicine* 18, 267-271.

Fujii, M., Yi, K.S., Kim, M.J., Ha, S.H., Ryu, S.H., Suh, P.G., Yagisawa, H., 2009. Phosphorylation of phospholipase C-delta 1 regulates its enzymatic activity. *Journal of cellular biochemistry* 108, 638-650.

Fukami, K., Takenaka, K., Nagano, K., Takenawa, T., 2000. Growth factor-induced promoter activation of murine phospholipase C delta4 gene. *European journal of biochemistry* 267, 28-36.

Fukami, K., Yoshida, M., Inoue, T., Kurokawa, M., Fissore, R.A., Yoshida, N., Mikoshiba, K., Takenawa, T., 2003. Phospholipase Cdelta4 is required for Ca<sup>2+</sup> mobilization essential for acrosome reaction in sperm. *The Journal of cell biology* 161, 79-88.

Gomes, D.A., Rodrigues, M.A., Leite, M.F., Gomez, M.V., Varnai, P., Balla, T., Bennett, A.M., Nathanson, M.H., 2008. c-Met must translocate to the nucleus to initiate calcium signals. *The Journal of biological chemistry* 283, 4344-4351.

Gomez-Ospina, N., Tsuruta, F., Barreto-Chang, O., Hu, L., Dolmetsch, R., 2006. The C terminus of the L-type voltage-gated calcium channel Ca(V)1.2 encodes a transcription factor. *Cell* 127, 591-606.

Hardingham, G.E., Chawla, S., Johnson, C.M., Bading, H., 1997. Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature* 385, 260-265.

Heffelfinger, S.C., Hawkins, H.H., Barrish, J., Taylor, L., Darlington, G.J., 1992. SK HEP-1: a human cell line of endothelial origin. *In vitro cellular & developmental biology : journal of the Tissue Culture Association* 28A, 136-142.

Hsu, S.C., Miller, S.A., Wang, Y., Hung, M.C., 2009. Nuclear EGFR is required for cisplatin resistance and DNA repair. *American journal of translational research* 1, 249-258.

Huang, W.C., Chen, Y.J., Li, L.Y., Wei, Y.L., Hsu, S.C., Tsai, S.L., Chiu, P.C., Huang, W.P., Wang, Y.N., Chen, C.H., Chang, W.C., Chang, W.C., Chen, A.J., Tsai, C.H., Hung, M.C., 2011. Nuclear translocation of epidermal growth factor receptor by Akt-dependent phosphorylation enhances breast cancer-resistant protein expression in gefitinib-resistant cells. *The Journal of biological chemistry* 286, 20558-20568.

Humeau, J., Bravo-San Pedro, J.M., Vitale, I., Nunez, L., Villalobos, C., Kroemer, G., Senovilla, L., 2017. Calcium signaling and cell cycle: Progression or death. *Cell calcium*.

Hynes, N.E., Lane, H.A., 2005. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature reviews. Cancer* 5, 341-354.

Irvine, R.F., 2003. Nuclear lipid signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 4, 349-360.

Jaganathan, S., Yue, P., Paladino, D.C., Bogdanovic, J., Huo, Q., Turkson, J., 2011. A functional nuclear epidermal growth factor receptor, SRC and Stat3 heteromeric complex in pancreatic cancer cells. *PloS one* 6, e19605.

Kaproth-Joslin, K.A., Li, X., Reks, S.E., Kelley, G.G., 2008. Phospholipase C delta 1 regulates cell proliferation and cell-cycle progression from G1- to S-phase by control of cyclin E-CDK2 activity. *The Biochemical journal* 415, 439-448.

Kim, H., Suh, P.G., Ryu, S.H., Park, S.H., 1999a. Assignment of the human PLC delta4 gene (PLCD4) to human chromosome band 2q35 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenetics and cell genetics* 87, 254-255.

Kim, J.K., Choi, J.W., Lim, S., Kwon, O., Seo, J.K., Ryu, S.H., Suh, P.G., 2011. Phospholipase C- $\epsilon$ 1 is activated by intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization and enhances GPCRs/PLC/ $\text{Ca}^{2+}$  signaling. *Cellular signalling* 23, 1022-1029.

Kim, Y.H., Park, T.J., Lee, Y.H., Baek, K.J., Suh, P.G., Ryu, S.H., Kim, K.T., 1999b. Phospholipase C- $\delta$ 1 is activated by capacitative calcium entry that follows phospholipase C- $\beta$  activation upon bradykinin stimulation. *The Journal of biological chemistry* 274, 26127-26134.

Kirkland, J.L., Tchkonja, T., 2017. Cellular Senescence: A Translational Perspective. *EBioMedicine* 21, 21-28.

Klein, C., Gensburger, C., Freyermuth, S., Nair, B.C., Labourdette, G., Malviya, A.N., 2004. A 120 kDa nuclear phospholipase C $\gamma$ 1 protein fragment is stimulated in vivo by EGF signal phosphorylating nuclear membrane EGFR. *Biochemistry* 43, 15873-15883.

Kotani, M., Matsuda, M., Murakami, A., Takahashi, I., Katagiri, T., Hirata, M., 2015. Involvement of PRIP (Phospholipase C-Related But Catalytically Inactive Protein) in BMP-Induced Smad Signaling in Osteoblast Differentiation. *Journal of cellular biochemistry* 116, 2814-2823.

Kusuyama, J., Kamisono, A., ChangHwan, S., Amir, M.S., Bandow, K., Eiraku, N., Ohnishi, T., Matsuguchi, T., 2018. Spleen tyrosine kinase influences the early stages of multilineage differentiation of bone marrow stromal cell lines by regulating phospholipase C gamma activities. *Journal of cellular physiology* 233, 2549-2559.

la Cour, T., Kiemer, L., Molgaard, A., Gupta, R., Skriver, K., Brunak, S., 2004. Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein engineering, design & selection : PEDS* 17, 527-536.

Lawrie, A.M., Noble, M.E., Tunnah, P., Brown, N.R., Johnson, L.N., Endicott, J.A., 1997. Protein kinase inhibition by staurosporine revealed in details of the molecular interaction with CDK2. *Nature structural biology* 4, 796-801.

Lee, R.K., Lui, P.P., Ngan, E.K., Lui, J.C., Suen, Y.K., Chan, F., Kong, S.K., 2006. The nuclear tubular invaginations are dynamic structures inside the nucleus of HeLa cells. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 84, 477-486.

Lee, S.B., Rhee, S.G., 1996. Molecular cloning, splice variants, expression, and purification of phospholipase C- $\delta$ 4. *The Journal of biological chemistry* 271, 25-31.



Leite, M.F., Thrower, E.C., Echevarria, W., Koulen, P., Hirata, K., Bennett, A.M., Ehrlich, B.E., Nathanson, M.H., 2003. Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 2975-2980.

Leung, D.W., Tompkins, C., Brewer, J., Ball, A., Coon, M., Morris, V., Waggoner, D., Singer, J.W., 2004. Phospholipase C delta-4 overexpression upregulates ErbB1/2 expression, Erk signaling pathway, and proliferation in MCF-7 cells. *Molecular cancer* 3, 15.

Li, C., Iida, M., Dunn, E.F., Ghia, A.J., Wheeler, D.L., 2009. Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab. *Oncogene* 28, 3801-3813.

Lin, J.R., Hu, J., 2013. SeqNLS: nuclear localization signal prediction based on frequent pattern mining and linear motif scoring. *PloS one* 8, e76864.

Lin, S.Y., Makino, K., Xia, W., Matin, A., Wen, Y., Kwong, K.Y., Bourguignon, L., Hung, M.C., 2001. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nature cell biology* 3, 802-808.

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. *The Journal of biological chemistry* 271, 355-360.

Liu, T.M., Martina, M., Hutmacher, D.W., Hui, J.H., Lee, E.H., Lim, B., 2007. Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. *Stem cells* 25, 750-760.

Lo, H.W., Hsu, S.C., Ali-Seyed, M., Gunduz, M., Xia, W., Wei, Y., Bartholomeusz, G., Shih, J.Y., Hung, M.C., 2005. Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. *Cancer cell* 7, 575-589.

Malhas, A., Goulbourne, C., Vaux, D.J., 2011. The nucleoplasmic reticulum: form and function. *Trends in cell biology* 21, 362-373.

Malviya, A.N., Rogue, P.J., 1998. "Tell me where is calcium bred": clarifying the roles of nuclear calcium. *Cell* 92, 17-23.

Marius, P., Guerra, M.T., Nathanson, M.H., Ehrlich, B.E., Leite, M.F., 2006. Calcium release from ryanodine receptors in the nucleoplasmic reticulum. *Cell calcium* 39, 65-73.

Nagano, K., Fukami, K., Minagawa, T., Watanabe, Y., Ozaki, C., Takenawa, T., 1999. A novel phospholipase C delta4 (PLCdelta4) splice variant as a negative regulator of PLC. *The Journal of biological chemistry* 274, 2872-2879.

Nakamura, Y., Fukami, K., 2017. Regulation and physiological functions of mammalian phospholipase C. *Journal of biochemistry* 161, 315-321.

Nakamura, Y., Hamada, Y., Fujiwara, T., Enomoto, H., Hiroe, T., Tanaka, S., Nose, M., Nakahara, M., Yoshida, N., Takenawa, T., Fukami, K., 2005. Phospholipase C-delta1 and -delta3 are essential in the trophoblast for placental development. *Molecular and cellular biology* 25, 10979-10988.

O'Carroll, S.J., Mitchell, M.D., Faenza, I., Cocco, L., Gilmour, R.S., 2009. Nuclear PLCbeta1 is required for 3T3-L1 adipocyte differentiation and regulates expression of the cyclin D3-cdk4 complex. *Cellular signalling* 21, 926-935.

Okada, M., Ishimoto, T., Naito, Y., Hirata, H., Yagisawa, H., 2005. Phospholipase Cdelta1 associates with importin beta1 and translocates into the nucleus in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner. *FEBS letters* 579, 4949-4954.

Parys, J.B., De Smedt, H., 2012. Inositol 1,4,5-trisphosphate and its receptors. *Advances in experimental medicine and biology* 740, 255-279.

Payrastre, B., Nievers, M., Boonstra, J., Breton, M., Verkleij, A.J., Van Bergen en Henegouwen, P.M., 1992. A differential location of phosphoinositide kinases, diacylglycerol kinase, and phospholipase C in the nuclear matrix. *The Journal of biological chemistry* 267, 5078-5084.

Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29, e45.

Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research* 30, e36.

Poli, A., Billi, A.M., Mongiorgi, S., Ratti, S., McCubrey, J.A., Suh, P.G., Cocco, L., Ramazzotti, G., 2016. Nuclear Phosphatidylinositol Signaling: Focus on Phosphatidylinositol Phosphate Kinases and Phospholipases C. *Journal of cellular physiology* 231, 1645-1655.

Pusl, T., Wu, J.J., Zimmerman, T.L., Zhang, L., Ehrlich, B.E., Berchtold, M.W., Hoek, J.B., Karpen, S.J., Nathanson, M.H., Bennett, A.M., 2002. Epidermal growth

factor-mediated activation of the ETS domain transcription factor Elk-1 requires nuclear calcium. *The Journal of biological chemistry* 277, 27517-27527.

Ramazzotti, G., Faenza, I., Fiume, R., Billi, A.M., Manzoli, L., Mongiorgi, S., Ratti, S., McCubrey, J.A., Suh, P.G., Cocco, L., Follo, M.Y., 2017. PLC-beta1 and cell differentiation: An insight into myogenesis and osteogenesis. *Advances in biological regulation* 63, 1-5.

Ratti, S., Mongiorgi, S., Ramazzotti, G., Follo, M.Y., Mariani, G.A., Suh, P.G., McCubrey, J.A., Cocco, L., Manzoli, L., 2017a. Nuclear Inositide Signaling Via Phospholipase C. *Journal of cellular biochemistry* 118, 1969-1978.

Ratti, S., Ramazzotti, G., Faenza, I., Fiume, R., Mongiorgi, S., Billi, A.M., McCubrey, J.A., Suh, P.G., Manzoli, L., Cocco, L., Follo, M.Y., 2017b. Nuclear inositide signaling and cell cycle. *Advances in biological regulation*.

Rebecchi, M.J., Pentylala, S.N., 2000. Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiological reviews* 80, 1291-1335.

Rhee, S.G., 2001. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annual review of biochemistry* 70, 281-312.

Riccardi, C., Nicoletti, I., 2006. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature protocols* 1, 1458-1461.

Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., Duellman, S., Benink, H.A., Worzella, T.J., Minor, L., 2004. Cell Viability Assays, in: Sittampalam, G.S., Coussens, N.P., Brimacombe, K., Grossman, A., Arkin, M., Auld, D., Austin, C., Baell, J., Bejcek, B., Chung, T.D.Y., Dahlin, J.L., Devanaryan, V., Foley, T.L., Glicksman, M., Hall, M.D., Hass, J.V., Inglese, J., Iversen, P.W., Kahl, S.D., Kales, S.C., Lal-Nag, M., Li, Z., McGee, J., McManus, O., Riss, T., Trask, O.J., Jr., Weidner, J.R., Xia, M., Xu, X. (Eds.), *Assay Guidance Manual*, Bethesda (MD).

Rodrigues, M.A., Gomes, D.A., Andrade, V.A., Leite, M.F., Nathanson, M.H., 2008. Insulin induces calcium signals in the nucleus of rat hepatocytes. *Hepatology* 48, 1621-1631.

Rodrigues, M.A., Gomes, D.A., Leite, M.F., Grant, W., Zhang, L., Lam, W., Cheng, Y.C., Bennett, A.M., Nathanson, M.H., 2007. Nucleoplasmic calcium is required for cell proliferation. *The Journal of biological chemistry* 282, 17061-17068.

Salic, A., Mitchison, T.J., 2008. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 2415-2420.

Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* 9, 671-675.

Sekiya, I., Larson, B.L., Vuoristo, J.T., Cui, J.G., Prockop, D.J., 2004. Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs). *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 19, 256-264.

Sigrist, C.J., Cerutti, L., Hulo, N., Gattiker, A., Falquet, L., Pagni, M., Bairoch, A., Bucher, P., 2002. PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Briefings in bioinformatics* 3, 265-274.

Smith, M.R., Liu, Y.L., Matthews, N.T., Rhee, S.G., Sung, W.K., Kung, H.F., 1994. Phospholipase C-gamma 1 can induce DNA synthesis by a mechanism independent of its lipase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 6554-6558.

Stoscheck, C.M., King, L.E., Jr., 1986. Role of epidermal growth factor in carcinogenesis. *Cancer research* 46, 1030-1037.

Tasker, P.N., Taylor, C.W., Nixon, G.F., 2000. Expression and distribution of InsP(3) receptor subtypes in proliferating vascular smooth muscle cells. *Biochemical and biophysical research communications* 273, 907-912.

Thibeaux, R., Ave, P., Bernier, M., Morcelet, M., Frileux, P., Guillen, N., Labruyere, E., 2014. The parasite *Entamoeba histolytica* exploits the activities of human matrix metalloproteinases to invade colonic tissue. *Nature communications* 5, 5142.

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M., 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.

Turner, B.M., Turner, V.S., 1980. Secretion of alpha 1-antitrypsin by an established human hepatoma cell line and by human/mouse hybrids. *Somatic cell genetics* 6, 1-14.

Vann, L.R., Wooding, F.B., Irvine, R.F., Divecha, N., 1997. Metabolism and possible compartmentalization of inositol lipids in isolated rat-liver nuclei. *The Biochemical journal* 327 ( Pt 2), 569-576.

Vega, Q.C., Cochet, C., Filhol, O., Chang, C.P., Rhee, S.G., Gill, G.N., 1992. A site of tyrosine phosphorylation in the C terminus of the epidermal growth factor receptor is required to activate phospholipase C. *Molecular and cellular biology* 12, 128-135.

Verkhatsky, A., Orkand, R.K., Kettenmann, H., 1998. Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiological reviews* 78, 99-141.

Wei, Y., Mizzen, C.A., Cook, R.G., Gorovsky, M.A., Allis, C.D., 1998. Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in *Tetrahymena*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 7480-7484.

Wu, X., Bers, D.M., 2006. Sarcoplasmic reticulum and nuclear envelope are one highly interconnected Ca<sup>2+</sup> store throughout cardiac myocyte. *Circulation research* 99, 283-291.

Yamaga, M., Fujii, M., Kamata, H., Hirata, H., Yagisawa, H., 1999. Phospholipase C-delta1 contains a functional nuclear export signal sequence. *The Journal of biological chemistry* 274, 28537-28541.

Yang, Y.R., Follo, M.Y., Cocco, L., Suh, P.G., 2013. The physiological roles of primary phospholipase C. *Advances in biological regulation* 53, 232-241.

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T.L., 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics* 13, 134.

Zuk, P., 2013. Adipose-Derived Stem Cells in Tissue Regeneration: A Review. *ISRN Stem Cells* 2013, 35.

Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P., Hedrick, M.H., 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell* 13, 4279-4295.

Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., Hedrick, M.H., 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering* 7, 211-228.

## 8. ANEXOS

### 8.1. Aceite do comitê de ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE 55698116.2.0000.5149

Interessado(a): Prof. Alfredo Miranda de Goes  
Departamento de Bioquímica e Imunologia  
Instituto de Ciências Biológicas- UFMG

#### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 18 de maio de 2016, o projeto de pesquisa intitulado "**Modelo substituto de pele humana a partir de princípios da engenharia de tecidos visando a regeneração de lesões e utilização em testes toxicológicos in vitro**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.

Profa. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz

Coordenadora do COEP-UFMG

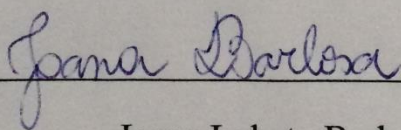


UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Termo de doação de material humano para pesquisa científica**

Eu, Joana Lobato Barbosa, RG: MG-13.966.344, CPF: 012.332.266-90, declaro, para os devidos fins, que doe amostras de tecido adiposo subcutâneo humano destinado ao meu projeto de pesquisa intitulado “Modelo substituto de pele humana a partir de princípios de engenharia de tecidos visando à regeneração de lesões e utilização em testes toxicológicos”, número COEP 55698116.2.0000.5149, para o projeto de doutorado de Marianna Kunrath Lima, RG: 108155471-17 SSP/RS, CPF: 015344706-03, intitulado “Fosfolipase C delta 4 humana (hPLC $\delta$ 4): uma proteína envolvida na proliferação e na diferenciação celular.”

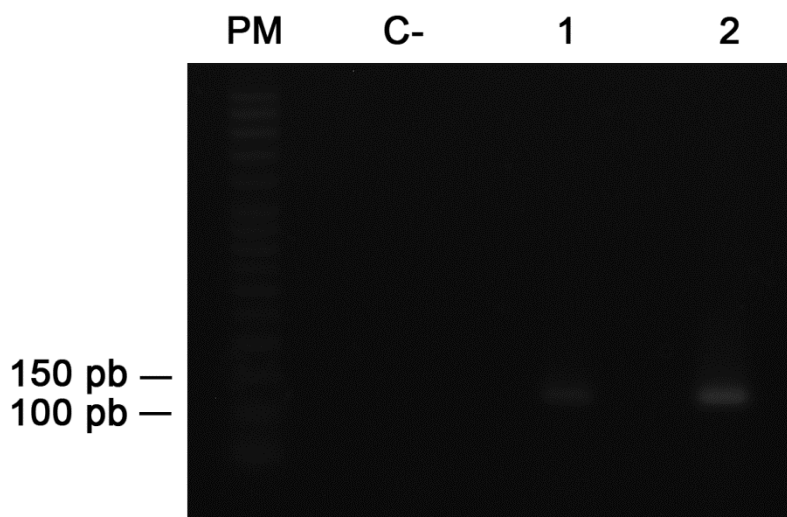
Belo Horizonte, 15 de dezembro de 2017



---

Joana Lobato Barbosa

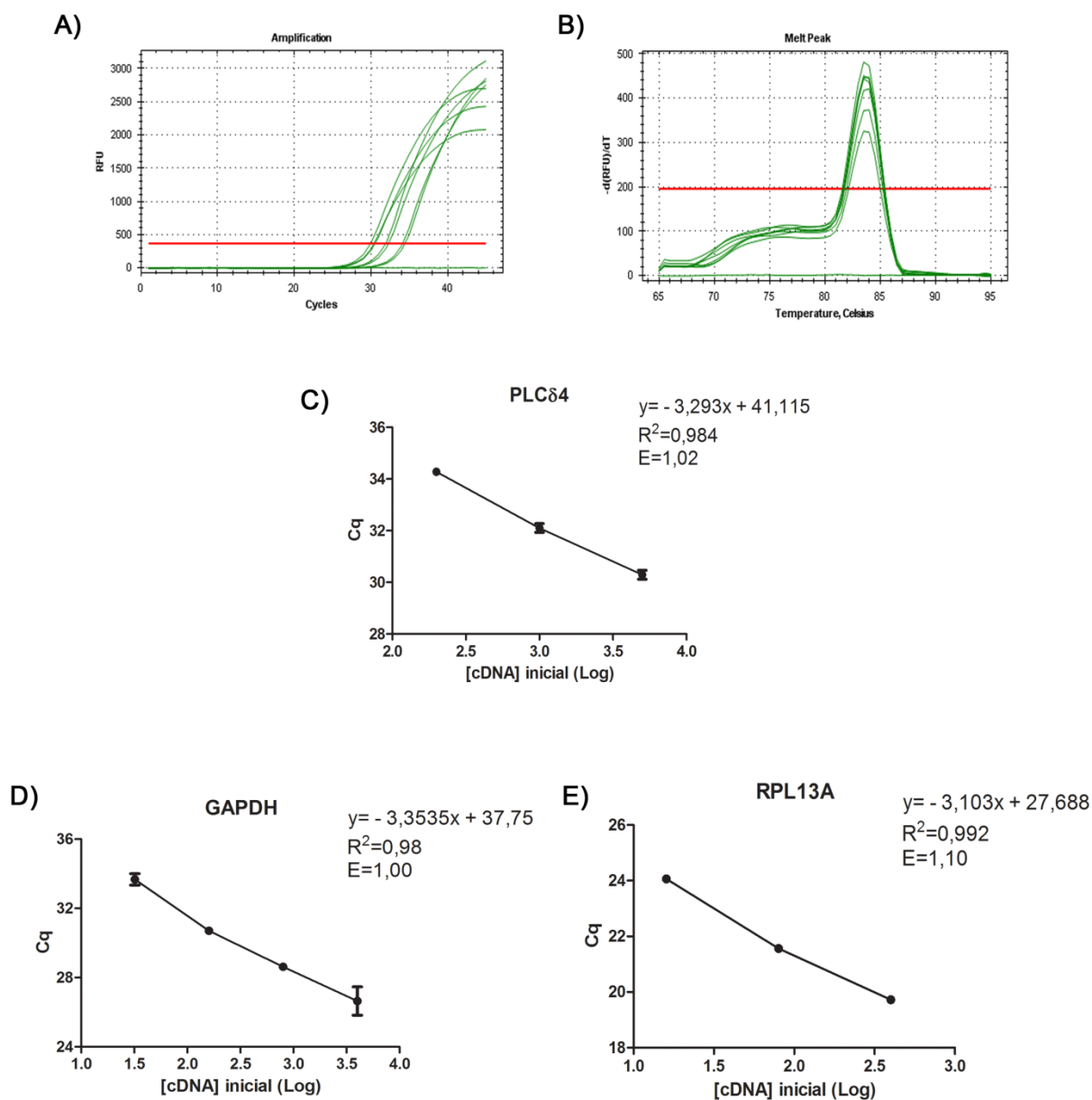
## 8.2. Gel PCR iniciadores hPLC $\delta$ 4



**Figura 25: Os iniciadores para amplificação da sequência de cDNA de *PLC $\delta$ 4* geram fragmentos do tamanho esperado.** Foram feitas reações de PCR para os iniciadores cuja sequência alvo era PLC $\delta$ 4 humana. Após os ciclos de PCR, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose, como descrito em Materiais e Métodos (item 4.9). Comparando os fragmentos obtidos nas canaletas 1 e 2 com a canaleta PM, contendo o padrão de peso molecular *50 pb DNA Ladder* (ThermoFisher Scientific), pode-se observar que foram gerados fragmentos do tamanho esperado, de 130 pb. PM: padrão de peso molecular; C-: controle negativo; 1: reação de PCR contendo 150 ng de cDNA; 2: reação de PCR contendo 150 ng de cDNA de uma amostra diferente da utilizada na amostra 1; pb: pares de bases.



### 8.3. Testes de eficiência para os iniciadores - Real Time qPCR



**Figura 26: Avaliação da eficiência para dos iniciadores utilizados nas reações de PCR quantitativa em tempo real. A) Curvas de amplificação do teste de eficiência para os iniciadores de *hPLCδ4*. B) Curvas de *melting* do teste de eficiência para os iniciadores de *hPLCδ4*. A e B demonstram como foi determinado o valor de  $C_q$ , assim como o resultado da curva de *melting*, indicando a geração de um fragmento único. C) Curva de eficiência para os iniciadores de *hPLCδ4*. D) Curva de eficiência para os iniciadores de *hGAPDH*. E) Curva de eficiência para os iniciadores de *hRPL13A*. Nos gráficos C, D e E são mostradas as equações das curvas, o coeficiente de determinação das curvas ( $R^2$ ) e a eficiência dos iniciadores (E).**

## 8.4. Análises NLS e NES

A)



Authors: Amine Heddad, Andrea Krings, Markus Brameier and Bot

### NucPred

The NucPred score for your sequence is 0.86 (see [score help](#) below)

```

1  MASLLQDQLTTDQDLLLMQEGMPMRKVRSKSWKCLRYFRLQNDGMTVWHA 50
51  RQARGSAKPSFISDVETIRNGHDSSELLRSLAEELPLEQGFTIVFHGRRS 100
101 NLDILMANSVEEAQIWMRGLQLLVDLVTSMHQERLDQWLSDFQRGDKNQ 150
151 DGKMSFQEVQRLLHLMNVEMDQEYAFSLFQAADTSQSGTLEGEFVQFYK 200
201 ALTKRAEVQELFESFSADGQKLTLEFLDFLQEEQKERDCTSELALELID 250
251 RYEPSDSGKLRHVLSDMGFLSYLCSKGDIFNPACLPIYQDMTQPLNHVF 300
301 ICSSHNTYLVGDQLCGQSSVEGYIRALKRGCRCVEVDVWDGSPGEPVVYH 350
351 GHTLTSRILFKDVVATVAQYAFQTSYDYPVILSLETHCSWEQQQTMAHILT 400
401 EILGEQLLSTTLGDVLPQPLSPPEELRRKILVKGKKLTLLEEDLEYEEEA 450
451 EPELESELALESQFETEPEPEQONLQNKDKKKSKPILCPALSSLVYIL 500
501 KSVSFRSFTHSKEHYHFYEISSFSETKAKRLIKEAGNEFVQHNTWQLSRV 550
551 YPSGLRTDSSNYPQELWNAGCQMVAMNMQTAGLEMDICDGHFRQNGGCG 600
601 YVLKPDFLRDIQSSPHPEKPISPFKAQTLIIQVISGQQLPKVDKTKEGSI 650
651 VDPLVKVQIFGVRDLTARQETNYVENNGFNPHYWGQTLCFRVLVPELAMLR 700
701 FVVMYDWDKSRNDFIQYTLPTWCMQQGYRHHLLSKDGISLRPASTFVY 750
751 ICIQEGLEGDES 762
  
```

Positively and negatively influencing subsequences are coloured according to the following scale:

(non-nuclear) negative positive (nuclear)

B)

Prediction result (The predicted NLS(s) are underlined)

plcd4: MASLLQDQLTTDQDLLLMQEGMPMRKVRSKSWKCLRYFRLQNDGMTVWHARQARGSAKPSFISDVETIR

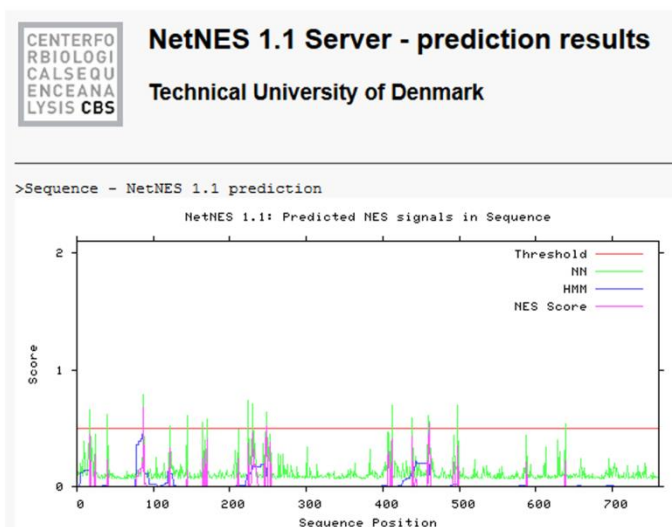
Definition of different colors in predictions

score range	color
0.1-0.3	Dark Blue
0.3-0.5	Blue
0.5-0.7	Cyan
0.7-0.8	Green
0.8-0.86	Yellow
0.86-0.89	Orange
>0.89	Red

The predicted NLS(s) (score cutoff = 0.86)

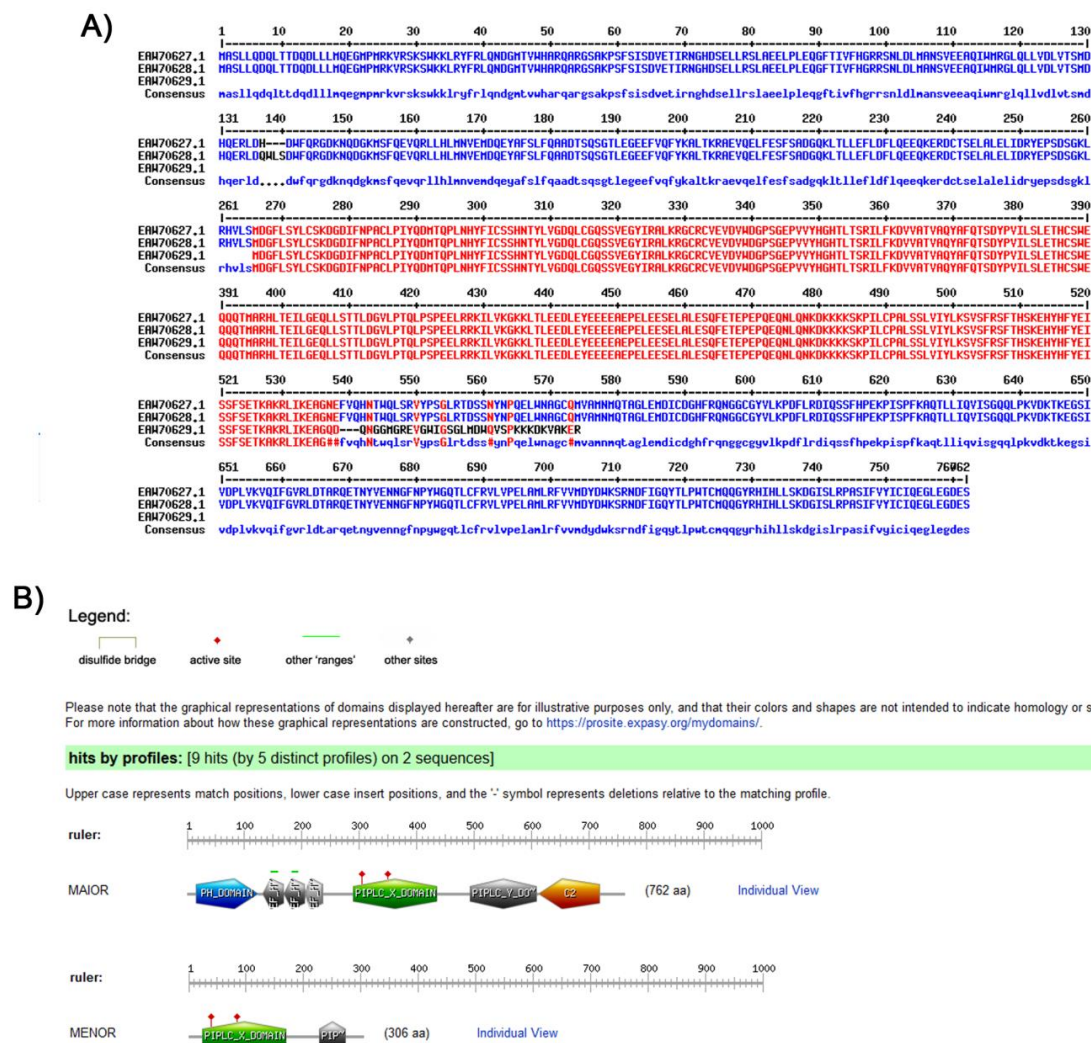
Protein ID	Predicted NLS	Start	Stop	The highest score of matches within the prediction
plcd4	<u>SAKPSFISDVE</u>	56	67	0.879

C)



**Figura 27: Análises de NLS e NES na sequência proteica de hPLCδ4.** **A)** O *software NucPred* (Brameier et al., 2007) mostrou que, apesar de não possuir uma sequência NLS forte, o *score* para a sequência proteica de hPLCδ4 foi alto, de 0.86 (o que equivale a probabilidade de 86% da proteína em questão ser nuclear). **B)** As análises do *software SeqNLS* (Lin and Hu, 2013) demonstraram que hPLCδ4 possui uma sequência NLS, indicando 88% de chance da proteína ser nuclear. **C)** O *software NetNES* (la Cour et al., 2004) mostrou que a sequência de hPLCδ4 possui algumas regiões com possíveis NES. Se o NES Score (linha rosa) ultrapassa a linha de corte (Threshold; linha vermelha), o resíduo de aminoácido presente naquela posição provavelmente participa de um NES.

## 8.5. Variantes hPLC $\delta$



**Figura 28: Variantes anotadas no GenBank para hPLC $\delta$ .** **A)** Alinhamento das variantes de hPLC $\delta$  utilizando o *software MultAlin* (Corpet, 1988). Resíduos de aminoácidos em azul correspondem aos resíduos comuns às duas primeiras sequências; resíduos em vermelho correspondem a resíduos conservados nas três sequências; os resíduos em preto diferem da sequência consenso (Consensus), que representa os resíduos de aminoácidos que ocorrem com maior frequência nas posições das sequências analisadas. EAW10627.1: número de acesso no GenBank da variante 1; EAW10628.1: número de acesso no GenBank da variante 2; EAW10629.1: número de acesso no GenBank da variante 3. **B)** Análise dos domínios presentes nas variantes. Com o *software Prosite* (Sigrist et al., 2002) foram determinados os domínios das variantes EAW10628.1 (MAIOR) E EAW10629.1 (MENOR). PH\_DOMAIN: domínio PH; EF\_H: domínio EF-hand; PIPCL\_X\_DOMAIN e PIPCL\_Y\_DOMAIN: domínios catalíticos de fosfolipase C; C2: domínio C2.

- 8.6. Artigo “Epidermal growth factor (EGF) triggers nuclear calcium signaling through intra-nuclear phospholipase C delta-4 (PLCD4) that is involved in cell proliferation”, De Angelis et al., não publicado.**

**Epidermal growth factor (EGF) triggers nuclear calcium signaling through intra-nuclear phospholipase C delta-4 (PLC $\delta$ 4) that is involved in nuclear protein kinase C (PKC) activation and cell proliferation**

Ana Carolina D. Campos<sup>\*\*§</sup>, Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria<sup>\*\*</sup>, Marianna Kunrath-Lima<sup>\*\*</sup>, Deborah Schechtman<sup>†</sup>, Alfredo M. Goes<sup>\*</sup>, Michele A. Rodrigues<sup>\*§</sup>, Michael H. Nathanson<sup>§</sup>, and Dawidson A. Gomes<sup>\*§</sup>

\* Department of Biochemistry and Immunology, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antonio Carlos, 6627, Belo Horizonte – MG, 31270-901, Brazil.

† Department of Biochemistry, University of São Paulo. Av. Professor Lineu Prestes, 748, São Paulo – SP, 05508-900, Brazil.

§ Section of Digestive Diseases, Internal Medicine, Yale University. 333 Cedar St, New Haven – CT, 06520-8056. USA.

#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.*

**Short title:** PLC $\delta$ 4 mediates EGF-induced Ca<sup>2+</sup> signals involved in cell proliferation

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

**Word count:** 7809 words

**Figures:** 7 figures

**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.

**ABSTRACT**

Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) signaling within the cell nucleus regulates specific cellular events such as gene transcription and cell proliferation. Nuclear and cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  can be independently regulated, and nuclear translocation of receptor tyrosine kinases (RTKs) is one way to activate signaling cascades within the nucleus locally. The relevance of nuclear RTKs, like the epidermal growth factor receptor (EGFR), was established for processes such as transcriptional regulation, DNA-damage repair, and cancer therapy resistance. RTKs were linked to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ( $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ ) hydrolysis within the nucleus, that leads to  $\text{Ca}^{2+}$  release from the nucleoplasmic reticulum by  $\text{InsP}_3$  receptors ( $\text{InsP}_3\text{R}$ ).  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  hydrolysis is mediated by phospholipase C (PLC). However, it is unknown which nuclear PLC isoform is activated by EGFR. This work aimed to demonstrate that EGF-signaling activates the nuclear  $\text{PLC}\delta 4$ , that in turn release calcium within the nucleus. We showed that EGF-induced  $\text{Ca}^{2+}$  signals are inhibited when EGFR nuclear translocation is impaired. These signals are also reduced by selectively buffering inositol 1,4,5-trisphosphate ( $\text{InsP}_3$ ) within the nucleus. We further determined that EGF induce hydrolysis of nuclear  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  by the intra-nuclear  $\text{PLC}\delta 4$ , rather than by  $\text{PLC}\gamma 1$ . Moreover, the activity of the EGF downstream target protein kinase C (PKC) occurs in the nucleus of stimulated cells. Furthermore, we demonstrate that  $\text{PLC}\delta 4$  has a critical role in cell cycle progression through regulation of cyclins A, B1 and H expression. These data reveal a new mechanism of EGF-induced nuclear signaling mediate by nuclear  $\text{PLC}\delta 4$ , and it provides evidence for the mechanism responsible for independent regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  signals within the nucleus and nuclear PKC activation.

## **SUMMARY STATEMENT**

RTKs were linked to PI(4,5)P<sub>2</sub> hydrolysis within the nucleus, that leads to Ca<sup>2+</sup> release from the nucleoplasmic reticulum by InsP<sub>3</sub>R. It is unknown if EGFR triggers nuclear calcium signaling by which nuclear PLC isoform. Here, we show that EGFR activates PLCδ4 that is important for cell proliferation.



## INTRODUCTION

The spatial-temporal distribution of calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) signals contributes to the versatility of this second messenger. Accordingly, it was established that increases in  $\text{Ca}^{2+}$  within the cell nucleus selectively promote cellular events such as gene transcription (Pusch et al., 2002), cell proliferation and tumor growth (Rodrigues et al., 2007). There is increasing evidence that nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signals can be regulated independently of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  signals. This is possible because the nucleus contains all the machinery necessary for  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization (Echevarria et al., 2003; Gomes et al., 2006). Intra-nuclear  $\text{InsP}_3$  is formed from  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  hydrolysis which is induced by growth factor stimulation such as hepatocyte growth factor and insulin. Some RTKs undergo nuclear translocation upon activation, which appears necessary for initiation of nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signals (Gomes et al., 2008; Rodrigues et al., 2008), so this could be one mechanism to regulate  $\text{Ca}^{2+}$  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). Recently, 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., 2017) where it acts as a transcriptional regulator (Lin et al., 2001; Huo et al., 2010), transmits signals (Wang et al., 2006; Liccardi 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.

A missing link of the nuclear calcium signaling is the activation mechanism of nuclear PLCs. Previous studies demonstrated the presence of nuclear isoforms of these enzymes such as  $\gamma 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\delta 1$  and  $\delta 4$  (Faenza et al., 2013). PLCs could be involved in primary nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signaling since activation of  $\text{InsP}_3$  receptors is the most implicated mechanism in the release of  $\text{Ca}^{2+}$  from the nucleus (Bootman et al., 2009). They consist, in mammals, of a protein family containing 13 isozymes, divided into 6 classes:  $\beta$  (1-4),  $\gamma$  (1-2),  $\delta$  (1,3,4),  $\epsilon$  (1),  $\zeta$  (1) e  $\eta$  (1,2), according to their structures (Nakamura and Fukami, 2017). All PLCs isozymes catalyze the reaction of  $\text{PIP}_2$  cleavage, generating  $\text{InsP}_3$  and diacylglycerol (DAG), but each isozyme possesses unique physiological functions (Nakamura and Fukami, 2017). Some PLC

isozymes are described within the nucleus in specific cell types such as PLC $\beta$ 1, PLC $\gamma$ 1, PLC $\delta$ 1, PLC $\delta$ 4 and PLC $\zeta$  (Faenza et al., 2013; Leung et al., 2004). The activity of these nuclear PLCs is related to the regulation of several cellular processes, such as proliferation and differentiation. As well as to diseases, for example, myelodysplastic syndromes (PLC $\beta$ 1), neurological diseases (PLC $\gamma$ 1) and infertility (PLC $\zeta$  and PLC $\delta$ 1-4) (Ratti et al., 2017), indicating the importance of the study and characterization of these isozymes.

PLC $\delta$ 4 has been identified as a nuclear protein in different cell types and seems to be involved in proliferative processes (Lee and Rhee, 1996; Nagano et al., 1999; Leung et al., 2004). It was first purified from regenerating rat liver protein extracts (Asano et al., 1994), and its gene was cloned by Liu and colleagues in 1996 (Liu et al., 1996a) from a regenerating rat liver cDNA library, indicating a possible role of PLC $\delta$ 4 in cell proliferation. Furthermore, this enzyme is abundantly expressed in the brain and testes of rats (Lee and Rhee, 1996; Nagano et al., 1999). Human *PLC $\delta$ 4* gene (*hPLC $\delta$ 4*) was cloned from an oligodendroglioma cDNA library, and it is located on the long arm of chromosome 2 in region 35 (Kim et al., 1999). Despite its well-described chromosomal location and nuclear localization, it is unknown how hPLC $\delta$ 4 is activated within the nucleus. This work aimed to determine whether EGFR activates nuclear Ca<sup>2+</sup> signaling via PLC $\delta$ 4. We demonstrated that EGFR translocation is necessary to activate intra-nuclear PLC $\delta$ 4, that in turn hydrolyzes nuclear PI(4,5)P<sub>2</sub> to generate local InsP<sub>3</sub> and Ca<sup>2+</sup> signals. Furthermore, this pathway is involved in regulating nuclear PKC activity and cell proliferation.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***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, 50 units/ml penicillin, and 50 g/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 containing 10% fetal bovine serum, 50 units/mL penicillin, and 50 g/mL streptomycin (Life Technologies) and plated on collagen-coated coverslips (50 µg/mL) (BD Biosciences, CA, USA). Hepatocytes were used within 48 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 polyclonal anti-EGFR (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA), monoclonal anti- $\alpha$ -tubulin (Sigma-Aldrich), polyclonal anti-lamin B1 (Abcam, MA, USA), monoclonal anti-CHC2 (BD Biosciences), monoclonal anti-Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase (BD Biosciences), monoclonal anti-PLC $\gamma$ 1 (Millipore, MA, USA) and polyclonal anti-PLC $\delta$ 4 (Santa Cruz Biotechnology), Erk1/2, phospho-Erk1/2 (T202/Y204), AKT, phospho-AKT(T308) (1:1,000; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), cyclins A, B1, D1, D2, D3, E, E2 and H (1:500 to 1,000, Cell Signaling Technology). 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/>).

### ***Immunofluorescence***

Confocal immunofluorescence was performed as described previously (Faraco et al., 2017). In brief, cells were labeled with polyclonal anti-EGFR (Santa Cruz Biotechnology) or monoclonal anti-EGFR (Millipore), monoclonal anti-PLC $\gamma$ 1 (Millipore) and polyclonal anti-PLC $\delta$ 4 (Santa Cruz Biotechnology) and then incubated with secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488 or 555 (Life Technologies). TO-PRO-3 iodide (Life Technologies) was used as a marker for nuclear compartment. Images were collected using a Zeiss LSM 710 DUO NLO with a 63X, 1.4 NA objective lens.

### ***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 monomeric red fluorescent protein (mRFP) and with a nuclear localization signal or nuclear exclusion signal to generate the nuclear and cytosolic constructs, respectively. Cells were transfected using Fugene6 reagent (Promega, WI, USA) and analysis performed in 48 hours. For calcium imaging cells were incubated with 6  $\mu$ 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 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 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.

### ***siRNA transfection***

Cells were transfected using Lipofectamine RNAiMAX reagent (Life Technologies) according to manufacturer's instructions. 50 nM siRNA for Clathrin Heavy Chain (CHC2) (siRNA ID AM16106, Life Technologies) was used for a CHC2 knockdown. Silencer select pre-designed siRNA s10632 (15 nM) (Life Technologies) was used for a PLC $\gamma$ 1 knockdown. For PLC $\delta$ 4 knockdown ON-TARGETplus SMARTpool (84812), siRNA J-005065-01 (50 nM) (Dharmacon/Thermo Scientific, CO, USA) was used. siGENOME Non-targeting siRNA pool #2 (Dharmacon/Thermo Scientific) was used, as control siRNA. Further analysis was performed 48 hours after transfection.

### ***Proliferation and cell cycle assay***

SKHep-1 cells were transfected with PLC $\delta$ 4 siRNA, and siGENOME Non-targeting siRNA pool #2 (Dharmacon/Thermo Scientific) was used as control siRNA. After 48 hours, cells were collected by trypsinization and counted in triplicate. For the cell cycle assay, a total of  $1 \times 10^5$  cells were lysed with 300  $\mu$ L of a hypotonic solution containing 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) and 50  $\mu$ g/mL propidium iodide (Life Technologies) [5]. The cells were incubated at 4°C for 1 h and analyzed in a Guava EasyCyte 6L flow cytometer (Millipore) and data analyzed using FlowJo software (version 7.2.5).

***Cell death assay via fluorescence microscopy***

For this experiment, the cells were incubated with a solution of 200 nM staurosporine for 4 or 24 hours as a positive control for cell death. The cells were incubated with Annexin V-FITC (Life Technologies) and propidium iodide (Life Technologies) for 1 hour. 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 Prism 6 software. Data are represented as mean  $\pm$  S.E.

## RESULTS

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

The nuclear mode of EGF-dependent nuclear calcium signaling may depend on translocation of EGFR to the nucleus. Increased nuclear EGFR occurs upon EGF stimulation (Faraco et al., 2017), similar to what has been shown for other RTKs, including the hepatocyte growth factor (HGF) receptor and the insulin receptor (Gomes et al., 2008; Rodrigues et al., 2008). We observed this in both primary rat hepatocytes and SKHep-1 cells, a human liver cancer cell line (Fig. 1A, B). Cellular fractionation studies showed that, after 2.5 minutes of EGF stimulation, EGFR protein level in the nuclear fraction was higher than in non-stimulated control cells (Fig. 1A). In SKHep-1 cells, EGFR decreased in the non-nuclear fraction as it increased in the nuclear fraction. Confocal immunofluorescence similarly showed that EGFR localized mainly to the plasma membrane of non-stimulated control SKHep-1 cells (Fig. 1B) but accumulated in the nucleus within 10 min of exposure to EGF. These data demonstrate that EGF induces EGFR to translocate to the nucleus of hepatic cells.

It was determined that EGFR nuclear translocation depends on clathrin-mediated endocytosis (De Angelis Campos et al., 2011), so we used clathrin heavy chain 2 (CHC2) siRNA to disrupt this endocytic pathway and thereby inhibit internalization of EGFR. Figure 1C show that siRNA treatment abolished CHC2 expression by 90%, whereas control siRNA did not affect. Next, we demonstrated that EGF stimulation of control cells led to a slower Ca<sup>2+</sup> increase with some superimposed oscillations, but CHC2 knockdown diminished the peak of EGF-induced Ca<sup>2+</sup> signals by 70 ± 5% and abolish the calcium oscillations (Fig. 1D). This indicates that some of the Ca<sup>2+</sup> signals induced by EGF occur after EGFR internalization.

### ***EGF triggers PI(4,5)P<sub>2</sub> hydrolysis and InsP<sub>3</sub> formation within the nucleus to generate Ca<sup>2+</sup> signals***

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 was responsible for increasing Ca<sup>2+</sup> in the nucleus. For this, SKHep-1 cells were transfected with cytosolic or nuclear InsP<sub>3</sub>-buffer constructs whose targeting was confirmed by detection of the monomeric red fluorescent protein (mRFP) subcellular localization by confocal microscopy (Fig. 2A). We used Fluo-4/AM to assess Ca<sup>2+</sup> release in response to EGF. Our results show that the presence of cytosolic InsP<sub>3</sub>-buffer did not significantly affect the Ca<sup>2+</sup> response in either the nucleus or cytosol (Fig. 2B). In contrast, EGF-induced Ca<sup>2+</sup> signals were diminished throughout cells expressing the nuclear InsP<sub>3</sub>-buffer (Fig. 2B), suggesting that EGF triggers nuclear Ca<sup>2+</sup> signals by inducing the formation of InsP<sub>3</sub> within the nucleus. To investigate whether EGF induces nuclear PI(4,5)P<sub>2</sub> hydrolysis for InsP<sub>3</sub> production, we measured PI(4,5)P<sub>2</sub> in nuclear fractions of hepatocytes. Nuclei from EGF-stimulated cells contained  $64 \pm 15\%$  less PI(4,5)P<sub>2</sub> than nuclei from control cells (Fig. 2C). These findings indicate 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.

### ***Intra-nuclear PKC activity occurs upon EGF stimulation***

The other second messenger generated from PI(4,5)P<sub>2</sub> hydrolysis is DAG, which can activate PKC [21]. Increases in nuclear DAG can either participate in translocation of PKCs, from the cytosol to the nucleus, or it 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)-based on PKC activity reporter 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 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, a general PKC activator, induced increased CFP/YFP emission of NucCKAR (Fig. 3b and 3c). Similar results were obtained with EGF treatment (Fig. 3B and 3C), indicating EGF-induced 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 not activate nuclear PKC after AVP stimulation. Treatment with the broad-range PKC inhibitor Go6983 (Fig. 3D) blocked EGF-induced increases in the CFP/YFP emission ratio, providing additional evidence that EGF triggers PKC activity within the nucleus. These results demonstrated that EGF could activate nuclear PKC signaling.

***PLC $\gamma$ 1 is cytosolic-localized and does not translocate to the nucleus upon EGF stimulation, whereas PLC $\delta$ 4 is exclusively a nuclear protein***

We demonstrated that EGF stimulation results in PI(4,5)P<sub>2</sub> hydrolysis, InsP<sub>3</sub> formation, Ca<sup>2+</sup> release and PKC activation within the cell nucleus, we investigated which enzyme regulates this cascade. 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). PLC $\gamma$ 1 is the primary isoform typically thought to bind to and to 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., 1996a), 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 both by confocal microscopy (Fig. 4B) and western blot (data not shown). The subcellular localization of these PLC isoforms was also assessed in primary rat hepatocytes, and similarly, 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 when hepatocytes were stimulated with EGF (Fig. 4C), indicating that there is no translocation of these PLCs between nuclear and non-nuclear compartments in response to EGF. Further analysis confirmed 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, and it is required for EGF-induced Ca<sup>2+</sup> signals***

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 and PLC $\delta$ 4 expressions by 82 ± 7% and 66 ± 14%, respectively (Fig. 5A). Nuclear fractions were isolated from these cells upon EGF stimulation and PI(4,5)P<sub>2</sub> was quantified. EGF induced nuclear PI(4,5)P<sub>2</sub> depletion in control siRNA and PLC $\gamma$ 1 siRNA-treated cells but not in PLC $\delta$ 4 siRNA-treated cells (Fig. 5B). Knockdown of PLC $\delta$ 4 prevents nuclear PI(4,5)P<sub>2</sub> hydrolysis triggered by EGF stimulus.

Next, EGF-induced Ca<sup>2+</sup> signals were assessed in PLC $\gamma$ 1 and PLC $\delta$ 4 siRNA-treated SKHep-1 cells. Cells were then incubated with Fluo-4/AM to monitor Ca<sup>2+</sup> oscillations during EGF stimulation. The peak Ca<sup>2+</sup> response to EGF in control or PLC $\gamma$ 1 siRNA-treated cells were similar whereas PLC $\delta$ 4 siRNA treatment reduced this peak (Fig. 5C). These results indicate that PLC $\delta$ 4 plays a role in EGF-induced Ca<sup>2+</sup> signals and therefore provide evidence that this isoform is a mediator of EGF-induced nuclear PI(4,5)P<sub>2</sub> hydrolysis and Ca<sup>2+</sup> signaling.

***PLC $\delta$ 4 plays a critical role in cell cycle progression***

We previously demonstrated that nuclear calcium is important for cell proliferation *in vitro* and *in vivo*. Next, we tested if PLC $\delta$ 4 is involved in cell proliferation, one important response triggered by EGFR activation. We show that cells expressing reduced PLC $\delta$ 4 content have reduced proliferation rate (Fig. 6A). 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). Instead, we hypothesized that PLC $\delta$ 4 might affect the expression of genes involved in cell cycle progression.

To further elucidate the suppressor effect of PLC $\delta$ 4 on cell proliferation, the cell cycle pattern of the control and siRNA-treated cells were determined by flow cytometry. We observed the accumulation of PLC $\delta$ 4 knockdown cells at the G1 and G2/M phase and decreased of S phase cells compared the control siRNA group (Fig. 6C).

We next studied the effects of PLC $\delta$ 4 on the expression cyclins. We found that expression of cyclin B1, a G2/M-checkpoint protein, and cyclin A, S-checkpoint protein phase were decreased in PLC $\delta$ 4 knockdown cells compared to control siRNA (Fig. 6D, E). Furthermore, cyclin H, a regulatory cyclin showed reduced expression in PLC $\delta$ 4 depleted cells. These findings indicate that nuclear PLC $\delta$ 4 has an important role in cell cycle progression affecting cyclins expression without inducing apoptosis.

## DISCUSSION

The present data provide new insights regarding the nuclear mode of EGFR signaling beyond its known interaction with transcription factors (Shi et al., 2012) and with its phosphorylation signaling (Wang et al., 2006). Our data show that EGF induces EGFR to translocate to the nucleus of hepatic cells and Ca<sup>2+</sup> signals occur after this nuclear translocation (Figures 1 and 2). There are few articles about the route by which receptors traffic from plasma membrane to the endoplasmic reticulum (ER), and then to the nucleus, but precedent exists with both viruses and toxins (Sandvig and Van Deurs, 2002; Marsh and Helenius, 2006; Carpenter and Liao, 2009). Few studies demonstrated that RTKs could travel from cell surface to nucleus. For example, biotinylated HGFR (c-met) at the plasma membrane, prior to stimulation with HGF, could be recovered in the nucleus after cells were stimulated (Gomes et al., 2008). De Angelis *et al.* using time-lapse confocal microscopy showed that fluorescent-labeled-EGF reached the nucleus after ~ 10 minutes of stimulation. Recently, we demonstrated that three-dimensional analysis of super-resolution

images was effective for quantifying the amount of EGF/EGFR clusters within the nucleus in mesenchymal stem cells and SKHEP-1 cells stimulated with labeled EGF (Faraco et al., 2017). In these cells, the number of EGF-clusters increased and stabilized in 10 min of stimulation with EGF. It is interesting that the peak of EGFR nuclear translocation match with the peak of calcium signals observed in SKHEP-1 cells (Figure 1C). It was demonstrated that EGFR nuclear translocation depends on dynamin and clathrin-mediated endocytosis (De Angelis Campos et al., 2011) and we showed that clathrin knockdown reduces the EGF-induced calcium signals. We speculated that the EGFR nuclear translocation is necessary to initiate nuclear calcium signals. Our results are consistent with our previous observation that blocking c-met translocation decrease nuclear lipid metabolism and  $\text{Ca}^{2+}$  signals (Gomes et al., 2008).

$\text{Ca}^{2+}$  signaling in the nucleus rather than cytosol is important for cell proliferation, and tumor growth (Rodrigues et al., 2007), and nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  can regulate gene expression (Hardingham et al., 1997; Bading, 2013; Ranty et al., 2012). Thus, increases in nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  could be one mechanism for EGF to promote those cellular processes. The nucleus contains the machinery necessary for the production of  $\text{InsP}_3$  receptor-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  release (Bootman et al., 2009). It is well known that PLC mediates  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  hydrolysis and formation of  $\text{InsP}_3$  and DAG within the cytoplasm (Berridge, 2016). However, there are few studies showing the  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  hydrolysis with the nucleus. Similar to what has been observed in response to stimulation with HGF (Gomes et al., 2008) or insulin (Rodrigues et al., 2008), EGF triggers  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  hydrolysis and  $\text{InsP}_3$  formation within the nucleus (Figure 2).

PLC within the nucleus is involved in specific signal transduction pathways independent from those induced by isoforms localized in other compartments (Follo et al., 2009). The current literature linked  $\text{PLC}\beta$  isoforms with G protein-coupled receptors, whereas the RTKs are connected to the  $\text{PLC}\gamma$  isoforms. For example, activated nuclear metabotropic glutamate 5 (mGlu5) receptor couples to  $\text{G}_{q/11}$  and a nuclear isoform,  $\text{PLC}\beta 1$  to generate the  $\text{InsP}_3$ -mediated release of  $\text{Ca}^{2+}$  from  $\text{Ca}^{2+}$ -release channels in the nucleus of primary striatal neurons (Kumar et al., 2008). We demonstrated that EGF induces hydrolysis of nuclear  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  by the intra-nuclear  $\text{PLC}\delta 4$ , rather than by  $\text{PLC}\gamma 1$  (Figure 4). We still do not know if  $\text{PLC}\delta 4$  is activated directly or indirectly. We failed to demonstrate a direct binding of  $\text{PLC}\delta 4$  with nuclear

EGFR by co-immunoprecipitation (data not shown). We are investigating how PLC $\delta$ 4 is activated by the nuclear translocation of EGFR.

There is abundant information about the function of nuclear PLCs. Some studies suggest that PLC positively regulates the cell cycle. PLC $\beta$ 1 has been shown to 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 plays a vital role in cellular proliferation and specifically in cell-cycle control. Knockdown of PLC $\delta$ 4 leads to decreased growth cell without affecting cell death process in SKHep-1 cells (Figure 6). The knockdown of this protein induces a proliferation defect but does not affect the rates of apoptosis. The cell cycle profile is accompanied by substantial depletion of cyclins A, B1 and H (Figure 6). Consistent with that, a high decrease of cyclin B1 could interfere with the transition through the G2/M phase of cell cycle. It was demonstrated that nuclear PLC $\delta$ 4 expression dramatically increases at the transition from G1 to S-phase and the high content continues to the end of the M-phase (Kim et al., 1999). Our results show that PLC $\delta$ 4 knockdown increase cells in G1 and G2/M phase and reduced S phase cells compared to control.

The direct target of PLC signaling is represented by PKC, which are activated by the second messengers DAG and InsP3 (Martelli et al., 2006). We furthermore showed that EGF induces PKC activity within the nucleus (Figure 3), and several nuclear proteins are PKC substrates, so this may also be relevant for processes such as gene expression and changes in chromatin structure (Huang et al., 2004). Also, activation of PKC has been shown to affect cell cycle progression (Parekh et al., 2000; Fima et al., 2001). PKC $\alpha$  was necessary for PLC $\beta$ 1 mediated regulation of cyclin D3 and cell proliferation in human erythroleukemia cells (Poli et al., 2013). Furthermore, PKC $\alpha$  regulates cyclin B1 leading to effects on G2/M transition. Using PKC inhibitors, they observed a pronounced decrease of 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).

Therefore, our findings identify novel signaling events that may link EGFR nuclear translocation to stimulation of cell growth (Figure 7). Activation of this signaling pathway may, in turn, be important both for liver regeneration and tumor growth. This 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., 1996b). It also 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.

#### **Author contributions**

A. C. D. C. designed and carried out most experiments and wrote the manuscript. M. A. R. performed InsP<sub>3</sub>-buffer experiments. D. S. guided PKC studies. A. M. G. provided reagents for this project. M. H. N. supervised the experiments, contributed to project design and edited the manuscript. D. A. G. conceived and directed the project and participated in experiments.

#### **Acknowledgments**

This work was supported by the NIH grants R03 TW 08709, P01 DK57751, P30 DK34989, S10 OD023598 and R01 DK45710 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.

#### **Declarations of interest**

We declare that there are no conflicts of interest.

## 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 control for nuclear and non-nuclear fractions. Indicated KDa values represent the position of the referenced bands from pre-stained protein standard. Bands corresponding to EGFR in the nuclear fractions are more intense than in EGF-treated groups. N=3. **B**, confocal images of control SKHep-1 cells (top) and upon 10 min EGF stimulation (bottom). EGFR is represented in green and the nuclear compartment marked by TO-PRO-3 fluorescence represented in blue. Merged images show EGFR co-localization with the nuclear dye in EGF-treated cells. N= 20 cells for each treatment. Bar = 10 micrometers. **C**, western blot (top) analysis of clathrin heavy chain 2 (CHC2) expression in non-treated, control siRNA-treated or CHC2 siRNA-treated SKHep-1 cells.  $\alpha$ -tubulin was used as loading control. Tracings represent Fluo-4 fluorescence intensity changes, normalized by the baseline, by the time of EGF stimulation. **D**, bar graph compiling peaks of Fluo-4 fluorescence intensity in EGF-stimulated, control siRNA-treated (n=17) or CHC2 siRNA-treated (n=27) SKHep-1. Fluorescence changes over time were normalized and represented as fluorescence intensity (F) by baseline fluorescence ( $F_0$ ) multiplied by 100. \*\*p<0.01.

**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 expressing cytosolic or nuclear  $\text{InsP}_3$ -buffer or non-transfected cells loaded with Fluo-4/AM. Images show cells before EGF stimulus (baseline) and the peak of EGF-induced Fluo-4 fluorescence intensity changes. Constructs expression were checked by detection of monomeric red fluorescent protein (mRFP). **B**, histogram compiling Fluo-4 fluorescence intensity peak in cytosolic and nuclear regions on non-transfected (n=41), cytosolic (n=40) and nuclear  $\text{InsP}_3$ -buffer (n=40) expressing cells upon EGF stimulus. Nuclear but not cytosolic  $\text{InsP}_3$ -buffer diminished the peak of EGF response in both compartments. \*p<0.05. **C**, bar graph represents the amount of  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  of nucleus isolated from control or EGF-stimulated hepatocytes (n=3). 5 minutes of EGF stimulation reduces in  $64 \pm 15\%$  nuclear  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ .

**Figure 3: EGF induces nuclear PKC activity.** **A**, confocal images of SKHep-1 expressing NucCKAR shows CFP and YFP emission as well as a transmitted image of the cell, confirming nuclear localization of the construction. **B**, representative tracings of NucCKAR CFP/YFP emission normalized by baseline, shows changes in emission ratio on 30 minutes phorbol 12-13-dibutyrate (PdBu) (n=6), EGF (n=10) or arginine vasopressin (AVP) (n=5) perfusion. **C**, bar graph compiling the average results showed in B. PdBu, and EGF induces NucCKAR FRET ratio changes more than AVP. **D**, bar graph represents the average of NucCKAR FRET ratio change in EGF-stimulated cells treated with 250nM Go6983 (n=8) or not (n=10). PKC inhibitor Go6983 blocks EGF-induced NucCKAR FRET changes. \*p<0.05.

**Figure 4: PLC $\gamma$ 1 is a cytosolic and PLC $\delta$ 4 is a nuclear protein.** **A**, representative confocal images of SKHep-1 cells before and after EGF stimulation showing PLC $\gamma$ 1 in red, EGFR in green and TO-PRO nuclear dye in blue. Merged images reveal that PLC $\gamma$ 1 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 PLC $\delta$ 4 in red, which is exclusively intra-nuclear (n=15 cells). **C**, Western blot showing PLC $\gamma$ 1 and PLC $\delta$ 4 expressions in non-nuclear and nuclear fractions from control or EGF-stimulated hepatocytes.  $\alpha$ -tubulin and lamin B1 were used as purity control for nuclear and non-nuclear fractions. Indicated kDa values represent the position of the reference bands from pre-stained protein standard. PLC $\gamma$ 1 and PLC $\delta$ 4 subcellular localization are not altered by EGF stimulation for 10 min in hepatocyte (n=3). **D**, tracings of normalized amounts of PLC $\gamma$ 1 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 PLC $\delta$ 4 mediates EGF-induced nuclear PI(4,5)P $_2$  depletion and Ca $^{2+}$  signals.** **A**, western blot showing PLC $\gamma$ 1 and PLC $\delta$ 4 expression in SKHep-1 cells under control or siRNA-treated conditions.  $\alpha$ -tubulin was used as loading control. The molecular weight of each protein analyzed is on the right side. **B**, graphs show the percentage of PI(4,5)P $_2$  in nuclei isolated from siRNA-treated SKHep-1 cells related to control cells (n=3). \*\*p<0.01 **C**, bar graph compiling peaks



of Fluo-4 fluorescence intensity in EGF-stimulated, control siRNA-treated (n=19), PLC $\gamma$ 1 siRNA-treated (n=30) or PLC $\delta$ 4 siRNA-treated (n=50) SKHep-1. Fluorescence changes over time of EGF stimulation were normalized and represented as fluorescence intensity (F) by baseline fluorescence (F<sub>0</sub>) multiplied by 100. \*\*p<0.01.

**Figure 6: Knockdown of PLC $\delta$ 4 diminished cell growth by decreasing cyclins**

**A, B1, and H without affecting cell death.** **A**, effects of PLC $\delta$ 4 depletion on cell proliferation. Live cell counts were determined at 0, 48 e 72 hours after transfection \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. **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, and the means were used for statistical analysis. All groups were compared to the control siRNA cells. Staurosporine groups differ from control siRNA and PLC $\delta$ 4 siRNA for all variables measured. #, \*\*p<0.01; ##, \*\*\*p<0.001. **C**, cell cycle distribution after propidium iodide staining. The cell cycle status was expressed as a percentage of events from a total of 5000 events (n=3). \*\*\*p<0.001. **D**, 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 loading control. Representative image of 3 independent experiments. **E**, quantification of the western blots of cyclins that where normalized with the expression of  $\alpha$ -tubulin (n =3). \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

**Figure 7: EGF triggers nuclear PI(4,5)P<sub>2</sub> hydrolysis, local InsP<sub>3</sub> production, and Ca<sup>2+</sup> release through intra-nuclear PLC $\delta$ 4 which mediate 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 can be 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  $\text{Ca}^{2+}$  release in the nucleoplasm. DAG can activate nuclear-resident PKCs.  $\text{Ca}^{2+}$  and PKCs can activate downstream targets which ultimately result in cell proliferation.

**Supplementary Figure 1:** Representative images of cells treated with staurosporine for 4 or 24 hours and cells under control or siRNA-treated conditions. Live cells were labeled with Annexin V-FITC (green) to evaluate apoptotic cells, and propidium iodide (red) was used as a marker of necrotic cells. The merged images show doubled-labeled cells.

## References

- Akutagawa, A., K. Fukami, Y. Banno, T. Takenawa, R. Kannagi, Y. Yokoyama, K. Oda, M. Nagino, Y. Nimura, S. Yoshida, and K. Tamiya-Koizumi. 2006. Disruption of phospholipase Cdelta4 gene modulates the liver regeneration in cooperation with nuclear protein kinase C. *J Biochem.* 140:619–625. doi:10.1093/jb/mvj194.
- De Angelis Campos, A.C., M.A. Rodrigues, C. de Andrade, A.M. de Goes, M.H. Nathanson, and D.A. Gomes. 2011. Epidermal growth factor receptors destined for the nucleus are internalized via a clathrin-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* doi:10.1016/j.bbrc.2011.07.100.
- Asano, M., K. Tamiya-Koizumi, Y. Homma, T. Takenawa, Y. Nimura, K. Kojima, and S. Yoshida. 1994. Purification and characterization of nuclear phospholipase C specific for phosphoinositides. *J. Biol. Chem.* 269:12360–12366.
- Bading, H. 2013. Nuclear calcium signalling in the regulation of brain function. *Nat. Rev. Neurosci.* 14:593–608. doi:10.1038/nrn3531.
- Berridge, M.J. 2016. The Inositol Trisphosphate/Calcium Signaling Pathway in Health and Disease. *Physiol. Rev.* 96:1261–1296. doi:10.1152/physrev.00006.2016.
- Bootman, M.D., C. Fearnley, I. Smyrniak, F. MacDonald, and H.L. Roderick. 2009. An update on nuclear calcium signalling. *J. Cell Sci.* 122:2337–2350. doi:10.1242/jcs.028100.
- Boyer, J.L., J.M. Phillips, and J. Graf. 1990. Preparation and specific applications of isolated hepatocyte couplets. *Methods Enzym.* 192:501–516.
- Brand, T.M., M. Iida, C. Li, and D.L. Wheeler. 2011. The nuclear epidermal growth factor receptor signaling network and its role in cancer. *Discov Med.* 12:419–432.
- Carpenter, G., and H.J. Liao. 2009. Trafficking of receptor tyrosine kinases to the nucleus. *Exp. Cell Res.* 315:1556–1566. doi:10.1016/j.yexcr.2008.09.027.
- Echevarria, W., M.F. Leite, M.T. Guerra, W.R. Zipfel, and M.H. Nathanson. 2003. Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol.* 5:440–446. doi:10.1038/ncb980.
- Faenza, I., R. Fiume, M. Piazzini, A. Colantoni, and L. Cocco. 2013. Nuclear inositide specific phospholipase C signalling - Interactions and activity. *FEBS J.* 280:6311–6321. doi:10.1111/febs.12450.
- Faenza, I., G. Ramazzotti, A. Bavelloni, R. Fiume, G.C. Gaboardi, M.Y. Follo, R.S. Gilmour, A.M. Martelli, K. Ravid, and L. Cocco. 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, C.C.F., J.A.Q.A. Faria, M. Kunrath-Lima, M.C.D. Miranda, M.I.A. de Melo, A.D.F. Ferreira, M.A. Rodrigues, and D.A. Gomes. 2017. 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.* doi:10.1016/j.jsb.2017.12.007.
- Fima, E., M. Shtutman, P. Libros, A. Missel, G. Shahaf, G. Kahana, and E. Livneh. 2001. PKCeta 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., G. Ramazzotti, G. Teti, F. Chiarini, I. Faenza, G. Mazzotti, A.M. Billi, and L. Cocco. 2009. Involvement of nuclear PLCbeta1 in lamin B1 phosphorylation

- and G2/M cell cycle progression. *FASEB J.* 23:957–966. doi:10.1096/fj.08-121244.
- Follo, M.Y., C. Finelli, S. Mongiorgi, C. Clissa, C. Bosi, N. Testoni, F. Chiarini, G. Ramazzotti, M. Baccarani, A.M. Martelli, L. Manzoli, G. Martinelli, and L. Cocco. 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.
- Gallegos, L.L., M.T. Kunkel, and A.C. Newton. 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.
- Gomes, D.A., M.F. Leite, A.M. Bennett, and M.H. Nathanson. 2006. Calcium signaling in the nucleus. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 84:325–332. doi:10.1139/y05-117.
- Gomes, D.A., M.A. Rodrigues, M.F. Leite, M. V Gomez, P. Varnai, T. Balla, A.M. Bennett, and M.H. Nathanson. 2008. c-Met must translocate to the nucleus to initiate calcium signals. *J. Biol. Chem.* 283:4344–51. doi:10.1074/jbc.M706550200.
- Hardingham, G.E., S. Chawla, C.M. Johnson, and H. Bading. 1997. Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature.* 385:260–265. doi:10.1038/385260a0.
- Huang, W., V. Mishra, S. Batra, I. Dillon, and K.D. Mehta. 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, W.C., Y.J. Chen, L.Y. Li, Y.L. Wei, S.C. Hsu, S.L. Tsai, P.C. Chiu, W.P. Huang, Y.N. Wang, C.H. Chen, W.C. Chang, W.C. Chang, A.J. Chen, C.H. Tsai, and M.C. Hung. 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.
- Huo, L., Y.N. Wang, W. Xia, S.C. Hsu, C.C. Lai, L.Y. Li, W.C. Chang, Y. Wang, M.C. Hsu, Y.L. Yu, T.H. Huang, Q. Ding, C.H. Chen, C.H. Tsai, and M.C. Hung. 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.
- Kaproth-Joslin, K.A., X. Li, S.E. Reks, and G.G. Kelley. 2008. Phospholipase C delta 1 regulates cell proliferation and cell-cycle progression from G1- to S-phase by control of cyclin E-CDK2 activity. *Biochem J.* 415:439–448. doi:10.1042/BJ20080233.
- Kim, H., P.G. Suh, S.H. Ryu, and S.H. Park. 1999. Assignment of the human PLC delta4 gene (PLCD4) to human chromosome band 2q35 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 87:254–5. doi:10.1159/000015437.
- Kumar, V., Y.J. Jong, and K.L. O'Malley. 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.
- Lee, S.B., and S.G. Rhee. 1996. Molecular cloning, splice variants, expression, and purification of phospholipase C-delta 4. *J. Biol. Chem.* 271:25–31.
- Leung, D.W., C. Tompkins, J. Brewer, A. Ball, M. Coon, V. Morris, D. Waggoner, and

- J.W. Singer. 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., M. Iida, E.F. Dunn, A.J. Ghia, and D.L. Wheeler. 2009. Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab. *Oncogene*. 28:3801–3813. doi:10.1038/onc.2009.234.
- Liccardi, G., J.A. Hartley, and D. Hochhauser. 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, S.Y., K. Makino, W. Xia, a Matin, Y. Wen, K.Y. Kwong, L. Bourguignon, and M.C. Hung. 2001. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat. Cell Biol*. 3:802–8. doi:10.1038/ncb0901-802.
- Liu, N., K. Fukami, H. Yu, and T. Takenawa. 1996a. A new phospholipase C delta 4 is induced at S-phase of the cell cycle and appears in the nucleus. *J Biol Chem*. 271:355–360.
- Liu, N., K. Fukami, H. Yu, and T. Takenawa. 1996b. 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.
- Manzoli, L., A.M. Billi, S. Rubbini, A. Bavelloni, I. Faenza, R.S. Gilmour, S.G. Rhee, and L. Cocco. 1997. Essential role for nuclear phospholipase C beta1 in insulin-like growth factor I-induced mitogenesis. *Cancer Res*. 57:2137–2139.
- Marsh, M., and A. Helenius. 2006. Virus entry: Open sesame. *Cell*. 124:729–740. doi:10.1016/j.cell.2006.02.007.
- Martelli, A.M., C. Evangelisti, M. Nyakern, and F.A. Manzoli. 2006. Nuclear protein kinase C. *Biochim Biophys Acta*. 1761:542–551. doi:10.1016/j.bbali.2006.02.009.
- Moccia, F., R. Berra-Romani, S. Tritto, S. Signorelli, V. Taglietti, and F. Tanzi. 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.
- Nagano, K., K. Fukami, T. Minagawa, Y. Watanabe, C. Ozaki, and T. Takenawa. 1999. A novel phospholipase C delta4 (PLCdelta4) splice variant as a negative regulator of PLC. *J. Biol. Chem*. 274:2872–9.
- Nakamura, Y., and K. Fukami. 2017. Regulation and physiological functions of mammalian phospholipase C. *J. Biochem*. 161:315–321. doi:10.1093/jb/mvw094.
- Parekh, D.B., W. Ziegler, and P.J. Parker. 2000. Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J*. 19:496–503. doi:10.1093/emboj/19.4.496.
- Poli, A., I. Faenza, F. Chiarini, A. Matteucci, J.A. McCubrey, and L. Cocco. 2013. K562 cell proliferation is modulated by PLCbeta1 through a PKCalpha-mediated pathway. *Cell Cycle*. 12:1713–1721. doi:10.4161/cc.24806.
- Poli, A., G. Ramazzotti, A. Matteucci, L. Manzoli, A. Lonetti, P.G. Suh, J.A. McCubrey, and L. Cocco. 2014. A novel DAG-dependent mechanism links PKCa and Cyclin B1 regulating cell cycle progression. *Oncotarget*. 5:11526–11540. doi:10.18632/oncotarget.2578.
- Pusl, T., J.J. Wu, T.L. Zimmerman, L. Zhang, B.E. Ehrlich, M.W. Berchtold, J.B. Hoek, S.J. Karpen, M.H. Nathanson, and A.M. Bennett. 2002. Epidermal growth factor-mediated activation of the ETS domain transcription factor Elk-1 requires nuclear calcium. *J. Biol. Chem*. 277:27517–27. doi:10.1074/jbc.M203002200.
- Ramazzotti, G., I. Faenza, G.C. Gaboardi, M. Piazzini, A. Bavelloni, R. Fiume, L. Manzoli, A.M. Martelli, and L. Cocco. 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.
- Ranty, B., V. Cotelle, J.P. Galaud, and C. Mazars. 2012. Nuclear calcium signaling and its involvement in transcriptional regulation in plants. *Adv Exp Med Biol.* 740:1123–1143. doi:10.1007/978-94-007-2888-2\_51.
- Ratti, S., S. Mongiorgi, G. Ramazzotti, M.Y. Follo, G.A. Mariani, P.G. Suh, J.A. McCubrey, L. Cocco, and L. Manzoli. 2017. Nuclear Inositide Signaling Via Phospholipase C. *J. Cell. Biochem.* 118:1969–1978. doi:10.1002/jcb.25894.
- Rodrigues, M.A., D.A. Gomes, V.A. Andrade, M.F. Leite, and M.H. Nathanson. 2008. Insulin induces calcium signals in the nucleus of rat hepatocytes. *Hepatology.* doi:10.1002/hep.22424.
- Rodrigues, M.A., D.A. Gomes, M.F. Leite, W. Grant, L. Zhang, W. Lam, Y.-C. Cheng, A.M. Bennett, and M.H. Nathanson. 2007. Nucleoplasmic calcium is required for cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 282:17061–8. doi:10.1074/jbc.M700490200.
- Sandvig, K., and B. Van Deurs. 2002. Transport of protein toxins into cells: Pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. *FEBS Lett.* 529:49–53. doi:10.1016/S0014-5793(02)03182-4.
- Shi, Y., Y. Tao, Y. Jiang, Y. Xu, B. Yan, X. Chen, L. Xiao, and Y. Cao. 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.
- Wang, S.C., Y. Nakajima, Y.L. Yu, W. Xia, C.T. Chen, C.C. Yang, E.W. McIntush, L.Y. Li, D.H. Hawke, R. Kobayashi, and M.C. Hung. 2006. Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability. *Nat Cell Biol.* 8:1359–1368. doi:10.1038/ncb1501.
- Wang, Y.N., and M.C. Hung. 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.

- 8.7. Artigo “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.”, Faraco et al., 2017.**



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Structural Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yjsbi](http://www.elsevier.com/locate/yjsbi)

## 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

Camila Cristina Fraga Faraco<sup>a</sup>, Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria<sup>b</sup>, Marianna Kunrath-Lima<sup>a</sup>, Marcelo Coutinho de Miranda<sup>a</sup>, Mariane Izabella Abreu de Melo<sup>a</sup>, Andrea da Fonseca Ferreira<sup>a</sup>, Michele Angela Rodrigues<sup>c,1</sup>, Dawidson Assis Gomes<sup>a,\*,1</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

EGF  
Nucleus  
Translocation  
Kinetics  
Super-resolution microscopy

### ABSTRACT

Nuclear Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) has been associated with worse prognosis and treatment resistance for several cancer types. After Epidermal Growth Factor (EGF) binding, the ligand-receptor complex can translocate to the nucleus where it functions in oncological processes. By three-dimensional quantification analysis of super-resolution microscopy images, we verified the translocation kinetics of fluorescent conjugated EGF to the nucleus in two mesenchymal cell types: human adipose tissue-derived stem cells (hASC) and SK-HEP-1 tumor cells. The number of EGF clusters in the nucleus does not change after 10 min of stimulation with EGF in both cells. The total volume occupied by EGF clusters in the nucleus of hASC also does not change after 10 min of stimulation with EGF. However, the total volume of EGF clusters increases only after 20 min in SK-HEP-1 cells nuclei. In these cells the nuclear volume occupied by EGF is 3.2 times higher than in hASC after 20 min of stimulation, indicating that translocation kinetics of EGF differs between these two cell types. After stimulation, EGF clusters assemble in larger clusters in the cell nucleus in both cell types, which suggests specific sub-nuclear localizations of the receptor. Super-resolution microscopy images show that EGF clusters are widespread in the nucleoplasm, and can be localized in nuclear envelope invaginations, and in the nucleoli. The quantitative study of EGF-EGFR complex translocation to the nucleus may help to unravel its roles in health and pathological conditions, such as cancer.

### 1. Introduction

Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) is a member of ERBB family of receptor tyrosine kinase, which is expressed in cells of ectodermal and mesodermal lineage (Citri and Yarden, 2006). The interaction of ligands, such as the Epidermal Growth Factor (EGF), with EGFR leads to the formation of asymmetric homodimers or heterodimers with other ERBB receptors and, subsequently, to their activation by autophosphorylation of tyrosine residues in their C-terminal region (Lemmon et al., 2014). Activated EGFR can initiate intracellular signals for cell adhesion, migration, proliferation, and oncogenesis (Yarden and Sliwkowski, 2001).

Increased expression of EGFR and mutations in its gene are associated with neoplasms such as non-small-cell lung cancer,

glioblastomas, breast cancer, and head and neck squamous cell carcinoma (reviewed by Yarden and Pines, 2012). EGF family proteins have been documented as potential biomarkers for disease prognosis, and for progression of different tumor types (Briffa et al., 2015; Docea et al., 2013; Loupakis et al., 2014; Miyata et al., 2017; Olsen et al., 2012). Cancer therapies that inhibit EGFR signaling have been developed with beneficial results for patient lifespan; however, tumors ultimately acquire resistance to them, leading to the need for treatment change (Roskoski, 2014). Thus, studies of EGFR biology could unveil mechanisms of therapy resistance, and potential methods to overcome the issue.

It has been observed that after ligand interaction, the EGF-EGFR complex can redistribute in the membrane forming clusters that are endocytosed in coated vesicles to the cytosol (Gorden et al., 1978;

\* Corresponding author at: Av. Antônio Carlos, 6627, Instituto de Ciências Biológicas, Q4-238, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil.

E-mail address: [dawidson@icb.ufmg.br](mailto:dawidson@icb.ufmg.br) (D.A. Gomes).

<sup>1</sup> Contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2017.12.007>

Received 21 September 2017; Received in revised form 8 December 2017; Accepted 11 December 2017  
1047-8477/ © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.



Haigler et al., 1979). The internalization is important for signaling control of the receptor, and for its transport to other cell compartments, such as mitochondria, Golgi, endoplasmic reticulum, and nucleus (Wang and Hung, 2012). Inside the nucleus, the EGFR acts as a transcriptional regulator, signal transducer, and protein modulator, leading to cell proliferation, DNA replication and repair, and tumor progression (reviewed in Lee et al., 2015).

Nuclear EGFR is mainly observed in highly-proliferative cells, as in tumor tissues (Lin et al., 2001; Lo et al., 2006b; Pereira et al., 2015; Rodrigues et al., 2016). It is associated with poor prognosis (Hoshino et al., 2007; Li et al., 2012; Lo et al., 2005; Traynor et al., 2013; Xia et al., 2009) and therapy resistance (Huang et al., 2011; Lee et al., 2015) in various types of cancer. Although components participating in the nuclear translocation of EGFR have been unveiled (Campos et al., 2011; Hsu and Hung, 2007; Liao and Carpenter, 2007; Lin et al., 2001; Lo et al., 2006a; Wang et al., 2010a,b), little is known about the translocation kinetics and nuclear compartmentalization after stimulation, and how these profiles vary in cells with different proliferative and oncogenic capacity.

Protein inside cellular compartments can be analyzed and quantified by different approaches, such as cell fractioning following protein extraction, transmission electron microscopy, and light microscopy. Western blot of cell fractions can be performed to verify the EGFR nuclear translocation after EGF stimulation over time (Campos et al., 2011; Faria et al., 2016; Lin et al., 2001). Although this technique enables the analysis of the expression profile, it is not possible to visualize the localization of the protein complexes inside cell compartments. Electron microscopy allows precise protein visualization inside cells, but has limitations regarding volume quantifications of the clusters.

On the other hand, light microscopy is a powerful approach to achieve protein intracellular localization and quantification, with recent advances in both aspects (Hamilton, 2009). Modern microscopes allows acquisition of higher resolution images than conventional confocal microscopy (Weisshart, 2014), and new image analysis methods are being developed to fulfill users requirements for protein quantifications (Coffman and Wu, 2012; Rizk et al., 2014; Szoboszlai et al., 2017). Although some approaches use live cells to track intracellular EGFR (Campos et al., 2011; Du et al., 2013), photobleaching and poor spatial and temporal resolution may affect the localization and quantification of proteins over time (Hamilton, 2009). Thus, new methods for quantification of molecules using super-resolution images of fixed cells could generate more precise data to verify EGFR kinetics and subcellular localization.

Given the importance of studying EGF-EGFR transport for a better understanding of its association with tumor development and therapy resistance, this study aims to use an innovative approach to quantify nuclear EGF clusters after increasing times of stimulation in tumor cells, and to compare them to non-tumor cells of the same embryonic origin. The comparison might unveil aspects of EGF-EGFR biology in normal and abnormal contexts.

## 2. Material and methods

### 2.1. Cell culture

Mesenchymal stem cells (hASC) were extracted from human adipose tissue freely donated by patients who underwent liposuction and abdominoplasty, as approved by the “Universidade Federal de Minas Gerais” (UFMG) Research Ethics Committee (COEP: 55698116.2.0000.5149). Cell extraction was performed according to Zuk et al. (2001). Briefly, adipose tissue samples were washed twice in phosphate buffered saline (PBS; pH 7.4, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and were digested by 0.1% collagenase solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 37 °C for 45 min. The samples were centrifuged at 300 × g for 10 min at 25 °C, and the pellet was resuspended in sterile Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM; Thermo Fisher Scientific) containing

10% fetal bovine serum (FBS; Thermo Fisher Scientific) and 1% penicillin/streptomycin/amphotericin B solution (PSA; Sigma-Aldrich). Cells were transferred to culture flasks and kept in a humid atmosphere at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. SK-HEP-1 cells were obtained from American Type Culture Collection. These cells were cultured in sterile DMEM with 10% FBS and 1% PSA and kept in a humid atmosphere at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Culture medium from both cell cultures was changed every 3 days. For all the experiments performed hASC was in passage 3–5.

### 2.2. Western blot

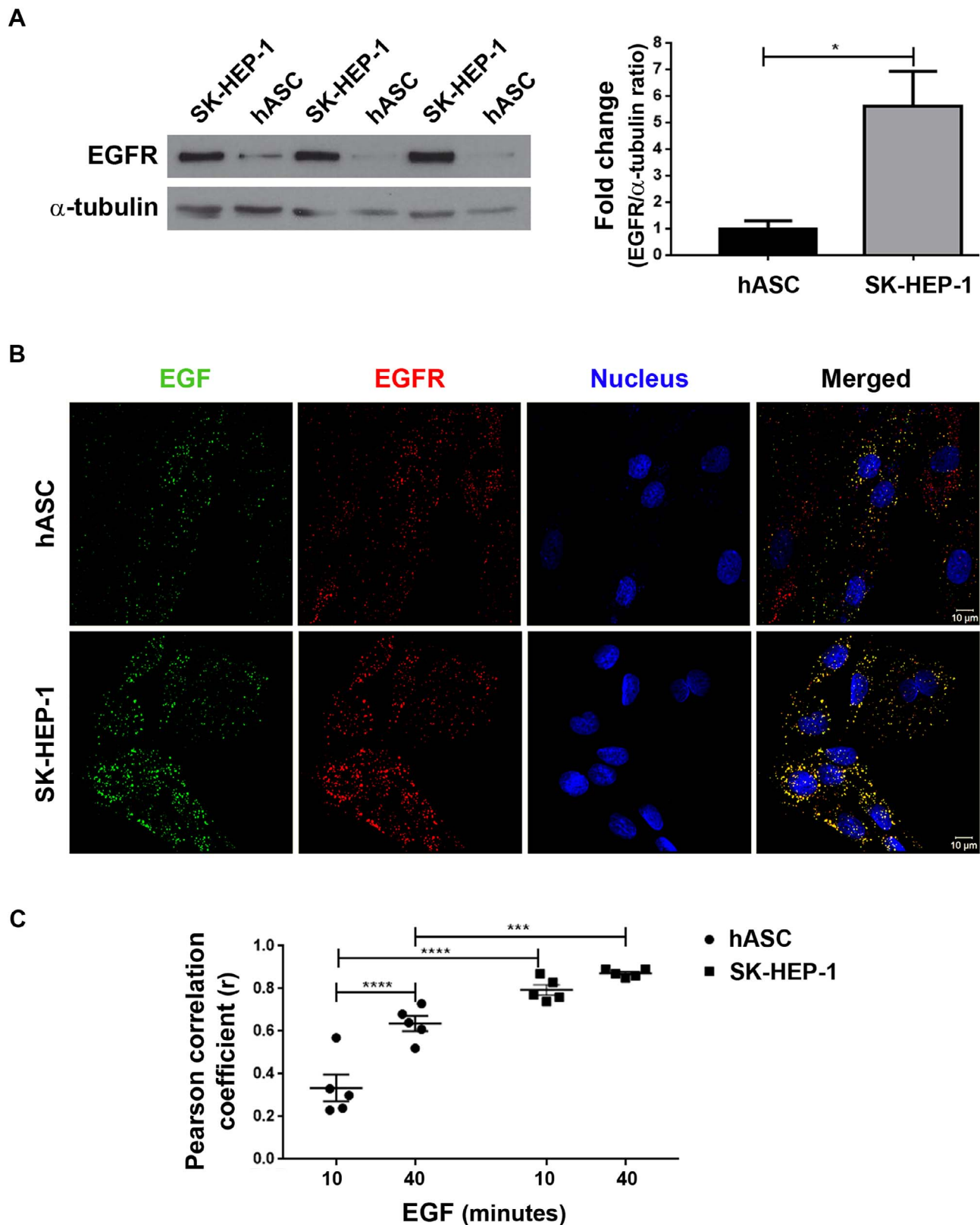
hASC and SK-HEP-1 plated cells were washed twice with cold PBS and were lysed by NETN buffer (150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 0.5% Nonidet P-40) supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich). After cell scraping, cells were collected, homogenized by vortex and sonicated. The samples were incubated on ice for 10 min and centrifuged at 16,000 × g for 20 min at 4 °C. Supernatants were collected and proteins were quantified by Bradford method (Bradford, 1976). Immunoblotting was performed as previously described (Campos et al., 2011). Briefly, samples were submitted to polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and proteins were transferred to 0.22 μm polyvinylidene fluoride membranes (BioRad, Hercules, CA, USA) using a Trans-Blot<sup>®</sup> SD semi-dry transfer cell (BioRad). Anti-EGFR (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) and anti-α tubulin (Sigma-Aldrich) were used as primary antibodies. Membranes were incubated with peroxidase-conjugated secondary antibodies and revealed with enhanced chemiluminescence solution ECL (Thermo Fisher Scientific) in BioMax<sup>®</sup> MR (Carestream/Kodak) films. Quantitative analyses of the blotting were performed using Image J software (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

### 2.3. Super-resolution microscopy

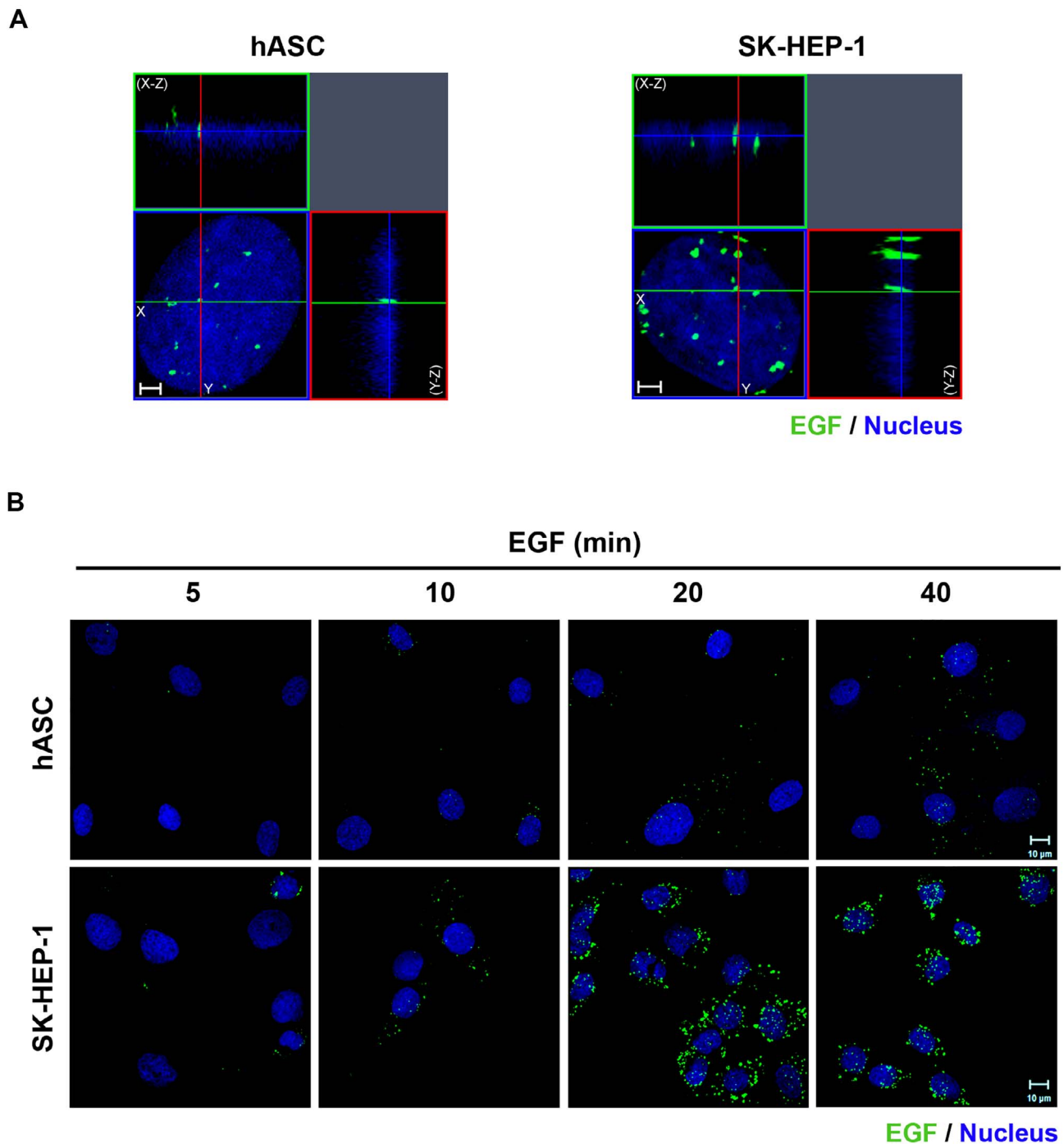
Cells plated on sterile cover slips were incubated in medium without FBS overnight and were stimulated with 200 ng/mL of EGF labeled with Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (EGF-488) (Thermo Fisher Scientific) for 0 (control), 5, 10, 20 and 40 min. After removal of the stimulus, cells were washed with PBS, fixed with formaldehyde 3.7% and permeabilized with 0.05% Triton X-100 solution. Cells were blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) solution containing 5% goat serum and were incubated at 4 °C overnight with primary antibodies: monoclonal anti-Fibrillarin (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), monoclonal anti-lamin B2 (Thermo Fisher Scientific), monoclonal anti-EGFR (Millipore, Temecula, CA, USA). In the other day, cells were labeled with a secondary antibody (Alexa Fluor<sup>®</sup> 555 and Alexa Fluor<sup>®</sup> 647) and with Hoechst 33258 (Thermo Fisher Scientific) at room temperature for 1 h. The coverslips were washed with PBS and slides were assembled using Prolong Gold Antifade Reagent (Thermo Fisher Scientific). Cells were analyzed in “Centro de Aquisição e Processamento de Imagens da UFMG” using the LSM 880 with the Airyscan detector (Carl Zeiss, Jena, Germany). For image acquisition, it was used 63 x, 1.4NA objective lens. The lasers used were: Diode 405 nm (excitation of Hoechst), Argonium 488 nm (excitation of Alexa Fluor<sup>®</sup> 488), HeNe 543 nm (excitation of Alexa Fluor<sup>®</sup> 555) and HeNe 633 nm (excitation of Alexa Fluor<sup>®</sup> 647). Labels were detected and processed using the Airyscan system, which enables resolution below the light diffraction limit. Images of serial optical sections were acquired at 1024 × 1024 pixels using 16-bits color depth.

### 2.4. Three-dimensional quantification of EGF clusters

EGF-488-stimulated cells with labeled nucleus were selected according to their morphology and integrity using bright field images. Super-resolution images of the nucleus of those cells were analyzed using the software Image Pro Plus Premier 3D (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA). By means of the “iso surface” function, a three-



**Fig. 1.** EGFR colocalizes with labeled EGF in both cell types. **A**- Western blot of proteins extracted from both cell types cultured for 12–16 h in medium without FBS followed by densitometric analysis of the protein bands related to the expression of EGFR (175 kDa). The expression of  $\alpha$ -tubulin (50 kDa) was used as a normalizer. Data were expressed as fold change of hASC bands fluorescence intensity. Statistical test: Student's T test; N = 3 samples; \*,  $p < .05$ . **B**- Super-resolution images of hASC and SK-HEP-1 cells stimulated for 40 min with 200 ng/mL of EGF conjugated to Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (in green). After stimulation, cells were stained for EGFR (in red) and nucleus (in blue). The merged images show the colocalization between EGF and EGFR in yellow. Scale bar: 10  $\mu$ m. **C**- Graph showing a Pearson correlation coefficient (r) of colocalization analysis for cells of both types stimulated by 10 and 40 min with EGF. Statistical test: Two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test; N = 5 images for each group; \*\*\*,  $p < .001$ ; \*\*\*\*,  $p < .0001$ . (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



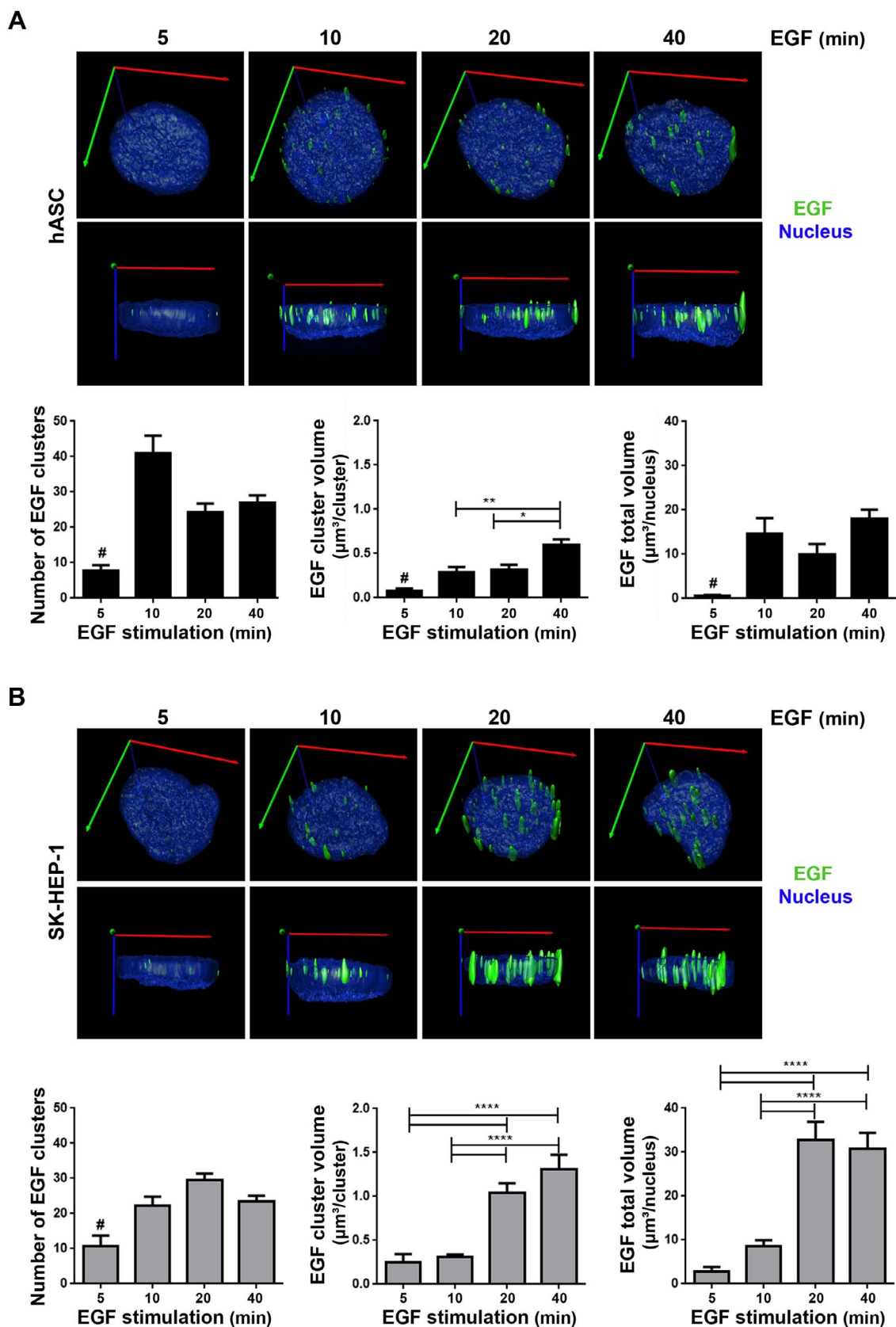
**Fig. 2.** EGF-488 clusters translocate to the nucleus in hASC and SK-HEP-1 cells. **A-** Three-dimensional reconstruction of optical sections of the hASC and SK-HEP-1 were performed, after cells were stimulated for 40 min with EGF conjugated with Alexa Fluor® 488 (in green). X-Z sections are shown at the top, and Y-Z sections are shown on the right of each image. Images are representative of 41 (hASC) and 37 (SK-HEP-1) cells. Nuclei are in blue. Scale bar: 2  $\mu$ m. **B-** Cells were stimulated with EGF conjugated with Alexa Fluor® 488 for 5, 10, 20 and 40 min (in green), had their nuclei labeled with Hoechst (in blue) and were analyzed by super-resolution microscopy. Images are representative of 8 to 10 fields. Scale bar: 10  $\mu$ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

dimensional rendered surface was created for EGF and nuclei labels and it was adjusted according to the fluorescent structures in the original image. Cells stimulated for 40 min were used to determine a threshold for the minimum pixel intensity considered as a label, and not as background. For each of the images, an inferior threshold of fluorescence intensity to identify a pixel as belonging to a 3D EGF cluster was determined. The average of those thresholds for each cell type was used to generate the three-dimensional EGF clusters of all the other EGF-stimulated cells and control (non-stimulated) cells. The number of EGF clusters, the volume of each cluster and the total volume (given by the

number of clusters multiplied by the average volume of each cluster) of EGF clusters per cell nucleus were calculated according to the 3D surface created for both cell types.

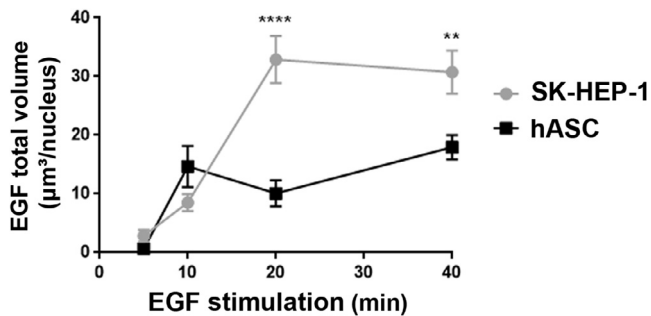
#### 2.5. Colocalization analysis between EGF and EGFR

Cells stimulated with EGF-488 for 10 and 40 min and labeled with anti-EGFR antibody were used for a colocalization analysis between EGF and EGFR, which was performed according to Everett, M. using the ZEN Black edition software (Carl Zeiss). Briefly, horizontal and vertical



**Fig. 3.** Three-dimensional quantification analysis of EGF clusters in hASC (A) and SK-HEP-1 (B). A and B: top images - Super-resolution microscopy images of cells stimulated by 5, 10, 20 and 40 min with EGF complexed to Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 were used to create a rendered surface of the nucleus (blue) and EGF clusters (green) in three dimensions. Axes represented in the images: X (red), Y (green) and Z (blue). A and B: bottom images- The number of EGF clusters in each cell, the mean volume of each cluster and the total volume occupied by EGF clusters in each cell nuclei were analyzed. Statistical test: Kruskal-Wallis with Dunn post-test. Bars: mean  $\pm$  standard error; #: Differs from all other groups with  $p < .05$ ; \*:  $p < .05$ ; \*\*:  $p < .01$ ; \*\*\*\*:  $p < .0001$ . N = hASC: 28 (5 min), 40 (10 min), 38 (20 min), 41 (40 min); SK-HEP-1: 21 (5 min), 37 (10 min), 34 (20 min), 37 (40 min). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)





**Fig. 4.** Profile of EGF translocation kinetics to the nucleus differs between hASC and SK-HEP-1. Cells of both cell types were stimulated by 5, 10, 20 and 40 min with EGF complexed to Alexa Fluor<sup>®</sup> 488. The graphic represents the mean  $\pm$  standard error of volume occupied in the nucleus by the EGF clusters in each cell. \*\*:  $p < .01$ ; \*\*\*\*:  $p < .0001$ . Statistical test: Two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test; N = hASC: 28 (5 min), 40 (10 min), 38 (20 min), 41 (40 min); SK-HEP-1: 21 (5 min), 37 (10 min), 34 (20 min), 37 (40 min).

thresholds of the scattered plot were determined using control images, in which only EGF or EGFR were labeled. Threshold values were used to analyze the colocalized pixels of the experimental images in which both ligand and receptor were labeled. Images used in this analysis were originated from serial optical sections reconstruction using the maximum intensity projection mode. Pearson correlation coefficient was calculated for each image using ZEN software.

## 2.6. Statistical analysis

Cluster data in stimulated cells was normalized to non-stimulated cells (background) when nonspecific staining occurred. Only cells with EGF clusters were considered for the analyses. Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparisons test was performed to analyze the parameters of the EGF clusters for each cell type separately. Two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison tests was used to compare the Pearson correlation coefficient and the total volume occupied by clusters in cell nucleus between the cell types. Student-T test was used for densitometric analysis of the blotting. Data are represented as a mean  $\pm$  standard error, and all statistical tests were performed using GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

## 3. Results and discussion

### 3.1. EGFR is expressed and colocalizes with EGF-488 in hASC and SK-HEP-1 cells

Translocation of EGFR to the nucleus is associated with a proliferative and tumor phenotype (Han and Lo, 2012; Lee et al., 2015). Based on the significance of this process in different cell types, the present study aimed to quantify the amount of EGFR that can translocate to the nucleus in a non-tumor cell, and in a tumor cell with mesenchymal origin characteristics. A previous study suggested that SK-HEP-1 is a tumor mesenchymal stem cell since they exhibit expression markers and differentiation capacity similar to adipose and bone marrow derived mesenchymal stem cells (Eun et al., 2014). The present work quantitatively verified the translocation kinetics of EGF clusters conjugated with Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (EGF-488) to the nucleus of cells with a mesenchymal profile, but with different oncogenic capacity. Adipose tissue-derived stem cells used in this work were characterized by expression of mesenchymal surface markers (Supplementary Fig. 1A), and for differentiation into adipogenic and osteogenic lineages (Supplementary Fig. 1B), in accordance with established criteria (Bourin et al., 2013).

Before quantifying nuclear EGF-EGFR clusters in the nucleus, the expression levels of EGFR and its colocalization with EGF-488 in both cell types were verified. Western blot of total protein of non-stimulated

cells showed that SK-HEP-1 cells express a higher quantity of this receptor than hASC (Fig. 1A). Tumor cells are known to show a higher expression of EGFR, which is related to tumorigenic potential (Yarden and Pines, 2012).

Colocalization analysis was performed using super-resolution images of cells stimulated for 10 and 40 min with EGF-488, and subsequently fixed and labeled for EGFR by immunofluorescence. In the merged image of both of cell types (Fig. 1B), yellow clusters were observed, indicating overlap between EGF (green) and EGFR (red). The Pearson's correlation coefficients ( $r$ ) of the pixel-by-pixel covariance in the signal levels of two images (Dunn et al., 2011) for both of cells were positive, indicating that EGF and EGFR are colocalized. The analysis demonstrated a higher colocalization of EGF with EGFR in SK-HEP-1 cells ( $r > 0.79$ ), which may be due to higher EGFR expression levels in this cell model (Fig. 1C). Because EGF-488 was shown to interact with EGFR for both cells, the measurements of EGF-EGFR clusters for all the following experiments were performed based on labeled EGF clusters formed after stimulation with EGF-488.

### 3.2. EGF translocates to the nucleus of hASC and SK-HEP-1 cells

Given that hASC and SK-HEP-1 cells express EGFR that colocalized with EGF, it was possible to verify if labeled EGF translocates to the nucleus after stimulation in both cell types. We have previously shown the translocation kinetics of EGFR for SK-HEP-1 cells by Western Blot analysis (Campos et al., 2011). Here, we show the EGF clusters inside the nucleoplasm of SK-HEP-1 cells and hASC, using the tridimensional reconstruction of optical sections acquired by Airyscan detection of immunofluorescence-labeled cells (Fig. 2A). After 5 min of stimulation with EGF-488, it is possible to verify few EGF clusters in SK-HEP-1 cells and none in hASC cells. With the increase of EGF stimulus time to 10, 20 and 40 min, the clusters visually rise in number or volume in the nuclear region (Fig. 2B).

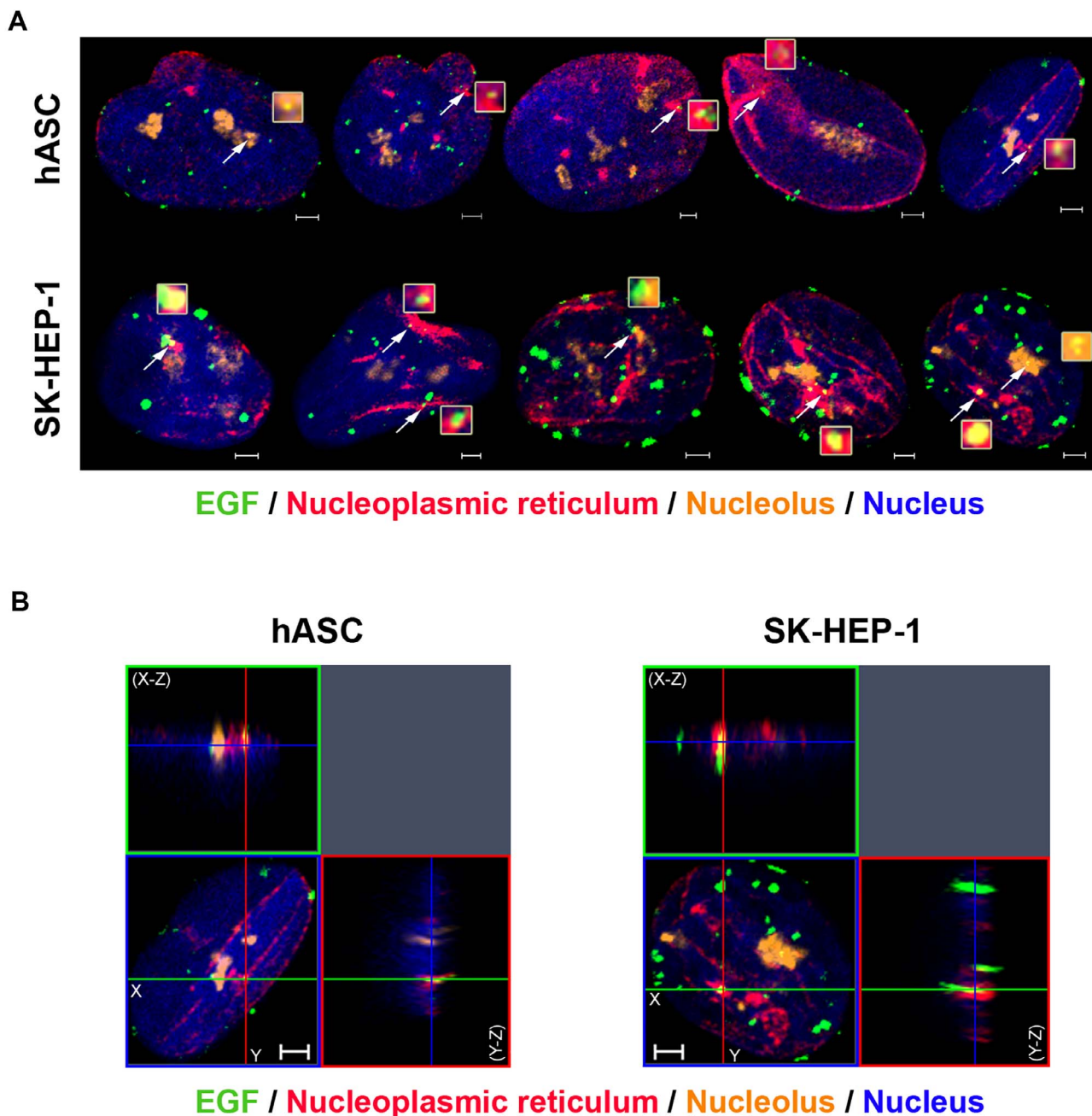
### 3.3. Translocation kinetics of EGF to the nucleus differs quantitatively between SK-HEP-1 and hASC

To quantify fluorescent-labeled three-dimensional EGF clusters in images acquired using LSM 880 with the Airyscan detector, the Image Pro Plus Premier 3D software was used. A three-dimensional rendered surface was created for each nucleus and for each EGF cluster of hASC (Fig. 3A) and SK-HEP-1 (Fig. 3B) cells, and clusters inside nucleoplasm were quantified in number and volume for every stimulation time.

Fig. 3A, left bottom, shows that the number of EGF clusters for hASC increased and stabilized in 10 min of stimulation with EGF. Similarly, the nuclear total volume occupied by EGF clusters reaches its peak between 5 and 10 min of stimulation (Fig. 3A, right bottom). Based on the results, the EGF translocation kinetic analysis for hASC suggests that these cells achieve translocation equilibrium to the nucleus within 10 min of stimulation. The average volume of each EGF cluster increases in 10 min and is higher for cells stimulated for 40 min (Fig. 3A, middle bottom), indicating an agglomeration of clusters inside the nucleus.

Like hASC, the number of EGF clusters in the nucleus of SK-HEP-1 cells increased in 10 min of stimulation (Fig. 3B, left bottom). However, the total volume of EGF cluster in the nucleus was higher for cells stimulated for 20 and 40 min compared to cells stimulated for 5 and 10 min (Fig. 3B, right bottom). Thus, for SK-HEP-1 cells, the quantitative analysis of total EGF volume suggests that EGF translocation from the plasma membrane to the nucleus reach its peak between 10 and 20 min of stimulation. The average volume of each EGF cluster also indicated an agglomeration of clusters inside the nucleus with longer time of stimulation, once it is higher in cells stimulated for 20 and 40 min (Fig. 3B, middle bottom).

The profile of EGF translocation kinetics differs between the two cell types (Fig. 4). In hASC nuclear EGF clusters were visualized at 10 min of



**Fig. 5.** Nuclear EGF localizes in nuclear envelope invaginations and in nucleoli of both cell types. **A**- hASC and SK-HEP-1 cells were stimulated with EGF conjugated to Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 for 40 min and had the nuclear envelope stained with an anti-lamin B2 antibody, the nucleolus stained with an anti-fibrillarin antibody and the nucleus labeled with Hoechst (in blue). The white arrows point to EGF clusters (in green) located in invaginations of the nuclear envelope (in red) and in the nucleolus (in orange). These clusters are in light yellow and in higher magnitude in the inserts next to the arrows. Scale bar: 2  $\mu$ m. **B**- Three-dimensional reconstruction of the serial optical sections of 40 min-stimulated hASC and SK-HEP-1 cells. X-Z sections are shown at the top, and Y-Z sections are shown on the right of each image. Images are representative of 41 (hASC) and 37 (SK-HEP-1) cells. Scale bar: 2  $\mu$ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

stimulus, and after that, the total volume of EGF clusters did not change. In SK-HEP-1 cells nuclear EGF was visualized at 5 min, and there was an increase in the nuclear volume occupied by them at 20 min of stimulus. The difference in translocation kinetics profile between hASC and SK-HEP-1 cells might be related to their differential expression levels of EGFR. The higher expression of EGFR by SK-HEP-1 cells (Fig. 1A) might be responsible for bigger EGF clusters in the nucleus. Therefore, the total volume occupied by EGF clusters in the nucleus of those cells may become larger after longer periods of stimulus. On the other hand, hASC expresses less EGFR, which might be associated with lower EGF internalization and achievement of translocation equilibrium within 10 min of stimulus. Additionally, translocation of

EGF-EGFR complexes might reflect the different phenotypes of the cells analyzed. Investigations into specific and differential functions of nuclear EGF-EGFR in each cell type are necessary to explain the pattern of EGF translocation kinetics found in this study.

#### 3.4. EGF has a diffuse distribution in the nucleoplasm, and may be found in the nucleoplasmic reticulum and nucleoli of hASC and SK-HEP-1 cells

The agglomeration of EGF clusters into larger clusters suggested by the quantitative three-dimensional analysis for both cell types (Fig. 3) might indicate that EGF-EGFR complexes have preferential localization in nuclear organelles that could be related to their transport to the

nucleus, or their function in specific nuclear compartments. A model of EGFR translocation to the nucleus suggests that the process occurs via integral trafficking from the endoplasmic reticulum to the nuclear envelope transport (INTERNET), in which the EGFR passes through an endomembrane pathway until reaching the inner nuclear membrane (INM), where it associates with Sec61 $\beta$ , which participates in the translocation of EGFR to the nucleoplasm (Wang et al., 2010b, 2012). It is possible that the nucleoplasmic reticulum participates in the translocation process because it is composed of invaginations of nuclear envelope membranes inside the nucleoplasm (reviewed by Malhas et al., 2011).

To verify if EGF clusters are localized in nucleoplasmic reticulum and in the nucleolus, which might be associated with the nucleoplasmic reticulum (Bourgeois et al., 1979; Malhas et al., 2011), we stimulated cells with EGF-488 and labeled the nuclear envelope and the nucleolus using immunofluorescence. Super-resolution images of nuclei of both hASC and SK-HEP-1 cells show the presence of EGF clusters in nuclear envelope invaginations and in the nucleolus (Fig. 5A). Three-dimensional reconstruction of serial optical sections of the cells confirms the localization of EGF clusters in those organelles, which reside inside the nucleoplasm (Fig. 5B). This result suggests that the nucleoplasmic reticulum might be involved in the translocation process of EGF-EGFR to the nucleus. EGF-EGFR complexes might have specific functions in the nucleolus, similar to what was suggested for ERBB2 (Li et al., 2011). We observed EGFR either in the nucleoplasm or nucleoplasmic reticulum of tumor samples. For example, EGFR was identified in the nucleoplasm of unicystic and multicystic ameloblastomas, and in the inner nuclear membrane in spontaneous canine model of invasive micropapillary carcinoma of the mammary gland (Pereira et al., 2015; Rodrigues et al., 2016). In general, EGF clusters are distributed around the nucleoplasm, not only in the organelles analyzed. Other nuclear compartments should be labeled to verify if EGF-EGFR complexes are present in different nuclear organelles and further studies are required to investigate the functional relevance of the differential nuclear localization of the complexes.

#### 4. Conclusions

The Airyscan detector allows acquisition of three-dimensional images with higher lateral and axial resolution compared to conventional confocal microscopy (Weisshart, 2014), making it a powerful technique to quantitatively analyze molecule distribution inside cells. Here, we showed that the quantification of EGF-488 clusters using a three-dimensional analysis of super-resolution images was effective for analyzing their translocation kinetics to the nucleus in hASC and SK-HEP-1 cells.

EGF-EGFR translocation was previously observed in tumor cell lines, and its function in the cell nucleus is associated with transcriptional regulation of genes such as cyclin D1 (Lin et al., 2001), Aurora-A (Hung et al., 2008), and STAT1 (Han et al., 2013). Furthermore, nuclear EGFR is associated with phosphorylation signaling (Wang et al., 2006), and can interact with DNA repair proteins (Dittmann et al., 2005). In this study, we evaluated and compared the kinetics profile of EGF-488 translocation to the nucleus in hASC and SK-HEP-1 cells, both of mesenchymal origin. We verified that the translocation equilibrium might occur earlier for hASC than for SK-HEP-1 cells, which show an increase of nuclear EGF cluster volume at later times of stimulation. Differences in the translocation kinetics profile of the two cell types might be associated with the higher EGFR expression shown by SK-HEP-1 or to unknown specific functions of the EGF-EGFR in the nucleus of this tumor cell type.

The agglomeration of EGF clusters in the nucleus over time suggests that they have preferable sub-nuclear localization that might be related to other functions. We observed that EGF clusters are diffusely widespread in the nucleoplasm and are also localized in nucleoplasmic reticulum of both cell types. The finding indicates possible involvement of

the nucleoplasmic reticulum in EGF-EGFR translocation to the nucleus (Malhas et al., 2011), which is also involved in EGF-EGFR trafficking (Wang et al., 2012). EGF-EGFR clusters were also found in nucleoli of both cell types, which suggest new roles of the complex in this nuclear compartment. Further investigations into the functions of the nucleoplasmic reticulum, nucleoli, and other nuclear organelles in EGF-EGFR translocation are required to better understand their roles.

#### Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Elio Anthony Cino for advice and comments. The microscopic data shown in this work was obtained using the microscopes of the “Centro de Aquisição e Processamento de Imagens” (CAPI- ICB/UFMG). This work was supported by the NIH grant 1R03TW008709 and by grants from the “INCT-Regenera,” “Rede Mineira de Engenharia de Tecidos e Terapia Celular (REMETTEC, RED-00570-16),” FAPEMIG, CAPES, and CNPq.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2017.12.007>.

#### References

- Bourgeois, C.A., Hemon, D., Bouteille, M., 1979. Structural relationship between the nucleolus and the nuclear envelope. *J. Ultrastruct. Res.* 68, 328–340.
- Bourin, P., Bunnell, B.A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A.J., March, K.L., Redl, H., Rubin, J.P., Yoshimura, K., Gimble, J.M., 2013. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* 15, 641–648.
- Bradford, M.M., 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.
- Briffa, R., Um, I., Faratian, D., Zhou, Y., Turnbull, A.K., Langdon, S.P., Harrison, D.J., 2015. Multi-scale genomic, transcriptomic and proteomic analysis of colorectal cancer cell lines to identify novel biomarkers. *PLoS one* 10, e0144708.
- Campos, A.C.D.A., Rodrigues, M.A., de Andrade, C., de Goes, A.M., Nathanson, M.H., Gomes, D.A., 2011. Epidermal growth factor receptors destined for the nucleus are internalized via a clathrin-dependent pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 412, 341–346.
- Citri, A., Yarden, Y., 2006. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 505–516.
- Coffman, V.C., Wu, J.-Q., 2012. Counting protein molecules using quantitative fluorescence microscopy. *Trends Biochem. Sci.* 37, 499–506.
- Dittmann, K., Mayer, C., Fehrenbacher, B., Schaller, M., Raju, U., Milas, L., Chen, D.J., Kehlbach, R., Rodemann, H.P., 2005. Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 280, 31182–31189.
- ADoceia, A.O., Mitruț, P., Cernea, D., Georgescu, C., Olimid, D., Margaritescu, C., 2013. Immunohistochemical expression of EGF, c-erbB-2 and EGFR in intestinal variant of gastric adenocarcinomas. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 54, 545–554.
- Du, Y., Shen, J., Hsu, J., Han, Z., Hsu, M., Yang, C., Kuo, H., Wang, Y., Yamaguchi, H., Miller, S., et al., 2013. Syntaxin 6-mediated Golgi translocation plays an important role in nuclear functions of EGFR through microtubule-dependent trafficking. *Oncogene* 33, 756–770.
- Dunn, K.W., Kamocka, M.M., McDonald, J.H., 2011. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 300, C723–C742.
- Eun, J.R., Jung, Y.J., Zhang, Y., Zhang, Y., Tschudy-Seney, B., Ramsamoj, R., Wan, Y.-J.Y., Theise, N.D., Zern, M.A., Duan, Y., 2014. Hepatoma SK Hep-1 cells exhibit characteristics of oncogenic mesenchymal stem cells with highly metastatic capacity. *PLoS one* 9, e110744.
- Everett, M., n.d. Acquiring and analyzing data for colocalization experiments in AIM or ZEN Software. Carl Zeiss MicroImaging.
- Faria, J.A., de Andrade, C., Goes, A.M., Rodrigues, M.A., Gomes, D.A., 2016. Effects of different ligands on epidermal growth factor receptor (EGFR) nuclear translocation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 478, 39–45.
- Gorden, P., Carpentier, J.-L., Cohen, S., Orci, L., 1978. Epidermal growth factor: morphological demonstration of binding, internalization, and lysosomal association in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 5025–5029.
- Haigler, H.T., McKanna, J.A., 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.
- Hamilton, N., 2009. Quantification and its applications in fluorescent microscopy imaging. *Traffic* 10, 951–961.
- Han, W., Carpenter, R.L., Cao, X., Lo, H.-W., 2013. STAT1 gene expression is enhanced by



- nuclear EGFR and HER2 via cooperation with STAT3. *Mol. Carcinog.* 52, 959–969.
- Han, W., Lo, H.-W., 2012. Landscape of EGFR signaling network in human cancers: biology and therapeutic response in relation to receptor subcellular locations. *Cancer Lett.* 318, 124–134.
- Hoshino, M., Fukui, H., Ono, Y., Sekikawa, A., Ichikawa, K., Tomita, S., Imai, Y., Imura, J., Hiraishi, H., Fujimori, T., 2007. Nuclear expression of phosphorylated EGFR is associated with poor prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Pathobiology* 74, 15–21.
- Hsu, S.-C., Hung, M.-C., 2007. Characterization of a novel tripartite nuclear localization sequence in the EGFR family. *J. Biol. Chem.* 282, 10432–10440.
- Huang, W.-C., Chen, Y.-J., Li, L.-Y., Wei, Y.-L., Hsu, S.-C., Tsai, S.-L., Chiu, P.-C., Huang, W.-P., Wang, Y.-N., Chen, C.-H., 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.
- Hung, L.-Y., Tseng, J.T., Lee, Y.-C., Xia, W., Wang, Y.-N., Wu, M.-L., Chuang, Y.-H., Lai, C.-H., Chang, W.-C., 2008. Nuclear epidermal growth factor receptor (EGFR) interacts with signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) in activating Aurora-A gene expression. *Nucl. Acids Res.* 36, 4337–4351.
- Lee, H.-H., Wang, Y.-N., Hung, M.-C., 2015. Non-canonical signaling mode of the epidermal growth factor receptor family. *Am. J. Cancer Res.* 5, 2944.
- Lemmon, M.A., Schlessinger, J., Ferguson, K.M., 2014. The EGFR family: not so prototypical receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harbor Persp. Biol.* 6, a020768.
- Li, C.-F., Fang, F.-M., Wang, J.-M., Tzeng, C.-C., Tai, H.-C., Wei, Y.-C., Li, S.-H., Lee, Y.-T., Wang, Y.-H., Yu, S.-C., et al., 2012. EGFR nuclear import in gallbladder carcinoma: nuclear phosphorylated EGFR upregulates iNOS expression and confers independent prognostic impact. *Ann. Surg. Oncol.* 19, 443–454.
- Li, L.-Y., Chen, H., Hsieh, Y.-H., Wang, Y.-N., Chu, H.-J., Chen, Y.-H., Chen, H.-Y., Chien, P.-J., Ma, H.-T., Tsai, H.-C., Lai, C.-C., Sher, Y.-P., Lien, H.-C., Tsai, C.-H., Hung, M.-C., 2011. Nuclear ErbB2 enhances translation and cell growth by activating transcription of ribosomal RNA genes. *Cancer Res.* 71, 4269–4279.
- Liao, H.-J., Carpenter, G., 2007. Role of the Sec61 translocon in EGF receptor trafficking to the nucleus and gene expression. *Mol. Biol. Cell* 18, 1064–1072.
- Lin, S.-Y., Makino, K., Xia, W., Matin, A., Wen, Y., Kwong, K.Y., Bourguignon, L., Hung, M.-C., 2001. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat. Cell Biol.* 3, 802–808.
- Lo, H.-W., Ali-Seyed, M., Wu, Y., Bartholomeusz, G., Hsu, S.-C., Hung, M.-C., 2006a. Nuclear-cytoplasmic transport of EGFR involves receptor endocytosis, importin beta1 and CRM1. *J. Cell. Biochem.* 98, 1570–1583.
- Lo, H.-W., Hsu, S.-C., Hung, M.-C., 2006b. EGFR signaling pathway in breast cancers: from traditional signal transduction to direct nuclear translocalization. *Breast Cancer Res. Treat.* 95, 211–218.
- Lo, H.-W., Xia, W., Wei, Y., Ali-Seyed, M., Huang, S.-F., Hung, M.-C., 2005. Novel prognostic value of nuclear epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Cancer Res.* 65, 338–348.
- Loupakis, F., Cremolini, C., Fioravanti, A., Orlandi, P., Salvatore, L., Masi, G., Schirripa, M., Di Desidero, T., Antoniotti, C., Canu, B., et al., 2014. EGFR ligands as pharmacodynamic biomarkers in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab and irinotecan. *Targeted Oncol.* 9, 205–214.
- Malhas, A., Goulbourne, C., Vaux, D.J., 2011. The nucleoplasmic reticulum: form and function. *Trends Cell Biol.* 21, 362–373.
- Miyata, K., Yotsumoto, F., Fukagawa, S., Kiyoshima, C., Ouk, N.S., Urushiyama, D., Ito, T., Katsuda, T., Kurakazu, M., Araki, R., et al., 2017. Serum heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) as a biomarker for primary ovarian cancer. *Anticancer Res.* 37, 3955–3960.
- Olsen, D.A., Bechmann, T., Østergaard, B., Wamberg, P.A., Jakobsen, E.H., Brandslund, I., 2012. Increased concentrations of growth factors and activation of the EGFR system in breast cancer. *Clin. Chem. Lab. Med.* 50, 1809–1818.
- Pereira, N.B., Do-Carmo, A.C., Diniz, M.G., Gomez, R.S., Gomes, D.A., Gomes, C.C., 2015. Nuclear localization of epidermal growth factor receptor (EGFR) in ameloblastomas. *Oncotarget* 6, 9679–9685.
- Rizk, A., Paul, G., Incardona, P., Bugarski, M., Mansouri, M., Niemann, A., Ziegler, U., Berger, P., Sbalzarini, I.F., 2014. Segmentation and quantification of subcellular structures in fluorescence microscopy images using Squash. *Nat. Protoc.* 9, 586–596.
- Rodrigues, M.A., Gamba, C.O., Faria, J.A.Q.A., Ferreira, Ê., Goes, A.M., Gomes, D.A., Cassali, G.D., 2016. Inner nuclear membrane localization of epidermal growth factor receptor (EGFR) in spontaneous canine model of invasive micropapillary carcinoma of the mammary gland. *Pathol.-Res. Pract.* 212, 340–344.
- Roskoski, R., 2014. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol. Res.* 79, 34–74.
- Szoboszlay, M., Kiriz, T., Nusser, Z., 2017. Objective quantification of nanoscale protein distributions. *Sci. Rep.* 7, 15240.
- Traynor, A.M., Weigel, T.L., Oettel, K.R., Yang, D.T., Zhang, C., Kim, K., Salgia, R., Iida, M., Brand, T.M., Hoang, T., Campbell, T.C., Hernan, H.R., Wheeler, D.L., 2013. Nuclear EGFR protein expression predicts poor survival in early stage non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 81, 138–141.
- Wang, S.-C., Nakajima, Y., Yu, Y.-L., Xia, W., Chen, C.-T., Yang, C.-C., McIntush, E.W., Li, L.-Y., Hawke, D.H., Kobayashi, R., Hung, M.-C., 2006. Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability. *Nat. Cell Biol.* 8, 1359–1368.
- Wang, Y.-N., Hung, M.-C., 2012. Nuclear functions and subcellular trafficking mechanisms of the epidermal growth factor receptor family. *Cell Biosci.* 2, 1.
- Wang, Y.-N., Lee, H.-H., Lee, H.-J., Du, Y., Yamaguchi, H., Hung, M.-C., 2012. Membrane-bound trafficking regulates nuclear transport of integral epidermal growth factor receptor (EGFR) and ErbB-2. *J. Biol. Chem.* 287, 16869–16879.
- Wang, Y.-N., Wang, H., Yamaguchi, H., Lee, H.-J., Lee, H.-H., Hung, M.-C., 2010a. COPI-mediated retrograde trafficking from the Golgi to the ER regulates EGFR nuclear transport. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 399, 498–504.
- Wang, Y.-N., Yamaguchi, H., Huo, L., Du, Y., Lee, H.-J., Lee, H.-H., Wang, H., Hsu, J.-M., Hung, M.-C., 2010b. The translocon Sec61 $\beta$  localized in the inner nuclear membrane transports membrane-embedded EGF receptor to the nucleus. *J. Biol. Chem.* 285, 38720–38729.
- Weissart, K., 2014. The Basic Principle of Airyscanning. *Zeiss Technology Note* 22.
- Xia, W., Wei, Y., Du, Y., Liu, J., Chang, B., Yu, Y.-L., Huo, L.-F., Miller, S., Hung, M.-C., 2009. Nuclear expression of epidermal growth factor receptor is a novel prognostic value in patients with ovarian cancer. *Mol. Carcinog.* 48, 610–617.
- Yarden, Y., Pines, G., 2012. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat. Rev. Cancer* 12, 553–563.
- Yarden, Y., Sliwkowski, M.X., 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 127–137.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., Hedrick, M.H., 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7, 211–228.



## 8.8. Manuscrito

**Phospholipase C delta 4 (PLC $\delta$ 4) is a nuclear protein involved in cell differentiation and proliferation in mesenchymal stromal stem cells**

Kunrath-Lima, M.<sup>1</sup>; Miranda, M.C.<sup>1</sup>; Ferreira, A.F.<sup>1</sup>; Faraco, C.C.F.<sup>1</sup>; Melo, M.I.A.<sup>1</sup>; Goes, A.M.<sup>1</sup>, Rodrigues M.A.<sup>1</sup>, Faria, J.A.Q.A.<sup>2</sup>; Gomes, D.A.<sup>1#</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus/AM, Brazil.

**#To whom correspondence should be addressed:** Dawidson A. Gomes. E-mail: dawidson@icb.ufmg.br

Instituto de Ciências Biológicas, bloco Q4, sala 238. Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos, 6627. Belo Horizonte – MG, 31270-901, Brazil .

**Short title:** Phospholipase C delta 4 (PLC $\delta$ 4) is involved in cell differentiation and proliferation in mesenchymal stem cells.

**Keywords:** human PLC $\delta$ 4, nuclear calcium signaling, calcium signaling, cellular proliferation, cellular differentiation, cellular senescence.

## **Abstract**

Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) is an important second messenger within cells, and it is involved in many cellular processes such as death and proliferation. The raise in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels can be due to the generation of inositol 1,4,5-trisphosphate ( $\text{InsP}_3$ ), which is a product of phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate ( $\text{PIP}_2$ ) hydrolysis by phospholipases C (PLCs), that leads to  $\text{Ca}^{2+}$  release by  $\text{InsP}_3$  receptors ( $\text{InsP}_3\text{R}$ ).  $\text{Ca}^{2+}$  signaling patterns can vary in different regions of the cell, and increases in nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  levels have specific biological effects that differ from the effects of  $\text{Ca}^{2+}$  increases in cytoplasm. There are PLCs in the cytoplasm and nucleus, but little is known about the functions of nuclear PLCs. The aim of this work was to characterize phenotypically human PLC $\delta$ 4 (hPLC $\delta$ 4) in mesenchymal stem cells. This is a nuclear protein in different cell types and it has a possible role in proliferative processes. In this work, human adipose-derived mesenchymal stem cells (hASC) were used. Initially, we proceeded to the subcellular localization of hPLC $\delta$ 4, using confocal microscopy. This protein showed to be mainly nuclear. When hASC were submitted to cell differentiation, it was observed an increase in PLC $\delta$ 4 protein expression after adipogenic differentiation, but this increase was not observed in cells that were incubated with osteogenic inducers. hASC PLC $\delta$ 4 knockdown showed reduced cell proliferation, without cell death increase. However, for silenced cells it was observed an increase of cells on G1 and a reduction of cells on interphase and G2/M. PLC $\delta$ 4 silencing increased the percentage of senescent cells in hASC, what could explain the reduction in cell proliferation. Thus, these data show that human PLC $\delta$ 4 is involved in cellular differentiation and cellular proliferation, being this processes possibly mediated by nuclear  $\text{Ca}^{2+}$ .

## **1. Introduction**

Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) is an important second messenger within cells, and it is involved in many cellular processes, such as muscular contraction, cell death and proliferation, egg fertilization and secretion [1-4]. Although it has not been established how a single second messenger coordinates such diverse effects

within a cell, there is increasing evidence that the spatial patterns of  $\text{Ca}^{2+}$  signal determine their specificity. The raise in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels can be due to the generation of inositol 1, 4, 5-trisphosphate ( $\text{InsP}_3$ ), which is a product of phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate ( $\text{PIP}_2$ ) hydrolysis by phospholipases C (PLCs), that leads to  $\text{Ca}^{2+}$  release by  $\text{InsP}_3$  receptors ( $\text{InsP}_3\text{R}$ ) [5, 6]. This pathway is activated by G protein coupled receptors (GPCR), or by tyrosine kinase receptors (RTKs), via PLCs. The released  $\text{Ca}^{2+}$  activates sensor molecules, like calmodulin, which, in turn, modulate cellular activity [7].

Some events regulated by  $\text{Ca}^{2+}$  occur specifically in cell nucleus, and several evidences indicate that cytosolic and nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  can regulate different cellular processes [4, 8-11]. Therefore, the nucleus must contain  $\text{Ca}^{2+}$  stores and also the machinery needed to generate its signaling. Ryanodine and  $\text{InsP}_3$  receptors can be found in the nucleoplasmic reticulum [12-15]. In addition, the nucleus contains enzymes and substrates necessary for the production of  $\text{InsP}_3$  [16]. Previous studies demonstrated the detection of  $\text{PIP}_2$  in the nuclear envelope and nucleoplasm [17, 18], as well as the presence of nuclear isoforms of PLCs, such as  $\gamma 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\delta 1$  and  $\delta 4$  [19]. PLCs could be involved in primary nuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signaling, since activation of  $\text{InsP}_3$  receptors is the most widely mechanism implicated in the release of  $\text{Ca}^{2+}$  from the nucleus [20]. Phosphoinositide-specific phospholipases C (PI-PLCs; 1-phosphatidyl-1D-myoinositol-4, 5-bisphosphate inositoltrisphosphohydrolases) consist, in mammals, of a protein family containing 13 isozymes, divided into 6 classes:  $\beta$  (1-4),  $\gamma$  (1-2),  $\delta$  (1,3,4),  $\epsilon$  (1),  $\zeta$  (1) e  $\eta$  (1,2), according to their structures [21]. All PI-PLCs isozymes catalyze the reaction of  $\text{PIP}_2$  cleavage, generating  $\text{InsP}_3$  and DAG, but each isozyme possesses unique physiological functions [21]. Some PLC isozymes have been described as nuclear in specific cell types:  $\text{PLC}\beta 1$ ,  $\text{PLC}\gamma 1$ ,  $\text{PLC}\delta 1$ ,  $\text{PLC}\delta 4$  and  $\text{PLC}\zeta$  [19, 22]. The activity of these nuclear PLCs has been related to the regulation of several cellular processes, such as proliferation and differentiation, as well as to diseases such as myelodysplastic syndromes ( $\text{PLC}\beta 1$ ), neurological diseases ( $\text{PLC}\gamma 1$ ) and infertility ( $\text{PLC}\zeta$  and  $\text{PLC}\delta 1-4$ ) [23], indicating the importance of the study and characterization of these isozymes.

PLC $\delta$ 4 is a phospholipase C isozyme so far little explored. It has been identified as a nuclear protein in different cell types and seems to be involved in proliferative processes [22, 24, 25]. It was first purified from regenerating rat liver protein extracts [26], and its gene was cloned by Liu and colleagues in 1996 [27] from a regenerating rat liver cDNA library, indicating a possible role of PLC $\delta$ 4 in cell proliferation. Furthermore, this enzyme is abundantly expressed in the brain and testes of rats [24, 25]. Human *PLC $\delta$ 4* gene (*hPLC $\delta$ 4*) was cloned from an oligodendroglioma cDNA library and it is located on the long arm of chromosome 2 in region 35 (2q35; [28]). Despite its well-described chromosomal location, studies with hPLC $\delta$ 4 protein are scarce.

Given the importance of phosphoinositide/Ca<sup>2+</sup> signaling in cell nucleus, we decided to study PLC $\delta$ 4 enzyme function. To do so, we used human adipose-derived mesenchymal stem cells (hASC) as experimental models [29]. These cells were chosen by their proliferation and differentiation capacity, presenting peculiar aspects in relation to the cellular processes involved in PLC signaling. In this study, PLC $\delta$ 4 showed to be mainly nuclear in hASC, using immunofluorescence assays. We observed that PLC $\delta$ 4 protein expression increased with adipogenic differentiation and PLC $\delta$ 4 silencing reduced cell proliferation, with cell cycle arrest and increased senescence. Our results indicate that PLC $\delta$ 4 is mainly a nuclear protein that is involved in cellular differentiation and proliferation processes.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. hASC isolation and culture**

Human adipose-derived mesenchymal stem cells (hASC) were obtained from the subcutaneous adipose tissue removed during liposuction surgeries or abdominoplasties. The samples were donated freely by lipoplasty surgery patients according to the regulations approved by the “*Universidade Federal de Minas Gerais’s Research Ethics Committee*” (CAAE: 55698116.2.0000.5149). Cell extraction was carried out as described by Zuk and colleagues (2001) [29]. The tissue was washed twice using a phosphate-buffered saline solution (PBS, pH 7.4) to remove residual blood, centrifuged at 300 x g, 7 minutes, at 25°C and

then digested using 0.1% (w/v) type I collagenase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 60 minutes at 37°C. The solution was centrifuged at 300 x g during 10 minutes at 25°C, the precipitate was resuspended in complete *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM medium, Sigma-Aldrich) containing 10% fetal bovine serum (FBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 1% penicillin/streptomycin (PS; Sigma-Aldrich) and transferred to T25 culture flasks (Sarstedt, Nümbrecht, Germany), kept in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Cell media was replaced every 3 days. Passages 3 and 4 were used for performing the assays.

## **2.2. Immunofluorescence**

Stem cells were plated at the concentration of  $2 \times 10^5$  cells per plate, in 6-well plates containing coverslips. After a 24 hours cultivation, cells were fixed, incubated with rabbit polyclonal primary antibody anti-PLC $\delta$ 4 antibody (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) and anti-rabbit IgG secondary antibody conjugated to Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (1:500, Thermo-Fisher Scientific). Coverslips were assembled using *SlowFade Gold Antifade* with DAPI (Thermo-Fisher Scientific). Fluorescence images were obtained using confocal microscope Zeiss 5 LIVE (Carl Zeiss, Jena, Germany), at “*Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do ICB/UFMG*” (CAPI), using 405 and 488 nm lasers for excitation of DAPI and Alexa Fluor<sup>®</sup> 488, respectively. The 63x immersion objective lenses, 1.4 numerical aperture was used, and the iris was kept near 1 Airy unit. Images were analyzed through *Image Browser* or *ZEN* software (Carl Zeiss).

## **2.3. Stem cells differentiation induction**

hASC were incubated in specific differentiation media, as described by Zuk et al. (2001) [29]. Following incubation, total protein were extracted and 21 days after differentiation induction cells were fixed and stained by Von Kossa and Oil Red O, for osteogenic and adipogenic differentiation, respectively. Cells were observed in the microscope Olympus IX70 in the magnifications of 4, 10 and 20 times for photo documentation, using QIClick camera (QImaging,

Surrey, BC, Canada) and Image Pro Plus 7.01 software (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA).

#### **2.4. Western Blot**

Total protein extracts were obtained from cells using sterile cell scraper and NETN buffer (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5% Nonidet P-40) and 1% of protease and phosphatase inhibitors cocktail (Sigma-Aldrich). After the extraction, proteins were quantified using Bradford method (Sigma-Aldrich), according to the manufacturer recommendations. Proteins underwent electrophoresis, using denaturant polyacrylamide gels (SDS-PAGE). 30-50  $\mu$ g of the proteins were used in gel electrophoresis. Then, proteins were transferred to a polyvinylidene fluoride membrane (PVDF; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) through the semi-dry transfer system (Bio-Rad) for 90 minutes. Immunoblotting was performed by standard methods. Primary antibodies against human PLC $\delta$ 4 (Santa Cruz Biotech; 1:200) and  $\alpha$ -tubulin (Sigma-Aldrich; 1:2000) were used. Protein bands were revealed through chemiluminescence reaction using Pierce<sup>TM</sup> ECL Plus (Thermo Scientific) and BioMax<sup>®</sup> MR (Carestream) films. The films were scanned and the quantitative analyses were performed using *ImageJ* software [30]. Protein relative expression was calculated using  $\alpha$ -tubulin as loading control.

#### **2.5. siRNA transfection**

The reduction in human PLC $\delta$ 4 expression was achieved using siRNA *ON-TARGETplus SMARTpool* (84812), *siRNA J-005065-01* (Dharmacon/Thermo Scientific). Scrambled siRNA *siGENOME Non-targeting siRNA pool #2* (Dharmacon/Thermo Scientific) was used as a control. Cells were transfected using transfection reagent Lipofectamine RNAiMAX (Thermo-Fisher Scientific). Lipofectamine or 25 nM siRNA were diluted in the minimal medium *Opti-MEM* (Thermo-Fisher Scientific), incubated for 5 minutes, then combined in the ratio 1:1 and incubated for 20 minutes. The complex lipofectamine-siRNA was added to resuspended cells (the amount of cells and the medium volume varied according to each assay). These cells were kept at

37°C, 5% CO<sub>2</sub>, in *Opti-MEM* for 5 hours for cell adhesion. After this period, the medium was replaced by complete DMEM and the cells were kept at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, for the time established for each assay.

## 2.6. Quantitative Real Time PCR (qPCR)

RNA was extracted with TRIzol reagent (Thermo-Fisher Scientific), according to the manufacturer recommendations. RNA samples were treated using DNase RQ1 (Promega, Madison, WI, USA) and RNAs were employed in reverse transcription reactions, using *High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo-Fisher Scientific) and random primers for cDNA synthesis. Primers were designed for *PLCδ4* (accession number on GenBank: NM\_032726; hPLCd4 forward (F): 5'-AGGTGGATGTATGGGATGGACC-3'; hPLCd4 reverse (R): 5'-GGGTAGTCTGATGTCTGGAAGG-3') and *RPL13A* (accession number on GenBank: AB082924; RPL13A F: 5'-TATGAGTGAAAGGGAGCC-3'; RPL13A R: 5'-ATGACCAGGTGGAAAGTC-3') genes, using *Primer-BLAST* [31]. Primer sequences for *GAPDH* (accession number on GenBank: NM\_001256799) were assessed in the article written by Thibeaux and colleagues (2014) [32]. Primers were chemically synthesized by Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA, EUA). For qPCR, primers were added to cDNAs and to *GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix* (Promega), which contained the fluorescent intercalating agent DNA *BRYT Green<sup>®</sup>*, according to the manufacturer instructions. Reactions were read using *CFX96 Touch<sup>™</sup> RT-PCR* (Bio-Rad). *CFX Manager 3.0* software (Bio-Rad) was used to analyze the results. *PLCδ4* relative expression was calculated using *REST-MCS<sup>®</sup>* software, version 2 [33, 34].

## 2.7. Growth curve

Mesenchymal stem cells were plated on 24-well plates at 1 x 10<sup>4</sup> cells/well and transfected using siRNA. Cells were trypsinized every 2 days, resuspended in 1 mL DMEM medium and counted in Neubauer chamber using Trypan blue for viability exclusion. Results were plotted in a time (hours) versus cell number (x10<sup>4</sup>) graph.

## 2.8. Cell viability assay



hASC were plated at  $1 \times 10^4$  cells per well, 3 wells per group, in 96-well plates, and transfected with siRNA. After 24, 48 or 72 hours incubations at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, medium was removed and replaced by a solution containing *Celltiter Blue* reagent (Promega) and DMEM medium, followed by 2 hours incubation at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. This assay employs resofurin (very fluorescent) generation as indicator of cellular redox state in cell viability assays. Then, fluorescence was measured using *Synergy 2* fluorometer (BioTek, Winooski, VT, USA), using the filter 485/20 for excitation and 590/35 for emission. Data were plotted in graphs showing the fluorescence values of transfected cells compared to the non-transfected cells.

## **2.9. Cell cycle evaluation**

Stem cells were plated on 6-well plates,  $2 \times 10^5$  cells/well, 3 wells per group, and transfected using siPLC $\delta$ 4 or siSCR. After 48 hours, cells were enzymatically removed and a counting was performed.  $1.5 \times 10^5$  cells were used for DNA extraction [35]. A solution containing 0.25  $\mu$ M TO-PRO3<sup>®</sup> (Thermo-Fisher Scientific) and 0.2 mg.mL<sup>-1</sup> RNase A (Thermo-Fisher Scientific) was used to stain cells. After that, analysis in *Guava EasyCyte 6-2L* flow cytometer (Millipore, Temecula, CA, USA) was performed. Control group (not transfected) was used for adjusting the granularity and size parameters to determine the expected population. The analysis was conducted in logarithmic scale. Samples were excited with 633 nm laser and it was used the emission filter 661/19. 5000 events were assessed by the cytometer. Results were analyzed using *FlowJo* software version 7.2.5 (LLC, Ashland, OR, USA). The results were plotted as percentage of cells in G1, S or G2/M cell cycle phases, related to total cell number.

## **2.10. 5-ethynyl-2'-deoxyuridin (EdU) incorporation assay**

EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridin), a thymidine analog, was used to quantify proliferating cells [36]. hASC were plated in 96-well plates at the density of  $1 \times 10^4$  cells per plate, for the 48 hours post-transfection assays, and  $2.5 \times 10^3$  cells per plate, for the 7 days post-transfection assays, 3 wells per group in each assay, using the transfection procedures previously described. For marking and quantifying EdU-positive cells, *Click-iT EdU Kit* (Thermo-Fisher Scientific) was

used. EdU detection solution, containing Azida-Alexa 555, and nuclear staining solution *HCS Nuclear Mask Blue* (1:2000) were used. Cells were photo documented using 4x magnification objective lens in Olympus IX70 microscope, QIClick camera and the software Image Pro Plus 7.01. Fluorophore filters used for excitation (Ex) and emission (Em) were Ex 350/50 and Em 455/50 for *HCS Nuclear Mask Blue* and Ex 555/25 and Em 605/52 for Azida-Alexa 555. The assays were replicated three times. The total number of cells per field (*HCS Nuclear Mask Blue* nuclear labeling) and EdU-positive number of cells (Azida-Alexa 555) were counted, processed and presented in graphs showing the percentage of EdU-positive cells compared to the total number of cells.

### **2.11. Phosphorylated H3 histone Ser10 (pH3 S10p)**

Phosphorylated H3 histone in serine residue at position 10 is a mitosis marker [37]. Thus, this phosphorylated protein was assessed through immunofluorescence assay to quantify cells at this cell cycle phase. Stem cells were plated in 96-well plates, at the concentration of  $1 \times 10^4$  cells per well for the 48 hours post-transfection assays, and  $2.5 \times 10^3$  cells per plate for the 7 days post-transfection assays, 3 wells per group in each assay, and transfected. Cells were incubated with the rabbit polyclonal anti-pH3 (phosphorylated histone H3, S10p) primary antibody (1:500, Millipore), secondary antibody conjugated to Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 IgG anti-rabbit (1:1000, Thermo-Fisher Scientific) and the nuclear marker Hoechst 33258 ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , Invitrogen). Then, the cells were photographed using Olympus IX70 microscope, at 4x magnification with QIClick camera and the software Image Pro Plus 7.01. For detecting fluorophores excitation and emission, the filters Ex 350/50 and Em 455/50 were used for Hoescht and Ex 490/20 and Em 525/36 were used for Alexa Fluor<sup>®</sup> 488. The assays were replicated three times. Total number of cells per field (nuclear marker, Hoescht) and the number of pH3-positive cells (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 marking) were counted, generating graphs expressing the percentage of pH3-positive cells compared to total cell number.

### **2.12. Senescence assay**

Mesenchymal stem cells were plated in 24-wells plates at the density of  $1 \times 10^4$  cells per well and transfected. 48 hours or 7 days after transfection, these cells were stained for detecting senescence-associated  $\beta$ -galactosidase activity (SA- $\beta$ -Gal; [38]), using *Senescence Cells Histochemical Staining Kit* (Sigma-Aldrich). Cells were photo documented using Olympus IX70 microscope, at 4x magnification, the camera QIClick and Image Pro Plus 7.01 software. Assays were performed in biological triplicate. The total number of cells per field and the number of senescent cells (perinuclear blue staining) were counted, generating graphs expressing the percentage of senescent cells compared to total cell number.

### **2.13. Statistical analyses**

At least three independent assays were performed for each experiment. The analyses were performed using GraphPad *Prism 5* software (La Jolla, CA, USA). Results were expressed as mean  $\pm$  standard error and compared through variance analysis (One-way or Two-way ANOVA) and Bonferroni's multiple comparison test, or through Student's *t*-test (for parametric samples), or compared through Kruskal-Wallis and Dunn's multiple comparison test, or through Mann-Whitney test (for non-parametric samples). Statistical significance was defined for  $p < 0,05$ .

## **3. Results**

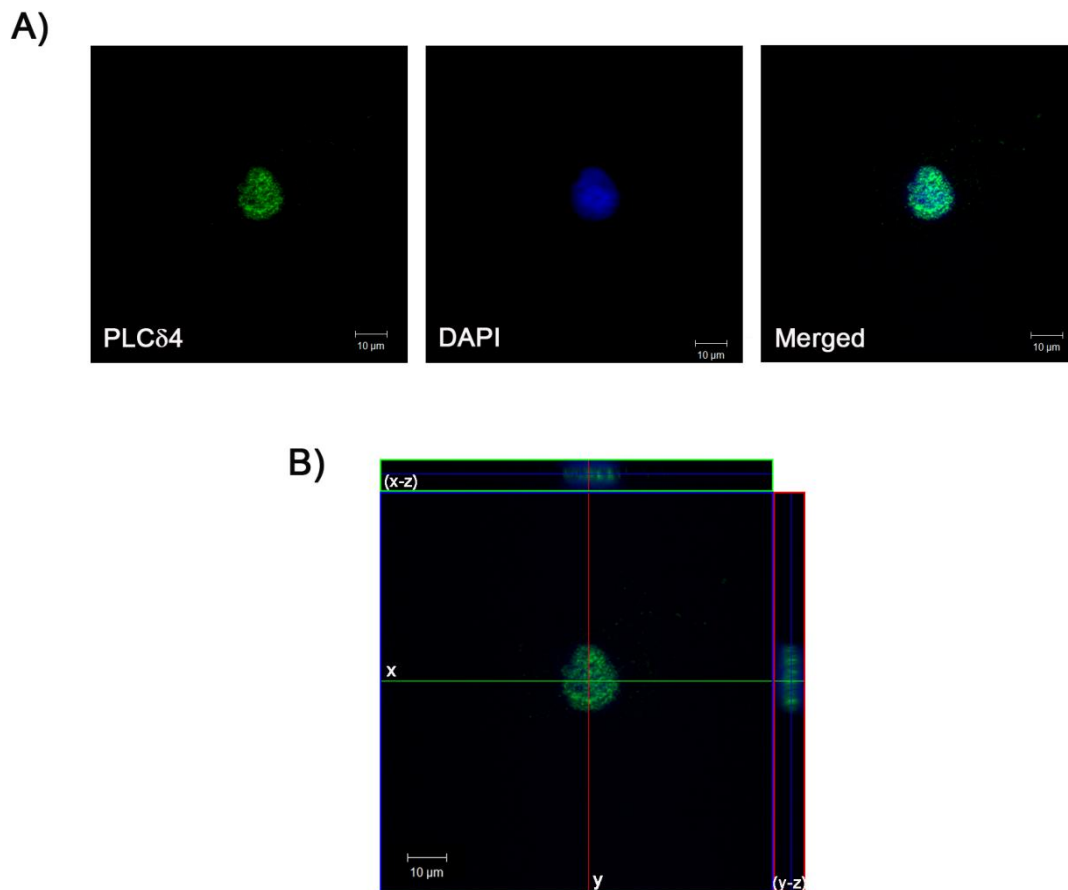
### **3.1. hPLC $\delta$ 4 is mainly a nuclear protein**

*In silico* analysis of hPLC $\delta$ 4 protein sequence revealed the presence of Nuclear Localization Signal (NLS). *NucPred* software [39] showed that PLC $\delta$ 4 has a probability of 86% of being nuclear, what was supported by *SeqNLS* software [40] result, which suggested that there are 86% to 89% chances of PLC $\delta$ 4 having a real NLS (data not showed).

Using confocal microscopy, we localized PLC $\delta$ 4 in hASC that exhibited nuclear localization. In Figure 1A, PLC $\delta$ 4 is conjugated with Alexa 488 (green; left panel), the nucleus is stained by DAPI (blue; central panel). We can observe

the colocalization of both staining, which suggests the nuclear localization of PLC $\delta$ 4 (Merged; right panel).

To better demonstrate the nuclear compartmentalization of PLC $\delta$ 4, serial images were collected, and tridimensional reconstruction was built (Figure 1B). In medial plan, PLC $\delta$ 4 and nuclear labeling colocalize in all nuclear extension. Therefore, PLC $\delta$ 4 subcellular localization in hASC is similar to this protein's distribution described for other cell types, like rat hepatic cells [27], mouse cells [41], and also corroborate with *in silico* protein sequence analysis.

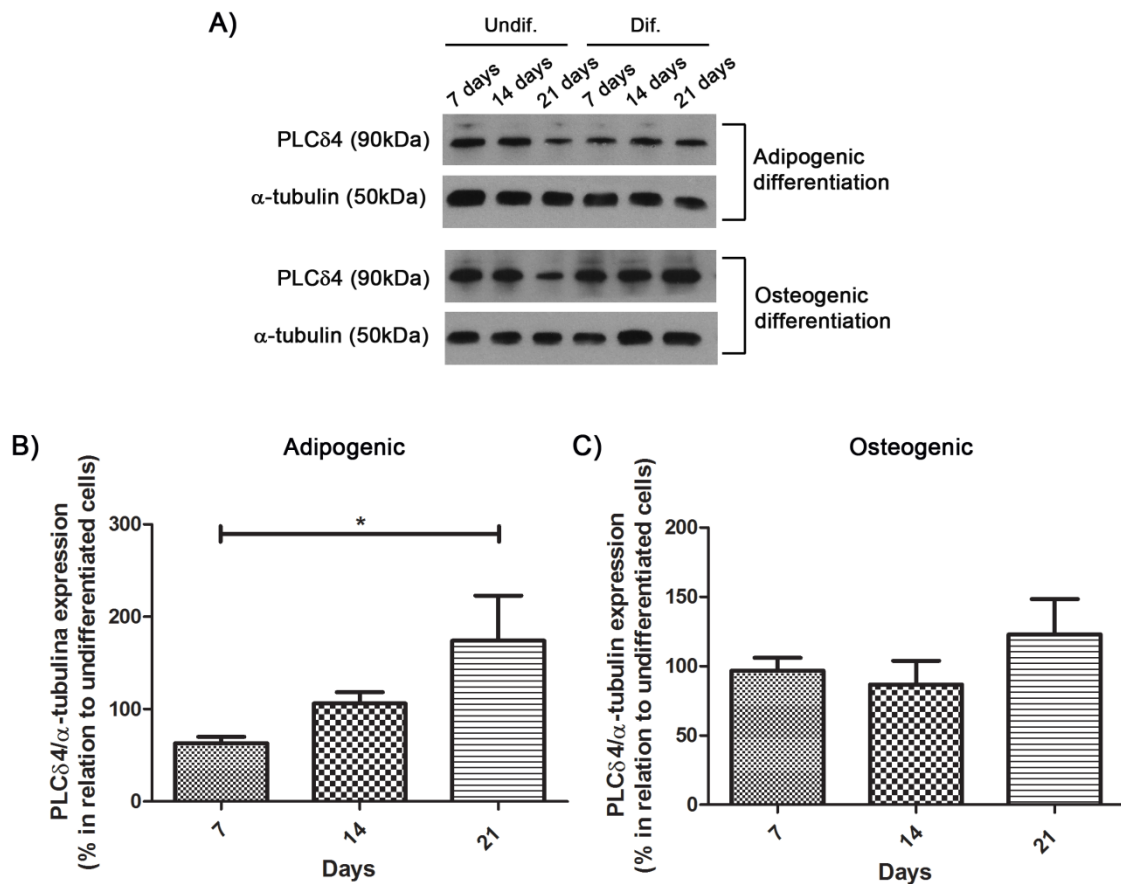


**Figure 1: PLC $\delta$ 4 localizes mainly to cell nucleus.** hASC were incubated with primary antibody anti-PLC $\delta$ 4 and secondary antibody conjugated with Alexa 488 (green). Nucleus was stained with DAPI (blue). **A)** PLC $\delta$ 4 colocalizes with nuclear staining in hASC, indicated by merged image. **B)** Tridimensional reconstruction. Central panel: medial plan in a region inside the nucleus. Upper panel: 3D reconstruction on x-z plan. Right panel: 3D reconstruction on y-z plan. Scale bar: 10  $\mu$ m.

### 3.2. PLC $\delta$ 4 expression increases with adipogenic differentiation

As differentiation capacity is a peculiar characteristic of mesenchymal stem cells, we decided to analyze PLC $\delta$ 4 expression in this process. Cells were incubated with differentiation media, for adipogenic and osteogenic differentiation, and these cells had their proteins extracted after 7, 14 and 21 days of culture. Differentiation was confirmed by staining, after 21 days of induction (Supplementary Figure 1).

The extracted proteins were used for PLC $\delta$ 4 expression analysis by Western Blot (Figure 2A). For osteogenic differentiation, there was no difference in PLC $\delta$ 4 expression on the different days analyzed (Figure 2C). However, for adipogenic differentiation there was an increase in PLC $\delta$ 4 expression, when seventh and twenty-first days' after differentiation induction are compared (Figure 2B). This increase in PLC $\delta$ 4 expression after adipogenic induction suggests a possible role of this protein in adipogenic differentiation.

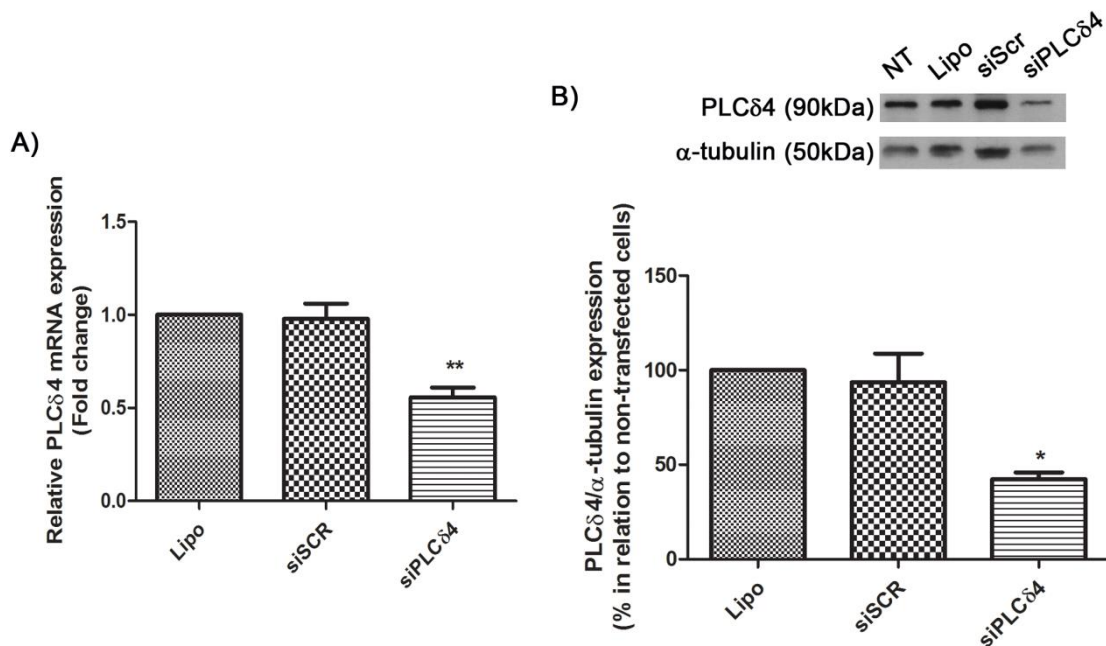


**Figure 2: PLC $\delta$ 4 expression increases in adipogenic differentiation. A)** Protein extracts of hASC, that underwent adipogenic or osteogenic differentiation after 7, 14 and 21 days of differentiation induction,

were submitted to Western Blot. 30 µg of protein were used in the gels, and the membranes were incubated with anti-PLCδ4 and anti-α-tubulin antibodies. Undif. = undifferentiated cells; Dif. = differentiated cells. **B and C**) Western Blot quantification. PLCδ4 expression was normalized by α-tubulin expression. Differentiated cells expression was then normalized by undifferentiated cells expression (in percentage). **B**) PLCδ4 relative expression after adipogenic induction. There was difference on PLCδ4 expression between 7 and 21 days of differentiation. **C**) PLCδ4 relative expression after osteogenic induction. There was no difference on PLCδ4 expression on the different days analyzed. Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test. \* =  $p < 0,1$ . At least three independent experiments were performed.

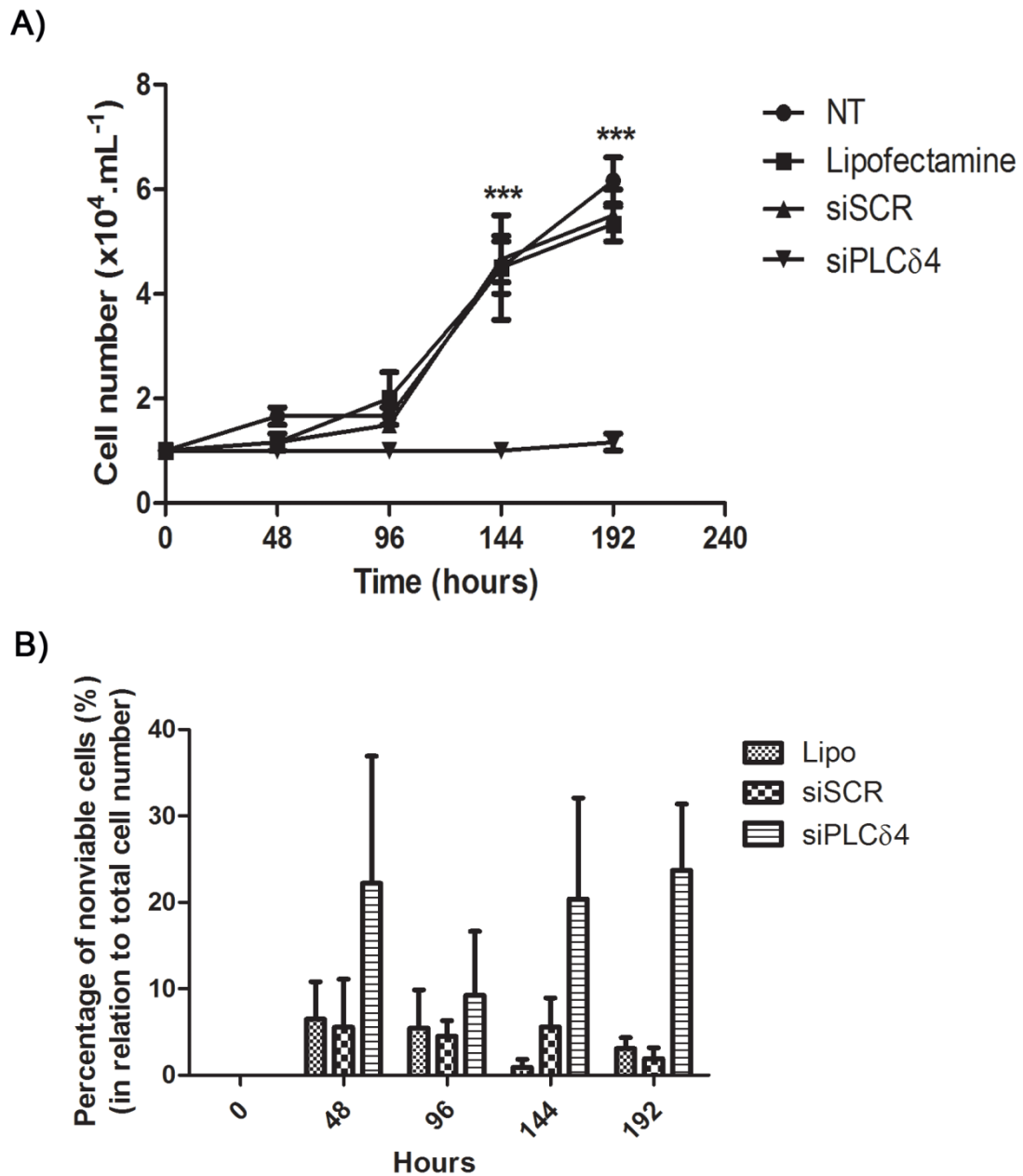
### 3.3. siPLCδ4 impairs cell growth, but does not increase cell death

To proceed with PLCδ4 characterization, this protein had its levels diminished by siRNA. Firstly, silencing efficiency was assessed by qPCR and Western Blotting (Figure 3). 48 hours after siRNA transfection, total RNA and total proteins were extracted from cells. Three groups were analyzed: Lipo, which is constituted by stem cells treated only with the transfection reagent, Lipofectamine; siSCR, which is composed by cells transfected with scrambled siRNA, and siPLCδ4, which are cells transfected with siRNA for siPLCδ4. In qPCR assays, *PLCδ4* gene expression was reduced in siPLCδ4 cells, when compared to control groups (Figure 3A). *PLCδ4* expression reduced almost by half, going from  $0.98 \pm 0.08$  SEM in siSCR to  $0.56 \pm 0.05$  SEM in siPLCδ4. In Western Blot analysis, siPLCδ4 cells also showed similar reduction in protein expression to the one observed for *PLCδ4* mRNA, there was about 50% reduction in PLCδ4 expression (Figure 3B). These data validate the efficiency of siPLCδ4 sequence in reducing PLCδ4 content in the cells.



**Figure 3: siPLC $\delta$ 4 sequence reduces the expression of PLC $\delta$ 4 in hASC.** **A)** Relative *PLC $\delta$ 4* mRNA expression measured by Real Time qPCR. Cells were transfected with 25nM of scrambled siRNA (siSCR) or siRNA for PLC $\delta$ 4 (siPLC $\delta$ 4). 48 hours post transfection, total RNA was extracted from cells and it was used for cDNA synthesis. PLC $\delta$ 4 expression was normalized with *GAPDH* and *RPL13A*, and samples treated only with lipofectamine (non-transfected cells) were used as calibrators. There was reduction on PLC $\delta$ 4 expression in siPLC $\delta$ 4 cells. **B)** Western Blot of total protein extracts 48 hours post transfection.  $\alpha$ -tubulin was used as a loading protein control and protein expression levels were normalized with lipofectamine samples values (in percentage). The reduction of PLC $\delta$ 4 protein expression can be observed for siPLC $\delta$ 4 treated cells, when compared to controls. NT = non-treated cells; Lipo = cells treated with lipofectamine (transfection reagent); siSCR = cells transfected with scrambled siRNA; siPLC $\delta$ 4 = cells transfected with siRNA for PLC $\delta$ 4. One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test. \* =  $p < 0,1$ ; \*\* =  $p < 0,01$ . n = 3.

Once the efficiency of PLC $\delta$ 4 silencing was confirmed, functional analyzes were conducted with PLC $\delta$ 4 knockdown cells. Cell growth assays revealed a similar pattern for the control groups (NT, non-treated cells; Lipo; and siSCR), being these groups statistically equal (Figure 4A). In contrast, cells treated with siPLC $\delta$ 4 exhibited no proliferation, compared to controls. It is possible to observe that the number of cells were stable for 8 days of culture (192 hours). These results suggest that cells knockdown for PLC $\delta$ 4 were not dying or proliferating. Despite this reduction in cell growth, cells transfected with siPLC $\delta$ 4 did not presented a reduction in cell viability, as the number of Trypan Blue stained cells was not different between the analyzed groups (Figure 4B). This suggests that siPLC $\delta$ 4 cells reduced proliferation might be related to cell cycle arrest.



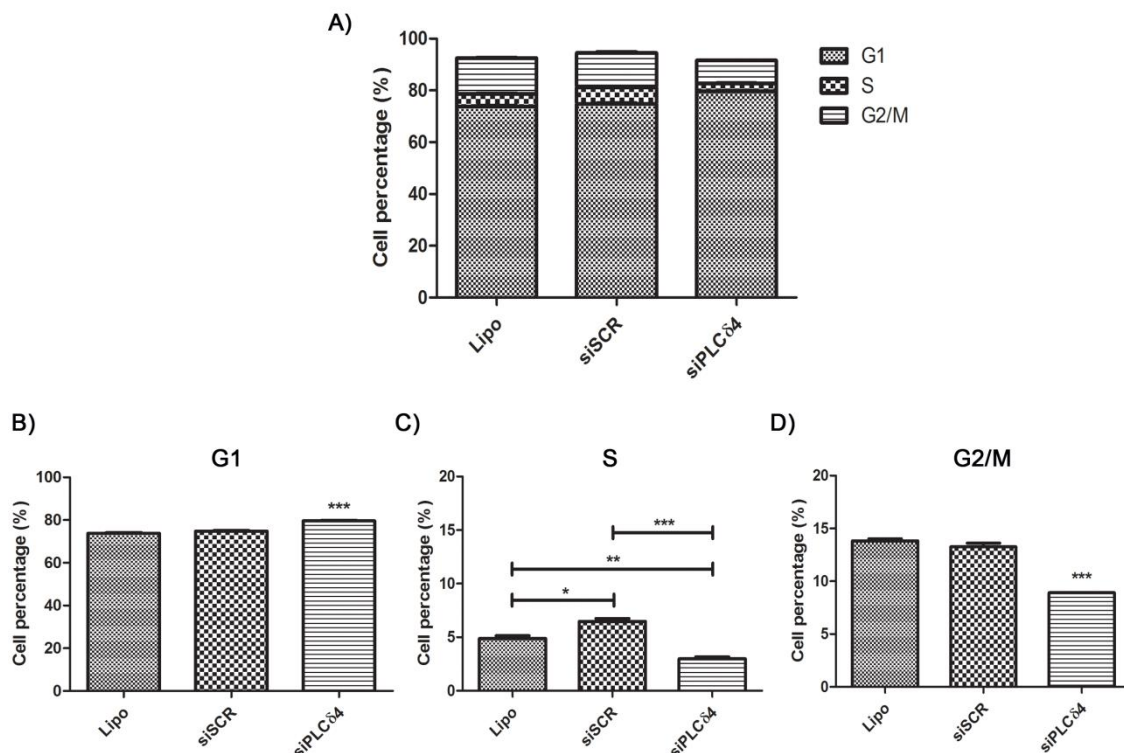
**Figure 4: PLC $\delta$ 4 knockdown abolishes cell proliferation in hASC, without an increase in cell viability.** **A)** Growth curve was started with  $1 \times 10^4$  cells. These cells were counted each two days, on Neubauer chamber, using Trypan Blue for viability exclusion. From time point 144 hours to 192 hours a significant reduction in siPLC $\delta$ 4 cells growth can be observed. **B)** Percentage of nonviable cells, stained with Trypan Blue on cell growth assay. NT = non-treated cells; Lipo = cells treated with lipofectamine (transfection reagent); siSCR = cells transfected with scrambled siRNA; siPLC $\delta$ 4 = cells transfected with siRNA for PLC $\delta$ 4. Two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test. \*\*\* =  $p < 0,001$ . n = 3.



### 3.4. siPLC $\delta$ 4 causes cell cycle arrest

Since the decrease in PLC $\delta$ 4 content is related with the reduction of cell proliferation, without altering the number of nonviable cells, analysis of cell cycle profile of these cells was conducted.

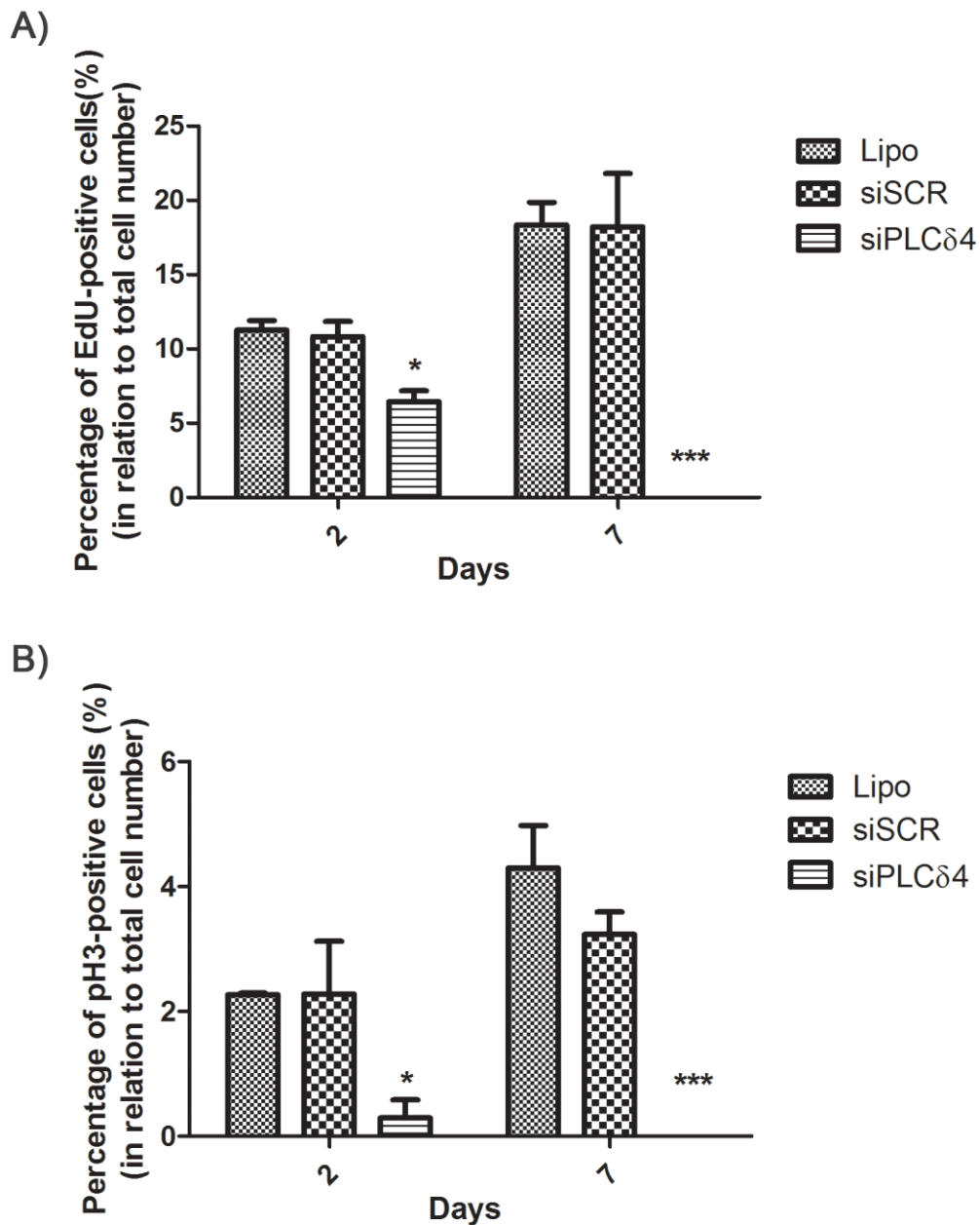
After 48 hours of transfection, stem cells were incubated with To-Pro<sup>®</sup>3 nuclear marker for evaluation of cell cycle by flow cytometry. The percentages of cells in each phase were analyzed. In Figure 5, it is possible to note a distinct distribution profile of cell cycle phases between siPLC $\delta$ 4 cells and control cells. It was observed an increase in hASC siPLC $\delta$ 4 cells in G1 phase (Figure 5B; from  $74.75 \pm 0.25$  SEM in siSCR to  $79.63 \pm 0.18$  SEM in siPLC $\delta$ 4), and a decrease in the percentages of these cells in S and G2 / M (Figure 5C and D; S phase: from  $6.47 \pm 0.27$  SEM in siSCR to  $2.97 \pm 0.19$  SEM in siPLC $\delta$ 4; G2/M: from  $13.25 \pm 0.35$  SEM in siSCR to  $8.91 \pm 0.01$  SEM in siPLC $\delta$ 4).



**Figure 5: Reduction of PLC $\delta$ 4 expression in hASC leads to cell cycle arrest.** 48 hours after transfection, cells were resuspended with trypsin, incubated with the nuclear probe To-Pro<sup>®</sup>3 and analyzed by flow cytometry. **A)** Graphic showing cell cycle phases distribution among the different cell groups. **B)** Percentage of cells, in relation to total cell number, on G1 cell cycle phase. **C)** S phase. **D)** G2/M phases. Lipo = cells treated with lipofectamine (transfection reagent); siSCR = cells transfected with scrambled siRNA; siPLC $\delta$ 4 = cells transfected with siRNA for PLC $\delta$ 4. One-way ANOVA with Bonferroni's multiple

comparison test. \* =  $p < 0,1$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . At least three independent experiments were performed.

In order to confirm the results obtained in cell cycle profile analysis, we used assays with specific probes for S and M cell cycle phases, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) and phosphorylated histone H3 (pH3), respectively. 2 and 7 days post-transfection, cells were labeled with the probes and photo documentation of the cells was performed. Hoescht probe was used as a nuclear marker. It was observed that for both EdU (S phase) and pH3 (M phase) there was a reduction of positive-labeled cells for siPLC $\delta$ 4 group (Figure 6), when compared to controls, at the two time points analyzed (EdU 2 days: from  $10.83 \pm 1.02$  SEM in siSCR to  $6.45 \pm 0.72$  SEM in siPLC $\delta$ 4, 7 days: from  $18.22 \pm 3.59$  SEM in siSCR to  $0.00 \pm 0.00$  SEM in siPLC $\delta$ 4; pH3 2 days: from  $2.28 \pm 0.85$  SEM in siSCR to  $0.29 \pm 0.29$  SEM in siPLC $\delta$ 4, 7 days: from  $3.23 \pm 0.36$  SEM in siSCR to  $0.00 \pm 0.00$  SEM in siPLC $\delta$ 4). Briefly, these data indicate that PLC $\delta$ 4 knockdown cells had a cell cycle arrest, and this remained for days after transfection.

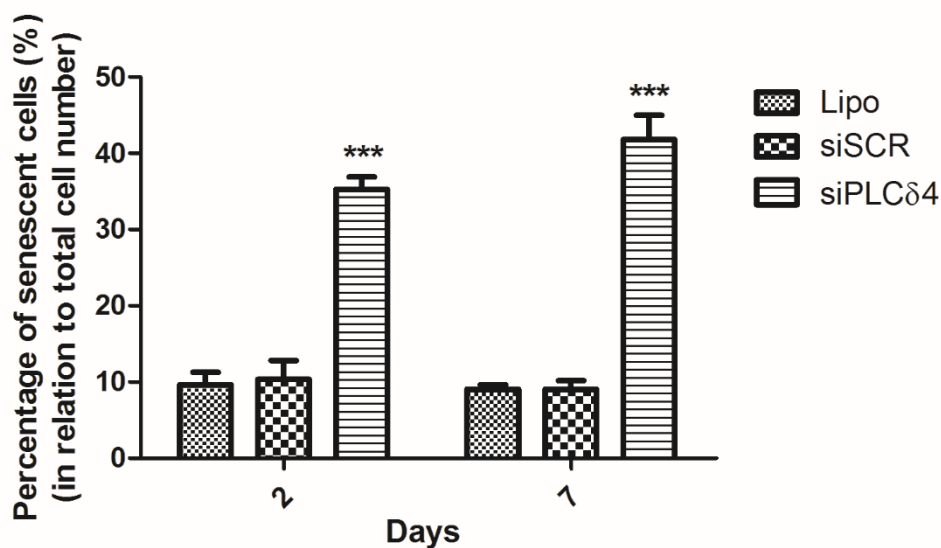


**Figure 6: PLCδ4 knockdown reduces the number of EdU-positive and pH3-positive cells.** 2 or 7 days after transfection, hASC were incubated with Hoechst (nuclear staining) and EdU (a probe for dividing cells) or pH3 (a marker for mitosis). The graphics show the percentage of cells marked simultaneously with Hoechst and EdU or pH3, in relation to total cell number (stained only with Hoechst). **A)** Percentage of EdU-positive cells. **B)** Percentage of pH3-positive cells. For both probes and for the two time points analyzed, there was a reduction of positive-labeled cells for siPLCδ4 group, when compared to control groups. One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test. \* =  $p < 0,1$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . n = 3.

### 3.5. PLC $\delta$ 4 silencing induces cells to senescence

There are several causes for cell cycle arrest, being one of them cellular senescence. Thus, we decided to investigate whether this would be the cause of the cell cycle arrest observed in cells knockdown for siPLC $\delta$ 4. For this purpose, the senescence-associated  $\beta$ -galactosidase assay (SA- $\beta$ -Gal) was used. At pH 6, senescent cells express this  $\beta$ -galactosidase, whose activity can be visualized and measured by addition of X-Gal to cells. If X-Gal is hydrolyzed by  $\beta$ -galactosidase, a blue color in the perinuclear region is generated.

Transfected stem cells were subjected to senescence assays 2 and 7 days post-transfection. The cells were imaged and for each field the total number of cells and the number of senescent cells were counted, generating percentages of senescent cells for each group, which were plotted on graphs. For both time points (2 and 7 days), the number of senescent cells in the group transfected with siPLC $\delta$ 4 was increased in relation to control cells (Figure 7; 2 days: from  $10.36 \pm 2.44$  SEM in siSCR to  $35.26 \pm 1.64$  SEM in siPLC $\delta$ 4, 7 days: from  $9.07 \pm 1.12$  SEM in siSCR to  $41.81 \pm 3.19$  SEM in siPLC $\delta$ 4). This result presents a possible explanation for the reduction of siPLC $\delta$ 4 cell proliferation (Figure 4) and for cell cycle arrest of the same cells (Figures 5 and 6).



**Figure 7: PLC $\delta$ 4 silencing increases the percentage of senescent cells.** 2 or 7 days after transfection, hASC were assayed for SA- $\beta$ -Gal activity. The graphs show the percentage of cells stained for SA- $\beta$ -Gal

activity, in relation to total cell number. for the two time points analyzed, there was a reduction of stained cells for siPLC $\delta$ 4 group, when compared to control groups. One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test. \*\*\* =  $p < 0,001$ . n = 3.

#### 4. Discussion

PLC $\delta$ 4 is better characterized in murine models, such as rat and mice. In these models, it was observed that PLC $\delta$ 4 participates in proliferative processes and that it is mainly located in the nucleus of the cells [27, 41]. However, several aspects, such as PLC $\delta$ 4 activation and the signaling generated by this protein, remain unknown. In addition, human PLC $\delta$ 4 has not been well characterized, and could be associated with pathologies, as other PLC isoforms, whose modifications may be related to the development of cancer, neurodegenerative diseases and myoplasias [21, 23].

hPLC $\delta$ 4 subcellular localization in hASC indicated its nuclear predominance, as observed in Figure 1. This confirms its localization in other cells, such as in hepatic rat cells [27] and mouse cells [41]. Nuclear localization signals were found in hPLC $\delta$ 4 protein sequence, which corroborates what was observed by immunofluorescence.

As previously described, the nucleus contains the molecules and the machinery for Ca<sup>2+</sup> signaling, such as PIP<sub>2</sub> and InsP<sub>3</sub>, among others [42]. This also indicates that nuclear PLCs are active, once their substrate and their product are present in the nucleus. PLCs are separated in primary and secondary, by their activation mechanisms: primary PLCs are activated directly by receptors that bind to extracellular modulators, while secondary ones are activated by intracellular signals [43]. PLC $\beta$  subtypes are activated by G protein-coupled receptors (GPCR) by several mechanisms, and PLC $\gamma$  is activated by tyrosine kinases receptors (RTK) [44]. PLC $\epsilon$  is activated by proteins recruited by GPCRs and RTKs signaling, whereas evidence indicates that the  $\delta$  and  $\eta$  classes are regulated by Ca<sup>2+</sup>, by a positive feedback mechanism of the activity of the other PLCs [45, 46]. Although the activation of cytoplasmic PLCs is well understood, the same does not occur for nuclear PLCs. Evidence indicates that this activation would be different from what happens with cytosolic isoforms. PLC $\gamma$ 1 in hepatic cell nuclei of mice is

activated by nuclear epidermal growth factor (EGFR) receptor [47]. It was proposed by Xu and colleagues in 2001 [48] that nuclear PLC $\beta$ 1 from rats would be phosphorylated by extracellular signal-regulated kinase (ERK) after stimulation with insulin-like growth factor-1 (IGF-1), again pointing to a possible mechanism of activation of nuclear PLCs through RTKs. These evidences are strengthened by data obtained by our group, which show a link between epidermal growth factor (EGF) stimulus and the activation of PLC $\delta$ 4 in tumor cells (unpublished). The interaction between nuclear activated EGFR and PLC $\delta$ 4 should not be direct, since immunoprecipitation and Proximity Ligation Assay (Duolink<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich) did not present positive results for this interaction (unpublished). Interestingly, murine *PLC $\delta$ 4* promoter region is activated by growth factors, such as insulin [49]. Collectively, these data point to an indirect modulation of hPLC $\delta$ 4 by EGFR, possibly involving transcriptional or post-transcriptional regulation.

We investigated whether PLC $\delta$ 4 was involved in hASC differentiation. Western blot quantification assays indicated the increase in the levels of PLC $\delta$ 4 for cells cultured in adipogenic medium (Figure 2B). On the other hand, in the osteogenic differentiation there were no differences between the different days analyzed (Figure 2C). The involvement of other nuclear PLC isoforms ( $\beta$ 1,  $\delta$ 1 and  $\gamma$ 1) with cellular differentiation processes has recently been described by several authors, in several cell models and types of differentiation, such as myogenic, adipogenic, osteogenic, and even hematopoietic differentiations, such as erythroid and myeloid [50-55]. Thus, our results are convergent with what has been observed by other research groups.

To further characterize PLC $\delta$ 4 functions in mesenchymal stem cells, we used siRNA. Silencing efficiency was assessed by qPCR and Western Blot (Figure 3). Growth curves of hASC cells silenced for PLC $\delta$ 4 indicated impaired proliferation of these cells, in relation to control cells (Figure 4A). Nuclear Ca<sup>2+</sup> has been described as an important messenger to cell proliferation [4]. When hepatocytes had their nuclear Ca<sup>2+</sup> chelated by nuclear-directed parvalbumin, their proliferation was significantly reduced. It demonstrates the connection between nuclear Ca<sup>2+</sup> signaling and cell proliferation, as process that seems to also involve PLCs. The reduction in proliferation of hASC cells silenced for

PLC $\delta$ 4 could be explained by an increase in cell death, which would reduce the number of viable cells, or by cell cycle arrest, which would make cells stop proliferating. The first hypothesis was discarded, since no increase in cell death was observed for hASC PLC $\delta$ 4 knockdown (Trypan Blue labeling, Figure 4B). However, cell cycle arrest for cells silenced for PLC $\delta$ 4 was observed (Figures 5 and 6). This arrest probably occurred due to the entry of the cells in a senescent stage (Figure 7), in which cells are metabolically active, but unable to divide [56].

The relation between nuclear PLCs and cell cycle regulation is described in the literature [23, 57-59]. In 2003, in his review of lipid and nuclear signaling, Irvine [60] already highlighted the connection between nuclear lipid oscillations and cell cycle progression. Cell cycle can be defined as a series of steps that leads to cell division. In each of these steps there are molecules responsible for the regulation of cell cycle progression, such as cyclins, CDKs (cyclin dependent kinases), pRB (retinoblastoma protein) and Cip/Kip inhibitors (p16, p21 and p27) [61]. Thus, PLCs interfere in cell cycle through interaction or signaling with these regulatory molecules.

hPLC $\beta$ 1 nuclear isoform, hPLC $\beta$ 1b, has expression peaks at G1/S and G2/M transitions [59]. One of the mediators of PLC $\beta$ 1b cell cycle modulation is diacylglycerol (DAG), generated as a product of the enzymatic activity of PLC $\beta$ 1b over PIP<sub>2</sub>. DAG, at G1/S transition, activates the cyclin D3-CDK4 complex, but in G2/M progression DAG leads to the translocation of PKC $\alpha$  and cyclin B1 to the nucleus. In rat fibroblasts, unlike PLC $\beta$ 1, PLC $\gamma$ 1 overexpression promotes DNA synthesis independently of its lipase activity [62]. For rat PLC $\delta$ 1, Kaproth-Joslin and colleagues (2008) [57], using shRNA (short hairpin RNA), described the reduction of Rat-1 and NIH 3T3 cell proliferation following PLC $\delta$ 1 silencing, with no increase in cell death and with alteration in G1/S transition, due to the reduction of cyclin E-CDK2 complex activity, but without alteration of cyclin D-CDK4 complex. The authors, however, did not observe an increase in senescence, as seen in our work (Figure 7). A better characterization of the molecules involved in PLC $\delta$ 4 knockdown cell arrest is necessary to determine precisely at which point in the cell cycle these cells are accumulated.

For PLC $\delta$ 4, there are cell cycle studies in rat cells and human tumor cells. In the case of rat PLC $\delta$ 4, it was observed that this predominantly nuclear protein has a significant increase in its expression in G1/S transition, and this increase remains until the end of M phase, but when cells enter in a new G1 phase, the expression of PLC $\delta$ 4 practically disappears [27]. In regenerative rat livers, which underwent partial hepatectomy, occurred an increase in PLC $\delta$ 4 and PKCs  $\alpha$  and  $\varepsilon$  activities in PLC $\delta$ 4<sup>+/+</sup> animals, in G1/S transition, which did not happen with PLC $\delta$ 4<sup>-/-</sup> rats [63]. Our cell cycle results corroborate these findings, since the reduction of PLC $\delta$ 4 levels led to the interruption of progression from G1 to S (Figures 5 and 6). The reduction of EdU (S phase) and pH3 (mitosis) labeling (Figure 6) for siPLC $\delta$ 4 cells is an indicative that the inhibition of cycle progression starts in G1 phase. Moreover, this inhibitory response remains stable, since even 7 days after the transfection EdU and pH3 levels kept very low in siPLC $\delta$ 4 cells.

Defects in the signaling of any PI-PLC could potentially lead to the development of tumors, since these enzymes participate in cell cycle control. Leung and colleagues, in 2004 [22], analyzed matched samples of human cDNAs from tumor and normal cells and observed that hPLC $\delta$ 4 was overexpressed in tissues derived from breast and testicular cancers. In addition, they reported that PLC $\delta$ 4 overexpression led to faster proliferation of MCF-7 cells in serum-free medium, formation of colonies on soft agar, and formation of densely packed spheroids on low-adhesion plaques, indicating a possible role of hPLC $\delta$ 4 in oncogenesis.

Regarding the increase in the percentage of senescent cells in hASC PLC $\delta$ 4 knockdown (Figure 7), it was not found in the literature the description of similar events for PLCs. However, in human breast cancer cells, BT474 and MCF-7, it was observed that PIP4K silencing (PI4P-phosphorylating kinase, which generates PIP<sub>2</sub>) led to the accumulation of reactive oxygen species (ROS) in the cells, directing them to senescence [64]. Cell senescence is a state in which cells stop dividing, leading to a profile of apoptosis resistance, often with increased protein synthesis, increased glycolytic metabolism, reduced fatty acid oxidation, increased ROS, and increased secretion of factors associated with senescence (SASP; [65]). Senescence of siPLC $\delta$ 4 cells,



observed from 2 days after transfection, could explain the non-transient effects seen in the reduction of cell growth (Figure 4) and in the reduction of EdU and pH3 labeling (Figure 6), which remained reduced in comparison to controls, even 7 days post-transfection. PLC $\delta$ 4 silencing modifies cellular metabolism from the time siRNA is added to cells, and this modification is maintained even with the withdrawal of siRNA, showing that the effects of PLC $\delta$ 4 reduction appear to be persistent.

In summary, this work provides evidence that hPLC $\delta$ 4 is essential for cell proliferation in human mesenchymal stem cell. The elucidation of nuclear PLC $\delta$ 4 signaling mechanism may contribute to the understanding of resistance mechanisms of antitumor therapies, as well as to the development of new therapies. In addition, advancing the understanding of signaling pathways and the functional effects of PLC $\delta$ 4 may improve differentiation processes in stem cells, which could be used in differentiation techniques for tissue engineering.

## **5. Conclusions**

Our data show that human PLC $\delta$ 4 is involved in cellular differentiation and cellular proliferation, being these processes possibly mediated by nuclear Ca<sup>2+</sup>. Further characterization of PLC $\delta$ 4 signalization is needed, to depict how PLC $\delta$ 4 is activated and which cell signaling pathways this PLC activates.

## **Conflict of interest**

The authors declare that they have no competing interests.

## **Acknowledgments**

This work was supported by the NIH grant 1R03TW008709 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 thank “Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas

*Gerais*” for its financial sponsorship. The authors also thank “*Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do ICB/UFMG*” (CAPI) for technical support.

## References

- [1] M.J. Berridge, P. Lipp, M.D. Bootman, The versatility and universality of calcium signalling, *Nature reviews. Molecular cell biology* 1(1) (2000) 11-21.
- [2] C.C. Mendes, D.A. Gomes, M. Thompson, N.C. Souto, T.S. Goes, A.M. Goes, M.A. Rodrigues, M.V. Gomez, M.H. Nathanson, M.F. Leite, The type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor preferentially transmits apoptotic Ca<sup>2+</sup> signals into mitochondria, *The Journal of biological chemistry* 280(49) (2005) 40892-900.
- [3] N. Minagawa, J. Nagata, K. Shibao, A.I. Masyuk, D.A. Gomes, M.A. Rodrigues, G. Lesage, Y. Akiba, J.D. Kaunitz, B.E. Ehrlich, N.F. Larusso, M.H. Nathanson, Cyclic AMP regulates bicarbonate secretion in cholangiocytes through release of ATP into bile, *Gastroenterology* 133(5) (2007) 1592-602.
- [4] M.A. Rodrigues, D.A. Gomes, M.F. Leite, W. Grant, L. Zhang, W. Lam, Y.C. Cheng, A.M. Bennett, M.H. Nathanson, Nucleoplasmic calcium is required for cell proliferation, *The Journal of biological chemistry* 282(23) (2007) 17061-8.
- [5] K. Mikoshiba, The InsP3 receptor and intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling, *Current opinion in neurobiology* 7(3) (1997) 339-45.
- [6] O.A. Fedorenko, E. Popugaeva, M. Enomoto, P.B. Stathopoulos, M. Ikura, I. Bezprozvanny, Intracellular calcium channels: inositol-1,4,5-trisphosphate receptors, *European journal of pharmacology* 739 (2014) 39-48.
- [7] M.J. Berridge, M.D. Bootman, H.L. Roderick, Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling, *Nature reviews. Molecular cell biology* 4(7) (2003) 517-29.
- [8] G.E. Hardingham, S. Chawla, C.M. Johnson, H. Bading, Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression, *Nature* 385(6613) (1997) 260-5.
- [9] A.N. Malviya, P.J. Rogue, "Tell me where is calcium bred": clarifying the roles of nuclear calcium, *Cell* 92(1) (1998) 17-23.
- [10] T. Pusl, J.J. Wu, T.L. Zimmerman, L. Zhang, B.E. Ehrlich, M.W. Berchtold, J.B. Hoek, S.J. Karpen, M.H. Nathanson, A.M. Bennett, Epidermal growth factor-mediated activation of the ETS domain transcription factor Elk-1 requires nuclear calcium, *The Journal of biological chemistry* 277(30) (2002) 27517-27.
- [11] N. Gomez-Ospina, F. Tsuruta, O. Barreto-Chang, L. Hu, R. Dolmetsch, The C terminus of the L-type voltage-gated calcium channel Ca(V)<sub>1.2</sub> encodes a transcription factor, *Cell* 127(3) (2006) 591-606.
- [12] P.N. Tasker, C.W. Taylor, G.F. Nixon, Expression and distribution of InsP(3) receptor subtypes in proliferating vascular smooth muscle cells, *Biochemical and biophysical research communications* 273(3) (2000) 907-12.
- [13] W. Echevarria, M.F. Leite, M.T. Guerra, W.R. Zipfel, M.H. Nathanson, Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum, *Nature cell biology* 5(5) (2003) 440-6.

- [14] M.F. Leite, E.C. Thrower, W. Echevarria, P. Koulen, K. Hirata, A.M. Bennett, B.E. Ehrlich, M.H. Nathanson, Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(5) (2003) 2975-80.
- [15] P. Marius, M.T. Guerra, M.H. Nathanson, B.E. Ehrlich, M.F. Leite, Calcium release from ryanodine receptors in the nucleoplasmic reticulum, *Cell calcium* 39(1) (2006) 65-73.
- [16] D.A. Gomes, M.A. Rodrigues, M.F. Leite, M.V. Gomez, P. Varnai, T. Balla, A.M. Bennett, M.H. Nathanson, c-Met must translocate to the nucleus to initiate calcium signals, *The Journal of biological chemistry* 283(7) (2008) 4344-51.
- [17] B. Payraastre, M. Nievers, J. Boonstra, M. Breton, A.J. Verkleij, P.M. Van Bergen en Henegouwen, A differential location of phosphoinositide kinases, diacylglycerol kinase, and phospholipase C in the nuclear matrix, *The Journal of biological chemistry* 267(8) (1992) 5078-84.
- [18] L.R. Vann, F.B. Wooding, R.F. Irvine, N. Divecha, Metabolism and possible compartmentalization of inositol lipids in isolated rat-liver nuclei, *The Biochemical journal* 327 ( Pt 2) (1997) 569-76.
- [19] I. Faenza, R. Fiume, M. Piazzini, A. Colantoni, L. Cocco, Nuclear inositide specific phospholipase C signalling - interactions and activity, *The FEBS journal* 280(24) (2013) 6311-21.
- [20] M.D. Bootman, C. Fearnley, I. Smyrniak, F. MacDonald, H.L. Roderick, An update on nuclear calcium signalling, *Journal of cell science* 122(Pt 14) (2009) 2337-50.
- [21] Y. Nakamura, K. Fukami, Regulation and physiological functions of mammalian phospholipase C, *Journal of biochemistry* 161(4) (2017) 315-321.
- [22] D.W. Leung, C. Tompkins, J. Brewer, A. Ball, M. Coon, V. Morris, D. Waggoner, J.W. Singer, Phospholipase C delta-4 overexpression upregulates ErbB1/2 expression, Erk signaling pathway, and proliferation in MCF-7 cells, *Molecular cancer* 3 (2004) 15.
- [23] S. Ratti, S. Mongiorgi, G. Ramazzotti, M.Y. Follo, G.A. Mariani, P.G. Suh, J.A. McCubrey, L. Cocco, L. Manzoli, Nuclear Inositide Signaling Via Phospholipase C, *Journal of cellular biochemistry* 118(8) (2017) 1969-1978.
- [24] S.B. Lee, S.G. Rhee, Molecular cloning, splice variants, expression, and purification of phospholipase C-delta 4, *The Journal of biological chemistry* 271(1) (1996) 25-31.
- [25] K. Nagano, K. Fukami, T. Minagawa, Y. Watanabe, C. Ozaki, T. Takenawa, A novel phospholipase C delta4 (PLCdelta4) splice variant as a negative regulator of PLC, *The Journal of biological chemistry* 274(5) (1999) 2872-9.
- [26] M. Asano, K. Tamiya-Koizumi, Y. Homma, T. Takenawa, Y. Nimura, K. Kojima, S. Yoshida, Purification and characterization of nuclear phospholipase C specific for phosphoinositides, *The Journal of biological chemistry* 269(16) (1994) 12360-6.
- [27] N. Liu, K. Fukami, H. Yu, T. Takenawa, A new phospholipase C delta 4 is induced at S-phase of the cell cycle and appears in the nucleus, *The Journal of biological chemistry* 271(1) (1996) 355-60.
- [28] H. Kim, P.G. Suh, S.H. Ryu, S.H. Park, Assignment of the human PLC delta4 gene (PLCD4) to human chromosome band 2q35 by fluorescence in situ hybridization, *Cytogenetics and cell genetics* 87(3-4) (1999) 254-5.

- [29] P.A. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J.W. Futrell, A.J. Katz, P. Benhaim, H.P. Lorenz, M.H. Hedrick, Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies, *Tissue engineering* 7(2) (2001) 211-28.
- [30] C.A. Schneider, W.S. Rasband, K.W. Eliceiri, NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nature methods* 9(7) (2012) 671-5.
- [31] J. Ye, G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen, T.L. Madden, Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction, *BMC bioinformatics* 13 (2012) 134.
- [32] R. Thibeaux, P. Ave, M. Bernier, M. Morcelet, P. Frileux, N. Guillen, E. Labruyere, The parasite *Entamoeba histolytica* exploits the activities of human matrix metalloproteinases to invade colonic tissue, *Nature communications* 5 (2014) 5142.
- [33] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic acids research* 29(9) (2001) e45.
- [34] M.W. Pfaffl, G.W. Horgan, L. Dempfle, Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR, *Nucleic acids research* 30(9) (2002) e36.
- [35] C. Riccardi, I. Nicoletti, Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry, *Nature protocols* 1(3) (2006) 1458-61.
- [36] A. Salic, T.J. Mitchison, A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(7) (2008) 2415-20.
- [37] Y. Wei, C.A. Mizzen, R.G. Cook, M.A. Gorovsky, C.D. Allis, Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in *Tetrahymena*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(13) (1998) 7480-4.
- [38] G.P. Dimri, X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E.E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith, et al., A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(20) (1995) 9363-7.
- [39] M. Brameier, A. Krings, R.M. MacCallum, NucPred--predicting nuclear localization of proteins, *Bioinformatics* 23(9) (2007) 1159-60.
- [40] J.R. Lin, J. Hu, SeqNLS: nuclear localization signal prediction based on frequent pattern mining and linear motif scoring, *PloS one* 8(10) (2013) e76864.
- [41] R. Fiume, G. Ramazzotti, I. Faenza, M. Piazzzi, A. Bavelloni, A.M. Billi, L. Cocco, Nuclear PLCs affect insulin secretion by targeting PPARgamma in pancreatic beta cells, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26(1) (2012) 203-10.
- [42] D.A. Gomes, M.F. Leite, A.M. Bennett, M.H. Nathanson, Calcium signaling in the nucleus, *Canadian journal of physiology and pharmacology* 84(3-4) (2006) 325-32.
- [43] Y.R. Yang, M.Y. Follo, L. Cocco, P.G. Suh, The physiological roles of primary phospholipase C, *Advances in biological regulation* 53(3) (2013) 232-41.
- [44] S.G. Rhee, Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C, *Annual review of biochemistry* 70 (2001) 281-312.
- [45] Y.H. Kim, T.J. Park, Y.H. Lee, K.J. Baek, P.G. Suh, S.H. Ryu, K.T. Kim, Phospholipase C-delta1 is activated by capacitative calcium entry that follows

phospholipase C-beta activation upon bradykinin stimulation, *The Journal of biological chemistry* 274(37) (1999) 26127-34.

[46] J.K. Kim, J.W. Choi, S. Lim, O. Kwon, J.K. Seo, S.H. Ryu, P.G. Suh, Phospholipase C-eta1 is activated by intracellular Ca(2+) mobilization and enhances GPCRs/PLC/Ca(2+) signaling, *Cellular signalling* 23(6) (2011) 1022-9.

[47] C. Klein, C. Gensburger, S. Freyermuth, B.C. Nair, G. Labourdette, A.N. Malviya, A 120 kDa nuclear phospholipase Cgamma1 protein fragment is stimulated in vivo by EGF signal phosphorylating nuclear membrane EGFR, *Biochemistry* 43(50) (2004) 15873-83.

[48] A. Xu, P.G. Suh, N. Marmy-Conus, R.B. Pearson, O.Y. Seok, L. Cocco, R.S. Gilmour, Phosphorylation of nuclear phospholipase C beta1 by extracellular signal-regulated kinase mediates the mitogenic action of insulin-like growth factor I, *Molecular and cellular biology* 21(9) (2001) 2981-90.

[49] K. Fukami, K. Takenaka, K. Nagano, T. Takenawa, Growth factor-induced promoter activation of murine phospholipase C delta4 gene, *European journal of biochemistry* 267(1) (2000) 28-36.

[50] G. Ramazzotti, I. Faenza, R. Fiume, A.M. Billi, L. Manzoli, S. Mongiorgi, S. Ratti, J.A. McCubrey, P.G. Suh, L. Cocco, M.Y. Follo, PLC-beta1 and cell differentiation: An insight into myogenesis and osteogenesis, *Advances in biological regulation* 63 (2017) 1-5.

[51] S.J. O'Carroll, M.D. Mitchell, I. Faenza, L. Cocco, R.S. Gilmour, Nuclear PLCbeta1 is required for 3T3-L1 adipocyte differentiation and regulates expression of the cyclin D3-cdk4 complex, *Cellular signalling* 21(6) (2009) 926-35.

[52] M. Kotani, M. Matsuda, A. Murakami, I. Takahashi, T. Katagiri, M. Hirata, Involvement of PRIP (Phospholipase C-Related But Catalytically Inactive Protein) in BMP-Induced Smad Signaling in Osteoblast Differentiation, *Journal of cellular biochemistry* 116(12) (2015) 2814-23.

[53] J. Kusuyama, A. Kamisono, S. ChangHwan, M.S. Amir, K. Bandow, N. Eiraku, T. Ohnishi, T. Matsuguchi, Spleen tyrosine kinase influences the early stages of multilineage differentiation of bone marrow stromal cell lines by regulating phospholipase C gamma activities, *Journal of cellular physiology* 233(3) (2018) 2549-2559.

[54] L. Cocco, C. Finelli, S. Mongiorgi, C. Clissa, D. Russo, C. Bosi, M. Quaranta, M. Malagola, S. Parisi, M. Stanzani, G. Ramazzotti, G.A. Mariani, A.M. Billi, L. Manzoli, M.Y. Follo, An increased expression of PI-PLCbeta1 is associated with myeloid differentiation and a longer response to azacitidine in myelodysplastic syndromes, *Journal of leukocyte biology* 98(5) (2015) 769-80.

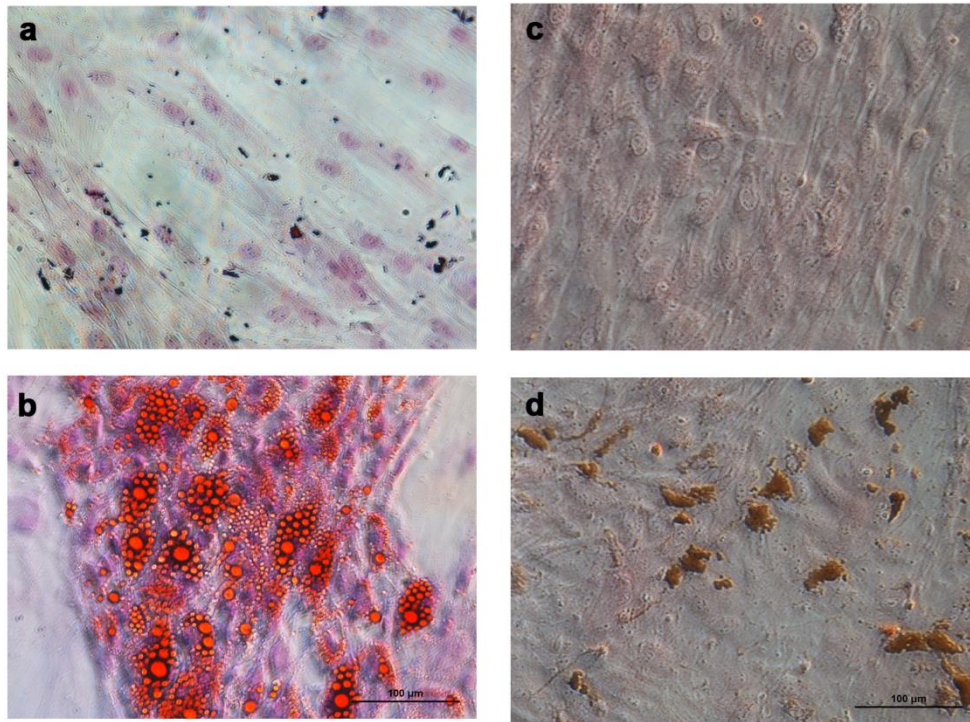
[55] L. Cocco, L. Manzoli, I. Faenza, G. Ramazzotti, Y.R. Yang, J.A. McCubrey, P.G. Suh, M.Y. Follo, Modulation of nuclear PI-PLCbeta1 during cell differentiation, *Advances in biological regulation* 60 (2016) 1-5.

[56] M. Althubiti, L. Lezina, S. Carrera, R. Jukes-Jones, S.M. Giblett, A. Antonov, N. Barlev, G.S. Saldanha, C.A. Pritchard, K. Cain, S. Macip, Characterization of novel markers of senescence and their prognostic potential in cancer, *Cell death & disease* 5 (2014) e1528.

[57] K.A. Kaproth-Joslin, X. Li, S.E. Reks, G.G. Kelley, Phospholipase C delta 1 regulates cell proliferation and cell-cycle progression from G1- to S-phase by control of cyclin E-CDK2 activity, *The Biochemical journal* 415(3) (2008) 439-48.

- [58] A. Poli, A.M. Billi, S. Mongiorgi, S. Ratti, J.A. McCubrey, P.G. Suh, L. Cocco, G. Ramazzotti, Nuclear Phosphatidylinositol Signaling: Focus on Phosphatidylinositol Phosphate Kinases and Phospholipases C, *Journal of cellular physiology* 231(8) (2016) 1645-55.
- [59] S. Ratti, G. Ramazzotti, I. Faenza, R. Fiume, S. Mongiorgi, A.M. Billi, J.A. McCubrey, P.G. Suh, L. Manzoli, L. Cocco, M.Y. Follo, Nuclear inositide signaling and cell cycle, *Advances in biological regulation* (2017).
- [60] R.F. Irvine, Nuclear lipid signalling, *Nature reviews. Molecular cell biology* 4(5) (2003) 349-60.
- [61] J. Bloom, F.R. Cross, Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control, *Nature reviews. Molecular cell biology* 8(2) (2007) 149-60.
- [62] M.R. Smith, Y.L. Liu, N.T. Matthews, S.G. Rhee, W.K. Sung, H.F. Kung, Phospholipase C-gamma 1 can induce DNA synthesis by a mechanism independent of its lipase activity, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(14) (1994) 6554-8.
- [63] A. Akutagawa, K. Fukami, Y. Banno, T. Takenawa, R. Kannagi, Y. Yokoyama, K. Oda, M. Nagino, Y. Nimura, S. Yoshida, K. Tamiya-Koizumi, Disruption of phospholipase Cdelta4 gene modulates the liver regeneration in cooperation with nuclear protein kinase C, *Journal of biochemistry* 140(5) (2006) 619-25.
- [64] B.M. Emerling, J.B. Hurov, G. Poulgiannis, K.S. Tsukazawa, R. Choo-Wing, G.M. Wulf, E.L. Bell, H.S. Shim, K.A. Lamia, L.E. Rameh, G. Bellinger, A.T. Sasaki, J.M. Asara, X. Yuan, A. Bullock, G.M. Denicola, J. Song, V. Brown, S. Signoretti, L.C. Cantley, Depletion of a putatively druggable class of phosphatidylinositol kinases inhibits growth of p53-null tumors, *Cell* 155(4) (2013) 844-57.
- [65] J.L. Kirkland, T. Tchkonja, Cellular Senescence: A Translational Perspective, *EBioMedicine* 21 (2017) 21-28.

## Supplementary Materials



**Supplementary Figure 1: Adipogenic and osteogenic differentiation of hASC.** 21 days after incubation with differentiation inducer media, cells were stained for the respective differentiation markers and photographed, using 20x objective lens. **a and b)** Cells stained for Oil Red O (lipid staining). **a)** Cells cultured with DMEM + FBS showed only hematoxylin staining (purple). **b)** Cells cultured with DMEM + FBS + adipogenic inducers presented intracellular lipid staining (red). **c and d)** Cells stained with Von Kossa method (mineralization staining). **c)** Cells cultured with DMEM + FBS showed only eosin staining (pink). **d)** Cells cultured with DMEM + FBS + osteogenic inducers presented mineralization nodules staining (brown). At least three independent experiments were performed.