

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

ANA MARIA RODRIGUES HENRIQUE

**Uma nova variante de *splicing* *STK3/MST2* que exibe
atividade de quinase reduzida e potencial clínico**

Versão original da tese apresentada conforme a resolução CopGr 5890

Orientador: Alexandre Bruni Cardoso

São Paulo

Data de depósito

26/07/2023

ANA MARIA RODRIGUES HENRIQUE

**Uma nova variante de *splicing* *STK3/MST2* que exibe
atividade de quinase reduzida e potencial clínico**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutora em Ciências (Bioquímica).*

Orientador: Alexandre Bruni Cardoso

São Paulo
2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

R696n Rodrigues Henrique, Ana Maria
Uma nova variante de splicing STK3/MST2 que
exibe atividade de quinase reduzida e potencial
clínico / Ana Maria Rodrigues Henrique. - São
Paulo, 2023.
106 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de
Bioquímica.

Orientador: Bruni-Cardoso, Alexandre

1. Hippo. 2. MST2. 3. Quinase. 4. Cancer. 5.
Proliferação. I. T. II. Bruni-Cardoso, Alexandre,
orientador.

Dedico este trabalho a todos que foram motivo dos meus
agradecimentos.

AGRADECIMENTOS

Certo dia esse “discurso” ecoou em minha mente de forma muito fluida. Diversas cenas passaram pelo meu lobo frontal contando essa história de quase cinco anos. Lembrei-me que muitas pessoas precisariam estar aqui e para começar quero citar quatro protagonistas chaves. Lembro-me bem de uma sala branca com muitas caixas de papelão empoeiradas e uma bancada livre onde pousei meu notebook para uma conversa com quem viria a ser meu futuro orientador. Preparei uma apresentação do meu projeto atual com alguns resultados e ensaiei muito. A conversa foi excelente e resultou em um convite para o curso de inverno no instituto de química. Além do curso, me preparei para realizar alguns experimentos que contribuiriam para o meu mestrado. No final de junho cheguei em São Paulo. A excelente recepção dos meus futuros colegas me fez acreditar que fazer o doutorado naquele laboratório estava mesmo parecendo uma boa ideia. Fiz o curso, fui aprovada na prova de ingresso, recheei minha dissertação com resultados interessantes e passados quarenta dias, voltei para o Espírito Santo com muitas experiências positivas. No dia seguinte da defesa do mestrado, embarquei para uma nova aventura, dessa vez como orientanda do Prof. Alexandre Bruni Cardoso, chamado carinhosamente pelos alunos de “boss” ou “chefe”. Aqui está o primeiro protagonista que merece ser agradecido. Alexandre foi uma peça-chave neste tempo, com ele aprendi e aprendo a cada conversa, a cada paper discutido, a cada experimento planejado e executado. Alexandre exala conhecimento. É uma pessoa inteligente, íntegra e paciente. Ele me incentivou e me mostrou que sou muito mais capaz do que o limite que eu me coloco. Reforçou para mim que o esforço e a dedicação valem a pena e que quando a gente quer, a gente faz. Um excelente exemplo foi quando precisei fazer a precipitação por afinidade da proteína MST2. Eu estava super insegura e ele me disse: “Eu poderia fazer com você,

mas não vou porque eu sei que você consegue”. E de fato, eu consegui. De novo tive que dizer: “É, o chefe tem razão”. Essas características merecem destaque porque fizeram muita diferença na pessoa que sou neste momento. Saio do laboratório dele mais forte, mais confiante, mais capacitada e mais preparada para desafios profissionais e pessoais. Eu sou muito grata por sempre me proporcionar os melhores reagentes, a oportunidade de fazer experimentos de ponta e por confiar a mim um dos projetos mais lindos do lab. Além disso, foi por meio do Alexandre que conheci a outra protagonista chave desta história. Nesta parte fico até emocionada porque além de tudo que já citei, o doutorado me deu mais um presente para a vida. Em todos esses anos, a Rebeka foi essencial. Em muitos momentos ela me deu algo que jamais voltará, o tempo. Sentou comigo para discutir meus dados, para pensarmos em novos experimentos, para chamar minha atenção quando precisei e para acolher minhas frustrações quando a resiliência parecia ter voado para outro planeta. Rebeka é admirável em muitos aspectos, com apenas cinco minutos de conversa ela espontaneamente mostra sua inteligência, sua garra, sua determinação e sua prontidão. A mesa dela no laboratório era um point, seja para discutir um experimento, um *paper*, para ela mostrar os seus resultados de 1 tera de tamanho ou mesmo para organizarmos festinhas. E isso nós adorávamos fazer. Juntas formávamos uma ótima dupla, o chefe nos apelidou de cálcio porque o que ele falava para uma, o cálcio da vez já transmitia a mensagem. Foram excelentes anos, até na pandemia fazíamos reuniões profissionais via google *meet*, gravávamos podcasts gigantescos no *whatsapp* para contar como foi o dia, oferecíamos comida uma para a outra e marcávamos picnic à distância na USP. Isso fortaleceu ainda mais a relação que já era promissora. A convivência com Rebeka melhorou meu pensamento crítico, minha criatividade, minha disciplina, meu planejamento, minha resiliência e me deu mais

maturidade. Não tenho palavras para agradecer tamanha generosidade e incentivo. Essa amiga que ganhei virou minha confidente de assuntos secretos e até madrinha do meu casamento. E falando em casamento, o outro protagonista que preciso citar aqui é o meu marido. Eu sempre soube que o melhor investimento para minha vida era ter alguém igual ao Hedrei como companheiro de caminhada. Ele deixa tudo mais leve e positivo. Nesse tempo eu vivenciei o prazer de estar com uma pessoa que apoia com atitudes, que compreende e é paciente. Não sei se aguentaria tantos momentos difíceis dessa caminhada se ele não tivesse me incentivado e me assistido com admiração e elogio todo o meu esforço. Combinado com o Hedrei, entra a minha mãe, Alda. Sem dúvidas é a maior patrocinadora dos meus sonhos. Ela é quem investe e merece todos os louros colhidos em todas as conquistas da minha vida. Ela não economiza palavras de amor, amparo, exortação e puxões de orelha quando precisa. Ela me faz querer ser feliz mesmo quando tudo está de cabeça para baixo. Ela me prova com a sua história que o importante é erguer a cabeça e continuar, não importa o que aconteça. Foi ela quem me ensinou o valor da gratidão por tudo e qualquer coisa. E por conta deste ensinamento é que eu quero agradecer à minha mãe do coração, tia Ane. Aquela que me adotou como filha e encheu minhas asas de purpurina, aquela que investiu e acreditou no meu potencial, aquela que me ensina todos os dias o valor da família e a importância da fé. Quero agradecer ao meu tio Hélio, por me dar tanto amor e carinho, à tia Lia e titia Márcia, elas me dão força e vibram a cada conquista minha. Ao meu pai Antônio e tia Cida, pelo carinho, cuidado e atenção. Aos meus irmãos, Léo e Mônica por tanto amor, amizade e afeição. À minha cunhada Silvia e à minha *best* Taly, por tanta admiração. Também quero agradecer aos meus amigos que tornaram tudo mais divertido. Bia e Mayara, obrigada por tantas risadas e troca de sentimentos. Thaís, Débora, Jéssica, Rafa, Karin e Jô,

obrigada por serem legais e compreensivas com meu sumiço. Luan e Gleici pelo incentivo de ir em busca dos meus sonhos. À minha igreja, IPBut, por ter me acolhido desde o início desta caminhada e por ter proporcionado suporte espiritual, médico e psicológico neste momento. A todos os moradores da casa dos estudantes da IPBut que compraram todas as minhas ideias malucas de hambúrguer e churrasco fora de hora e por terem sido tão legais e compreensivos quando eu gritava por silêncio. Agora, quero agradecer ao meu instituto preferido neste mundo, o IQ-USP. O lugar que me deu todo o suporte necessário para o crescimento científico, que colocou à prova as minhas limitações e que me deu um nome profissional respeitado no mundo inteiro. Além do Alexandre e da Rebeka, este ambiente me colocou em contato com cientistas brilhantes a quem devo muito. Agradeço a Flávia Meotti pelas longas e prazerosas conversas; a Deborah Schechtman, ao Nicolas Hoch, ao Walter Colli, à Júlia Manso pelos debates científicos; ao Eduardo Reis, por fornecer às amostras de pâncreas para enriquecer nosso projeto; ao Pedro Galante e à Gabriela Guardia pela parceria nos dados de bioinformática; à Ana Zen pelas instruções no início deste projeto; ao Antonio Manucci por compartilhar tanto conhecimento comigo, à Lilian Russo pelo apoio em todos esses anos e a Ray, minha vizinha de *lab*, que além de ser uma cientista admirável ainda se tornou uma amiga muito querida. Também agradeço aos cientistas brilhantes que ministraram aulas para mim, bem como aos meus colegas, Julian, Larissa, Lara, Karen, Rafaela e Lohanna os quais além de contribuírem para muitas discussões interessantes sobre as aulas ainda fizeram esse período longo e estressante parecer mais leve e divertido. Neste lugar, também tive o prazer de conhecer muitos funcionários incríveis que preciso agradecer, a começar pela Célia, que além ajudar no dia a dia do *lab* ainda trocava figurinhas da vida comigo. Aos meninos da secretaria, o Milton e o Vanderlei, que aguentaram a “perturbação”

da capixaba muitas e muitas vezes. À Alessandra que teve muita paciência comigo enquanto deixava nosso laboratório limpo e agradável. Também, quero agradecer aos antigos e atuais integrantes do *lab 1020*. Ao Giovani, Pedro e Bruna que deixarem meus dias mais divertidos; à Victória e Penélope por serem minhas mãos quando o *teamviewer* não funcionava, à Dulce, ao Tiago, meu implicante preferido neste mundo, ao Davi, Rafael, Priscila, Isaac e Lays, pelas conversas e trocas de conhecimento. Também, quero agradecer às agências financiadoras de pesquisa, CAPES e FAPESP, por acreditarem no meu trabalho e por lutarem pela pesquisa deste país e os Por fim, sou grata Àquele que me deu o dom da vida, Àquele que faz achar sentido em todas as coisas, Àquele que em meio à confusão me encontra e me faz acreditar que tanto sob o céu azul como sob as nuvens de chumbo tem Alguém que me faz achar o caminho mesmo que eu não mereça. Tudo isso sem nada em troca, tudo isso pela Sua graça. Para finalizar, eu gostaria de dizer aos que ficam e aos que estão entrando nesse universo da ciência no IQ para aproveitarem tudo que este lugar te oferecer, na medida do possível, é claro! Trabalhe muito e faça tudo o que estiver ao seu alcance, no final vai valer a pena. Aprenda a reavaliar os experimentos e escolha não sofrer por qualquer coisa, isso vai te deixar mais forte e preparado para os grandes desafios. Cultive uma vida e amigos fora desse universo, além de sair da sua bolha, ainda vai respirar um ar diferente que será uma válvula de escape quando as coisas por aqui parecerem que não vão dar certo. Aprenda a conviver com os períodos não muito bons ou péssimos, eles passarão. Entretanto, curta e celebre todos os bons momentos, a lembrança das comemorações a gente leva para a vida todinha. Te desejo muitos motivos para comemorar!

“muito do que não existe é do mais importante da vida, não despreze nada... agarre-se a uma fantasia se for boa, que a realidade é bem feita desses momentos mais espertos de lhe fugirmos de vez em quando”

a máquina de fazer espanhóis - Valter Hugo Mãe

Aproveite a jornada!

RESUMO

Rodrigues, A.M. **Uma nova variante de *splicing* *STK3/MST2* que exhibe atividade de quinase reduzida e potencial clínico.** 2023. 106 páginas. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A via Hippo consiste em uma cascata de serina-treonina quinases que desempenha um papel central na transdução de sinais mecânicos. Em mamíferos, o eixo canônico da via consiste na ativação das quinases MST1 e MST2 (codificadas pelos genes *STK4* e *STK3*, respectivamente) e LATS1 e LATS2. A ativação dos dois últimos culmina na fosforilação, retenção citoplasmática e inativação dos coativadores transcricionais YAP e TAZ. A inativação de Hippo resulta na localização nuclear de YAP/TAZ, aumento da proliferação e contribui para a transformação maligna em células epiteliais. No presente trabalho, identificamos que o exon 7, que codifica um segmento do domínio quinase de MST2, estava ausente em células malignas da glândula mamária humana, T4-2, mas não na linhagem não maligna, S1. A exclusão do exon 7 compromete a interação de MST2 com MOB1, um dos principais substratos de MST2. Ao contrário da proteína completa, a superexpressão de MST2 sem o exon 7 não resultou em aumento da morte celular, bem como, não diminuiu a proliferação celular. Esta nova variante de *STK3/MST2*, a qual denominamos *STK3^{Δ7}/MST2^{Δ7}* é produto de um exon *skipping* e foi encontrada em amostras de tumores de pacientes, mas pouco predominante em amostras de tecidos normais. Além disso, em pacientes com câncer pancreático, a expressão *STK3^{Δ7}* resultou em menor sobrevida específica da doença. A retenção do exon 7 foi menor em tumores mais agressivos e com alto grau histológico. Em ensaio 3D, células não malignas com expressão ectópica de *MST2^{Δ7}* não respondem aos sinais inibitórios da membrana basal reconstituída e formam estruturas *tumor-like*. Esta nova variante perde sua atividade quinase e pode perturbar a homeostase tecidual pela incapacidade de ativar morte e inibir a proliferação celular, mesmo em microambientes repressores desses processos em células normais, como na presença membrana basal. Esses achados podem avançar o nosso conhecimento sobre progressão tumoral com possível relevância clínica.

Palavras-chave: Hippo, MST2, quinase, câncer, morte celular, proliferação celular.

ABSTRACT

Rodrigues, A.M. **A novel STK3/MST2 splicing variant displays impaired kinase activity and clinical potential.** 2023. 106 pages. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The Hippo pathway consists of a cascade of serine-threonine kinases that plays a central role in the transduction of mechanical signals. In mammals, the canonical axis of the pathway consists of the activation of the kinases MST1 and MST2 (encoded by the genes *STK4* and *STK3*, respectively) and LATS1 and LATS2 and their activation culminates in the phosphorylation, cytoplasmic retention and inactivation of the transcriptional coactivators YAP and TAZ. Hippo inactivation results in nuclear localization of YAP/TAZ, increased cell proliferation, and contributes to malignant transformation in epithelial cells. In the present work, we identified that exon 7, which encodes a segment of the kinase domain of MST2, was absent in malignant cells of the human mammary gland, T4-2, but not in the non-malignant S1 cell line. Exclusion of exon 7 compromises the interaction of MST2 with one of its main substrates, MOB1. Unlike the full-length protein, overexpression of MST2 without exon 7 did not result in increased cell death, nor decreased cell proliferation. This new variant of *STK3/MST2*, which we named *STK3^{Δ7}/MST2^{Δ7}*, is the product of an exon skipping and was found in tumor samples, but seldomly found in samples of normal tissues. Furthermore, in patients with pancreatic cancer, *STK3^{Δ7}* expression resulted in lower disease-specific survival. Exon 7 retention was reduced in aggressive tumors with a high histological grade. In a 3D assay, non-malignant cells with ectopic expression of *MST2^{Δ7}*, even at low concentrations, do not respond to inhibitory signals from a reconstituted basement membrane and form tumor-like structures. This new variant loses its kinase activity and may disturb the tissue homeostasis due to its inability to activate death and to inhibit cell proliferation, even in microenvironments that repress these processes in normal cells, such as the basement membrane. These findings may advance our knowledge about tumor progression and might be clinically relevant.

Keywords: Hippo, MST2, kinase, cancer, cell death, cell proliferation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC - *American Joint Committee on Cancer*

BNT - Borda não tumoral

BPS - *Branch point site*

BRCA - Carcinoma invasivo de mama

CCLÉ - Cell Line Encyclopedia

Co-IP - *Co-Immunoprecipitation*

Dox - doxiciclina

DSS - Sobrevida específica de doença

ESEs - *exonic splicing enhancers*

ESSs - *exonic splicing silencers*

GBM - Glioblastoma multiforme

GTE_x - *The Genotype Tissue Expression*

HER2+ - HER2 positivo

HNSC - Carcinoma de cabeça e pescoço

ICESP - Instituto do Câncer de São Paulo Octávio Frias de Oliveira

ISEs - *Intronic splicing enhancers*

ISSs - *Intronic splicing silencers*

LA - Luminal A

LATS - *Large Tumor Suppressor*

LB - Luminal B

LBHER2+ - Luminal B HER2+

LIHC - Carcinoma hepatocelular de fígado

LUAD - Adenocarcinoma de pulmão

LUSC - Adenocarcinoma de células escamosas de pulmão

MMP - Metaloproteinases

MOB1 - *Mps1-binder-related*

MST - *Mammalian STE20-like*

MST2^{Δ7} - *Mammalian STE20-like* - delta sete

MST2^{FL} - *Mammalian STE20-like* - Full Length

NIH - *National Institute Health*

OV - Adenocarcinoma seroso de ovário

PA - Precipitação por afinidade

PAAD - Adenocarcinoma de pâncreas

PI - Iodeto de propídio

PRAD - Adenocarcinoma de próstata

RASSF5 - *Ras Association Domain-Containing Protein 5*

RNAseq - Sequenciamento de RNA

SARAH - Sav/Rassf/Hpo

SAV - *Salvador Family WW Domain Containing Protein 1*

SCF β TrCP - *Skp1/Cul1/F-box-protein/ β -transducing-repeat containing protein*
(complexo E3-ubiquitina ligase)

SKCM - Melanoma cutâneo

snRNA - *Small nuclear RNA*

SR - *Serine-Arginine protein*

STK3^{FL} - *Serine/Threonine Kinase 3 kinase - Full Length*

STK3 - *Serine/Threonine Kinase 3*

STK3 ^{Δ 7} - *Serine/Threonine Kinase 3 kinase - delta sete*

STK4 - *Serine/Threonine Kinase 4*

TAZ - *Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif*

TCGA - *The Cancer Genome Atlas*

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido

TEAD - *Transcriptional Enhancer Factor Domain*

TN - Triplo negativo

TNM - Tumor, nódulo e metástase

UICC - *International Union Against Cancer*

UVM - Melanoma uveal

YAP - *Yes-associated protein-1*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Hallmarks of cancer</i>	23
Figura 2 - Alterações na maquinaria de splicing podem contribuir para a progressão do câncer.....	27
Figura 3 - Esquema da via de sinalização Hippo.....	30
Figura 4 - Mecanismo de ação da quinase MST2.	34
Figura 5 - Regulação da proteostase e os efeitos celulares MST2..	36
Figura 6 - Uma nova variante de splicing de <i>STK3</i> foi identificada em células epiteliais malignas da glândula mamária.....	40
Figura 7- Validação da expressão ectópica de MST2 e MST2 ^{Δ7} em células não malignas da glândula mamária (MCF10A).....	56
Figura 8 - MOB1 é menos fosforilado em células que superexpressam MST2 ^{Δ7}	58
Figura 9 - MOB1 não foi precipitado com MST2 ^{Δ7}	61
Figura 10 - A exclusão do exon 7 prejudica a capacidade de MST2 de induzir morte celular e quiescência.	65
Figura 11 - <i>STK3</i> ^{Δ7} é expresso em amostras tumorais de pacientes.....	67
Figura 12 - A sobrevida específica de pacientes com câncer de pâncreas diminui significativamente com a expressão de <i>STK3</i> ^{Δ7}	69

Figura 13 - Análise expressão de <i>STK3^{Δ7}</i> nos de acordo com o estadiamento de diferentes tumores.....	72
Figura 14 - <i>STK3^{Δ7}</i> é preferencialmente expresso em amostras tumorais.....	73
Figura 15 - Expressão do mRNA de <i>STK3</i> total e <i>STK3^{FL}</i> em amostras da mama de pacientes.....	75
Figura 16 - O exon 7 tem menor retenção em amostras tumorais de pâncreas.	78
Figura 17 - A estrutura 3D de <i>MST2^{Δ7}</i> tem maior área que o <i>empty</i> e o <i>MST2^{FL}</i>	81
Figura 18 - Hipótese sobre o papel de <i>MST2^{Δ7}</i> na transformação maligna.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primers de STK3 usados no RT-qPCR.....	46
Tabela 2 - Plasmídeos usados neste estudo.	47
Tabela 3 - Lista de anticorpos.	50

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. Câncer.....	22
1.2. A via Hippo	29
1.3. MST1 e MST2.....	31
1.4. Resultados preliminares que fundamentam o presente trabalho	38
2. OBJETIVOS	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1. Cultura de células.....	43
3.2. Extração do RNA de amostras de pacientes disponíveis no ICESP.....	44
3.3. RT-PCR.	46
3.4. Geração das linhagens com MST2 induzível.....	47
3.5. Extração de proteínas, SDS-PAGE e precipitação.....	48
3.6. Ensaio <i>live and dead</i>.....	51
3.7. Ensaio de incorporação de 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU).....	52
3.8. Crescimento tridimensional das construções de MCF10A em Matrigel e análise das imagens de microscopia	53
3.9. Avaliação da expressão de <i>STK3^{Δ7}</i> em linhagens de células tumerais, tumores de pacientes e de tecidos saudáveis a partir de dados públicos de sequenciamento de RNA.	54

4. RESULTADOS.....	56
4.1. MOB1 é menos fosforilado em células expressando ectopicamente MST2^{Δ7}	56
4.2. Ao contrário de MST2^{FL}, a superexpressão de MST2^{Δ7} não induz morte celular e diminuição da proliferação.....	62
4.3. STK3^{Δ7} é expresso em amostras de tumores de pacientes e pode ter um potencial clínico.....	66
4.4. STK3^{FL} é menos expresso em tumores de mama de grau histológico 3.....	74
4.5. MST2^{Δ7} parece contribuir para a formação de estruturas maiores.....	78
4.6. Hipótese do papel de MST2^{Δ7} na progressão maligna.....	81
5. DISCUSSÃO	83
6. CONCLUSÃO	91

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

Câncer é um nome genérico dado a um grande conjunto de doenças que pode afetar muitas partes do corpo. Hanahan e Weinberg (2000; 2011) (1,2) enumeraram pontos comuns que unem fenótipos complexos de diversos tipos tumorais em um conjunto de características celulares (1,2). Até o ano 2011, oito características comuns foram listadas para o surgimento de tumores, as quais reúnem a capacidade para sustentar a sinalização proliferativa, evasão dos supressores de crescimento, resistência à morte, imortalidade replicativa, indução ou acesso à vasculatura, ativação da invasão e a metástase, reprogramação do metabolismo e escape da destruição por meio das células imunológicas (1). Mais recentemente, o desbloqueio da plasticidade fenotípica, ou seja, a capacidade da célula alterar sua fisiologia e morfologia pela modulação do ambiente, a reprogramação epigenética, os microbiomas polimórficos e a senescência celular foram acrescentadas às demais características comuns que capacitam as células incipientes à tumorigenicidade efetiva (Figura 1) (3).

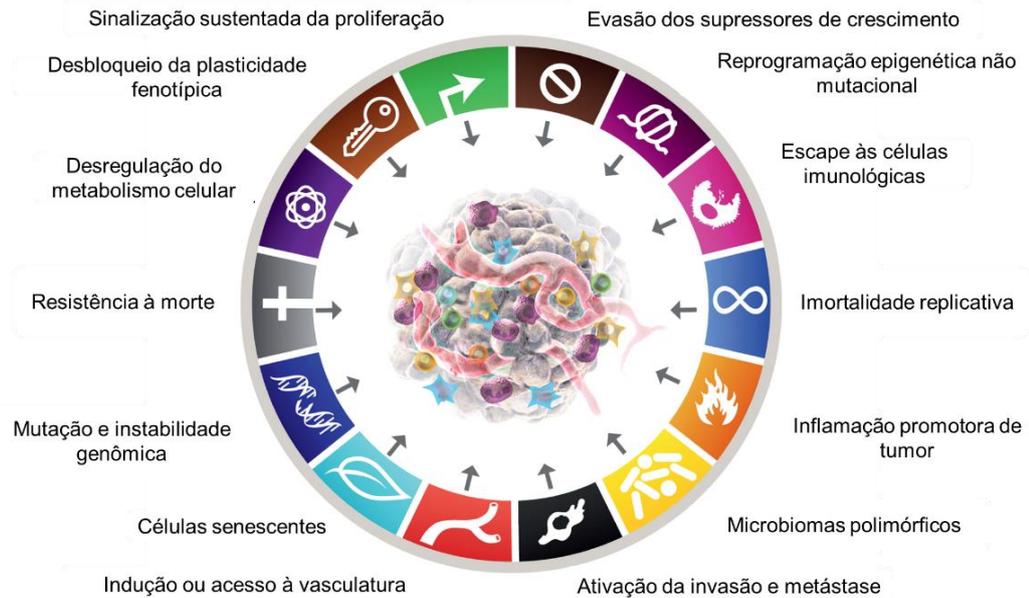


Figura 1 - Hallmarks of cancer. Em 2000, Hanahan e Weinberg propuseram seis características do câncer. Em 2011 foram incluídas outras características que antes eram emergentes, como reprogramação do metabolismo celular e escape às células imunológicas. Além dessas, também foram incorporadas inflamação promotora de tumor e instabilidade genômica como características que capacitam as células incipientes. Em 2022, foram propostas características emergentes e capacitadoras como desbloqueio da plasticidade fenotípica, reprogramação epigenética não mutacional, microbiomas polimórficos e células senescentes. (Adaptado de Hanahan, 2022).

Embora existam diversas características comuns a todos os tipos de câncer, esse conjunto de doenças ainda mantém particularidades únicas. Um robusto estudo publicado recentemente mostrou que os eventos genéticos, como as mutações de *driver* que contribuem para a tumorigênese, podem ocorrer ainda no útero da progenitora (4). Por outro lado, além das mutações, fatores adicionais como inflamação, homeostase de citocinas e o microambiente podem modular a trajetória desses clones (4).

As células cancerosas estão em contato com um complexo ambiente composto por elementos celulares, como as células do sistema imune e células não malignas e por componentes não celulares, como a matriz extracelular (5). Essas interações constituem a principal fonte de fatores adicionais que culminam em uma pressão

seletiva afetando o desenvolvimento do tumor por meio de diferentes processos que promovem ou suprimem seu desenvolvimento (5,6), revelando a história evolutiva única de cada câncer.

Dentre as alterações específicas para cada tipo de câncer, o *splicing* alternativo emerge como um processo que pode ter valor prognóstico e contribuir para todas as características da progressão do câncer (7). Neste processo, em que os íntrons do pré-mRNA (RNA mensageiro) são removidos e os exons unidos por meio de uma maquinaria especializada denominada spliceossomo, pode haver alterações que impeçam que o *splicing* aconteça corretamente (7). O spliceossomo reconhece regiões nas junções íntron-éxon por meio das seguintes sequências consenso: I) O dinucleotídeo “GU” na extremidade 5’ SS (Sítio de *splicing*) do íntron; II) O dinucleotídeo “AG” na extremidade 3’ do íntron; III) O ponto de ramificação *ou branch point site* (BPS), resíduo de adenosina, *upstream* à região 3’ do íntron; IV) uma região rica em pirimidinas entre o ponto de ramificação e a extremidade 3’ do íntron. Mutações nessas regiões geralmente levam ao salto de um exon provocando diversas doenças (8).

O spliceossomo é uma maquinaria formada por pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNP) chamadas de U1, U2, U4, U5 e U6, cada uma composta por um pequeno RNA nuclear específico (snRNA) e várias proteínas associadas (9). A montagem desta maquinaria se inicia com o reconhecimento do sítio de *splicing* 5’ SS pelo U1 snRNP por meio de interações de pareamento de bases RNA-RNA envolvendo 6-8 nucleotídeos do U1 snRNA e a extremidade 5’ do íntron. O próximo passo envolve a ligação estável dependente de ATP do U2 snRNP ao redor do local de ramificação também por meio pareamento de bases, entre seis nucleotídeos do U2

snRNA e os nucleotídeos que flanqueiam a adenosina presente no sítio de ramificação no íntron do pré-mRNA (10). As proteínas, SF3A e SF3B, presentes no U2 snRNP, são facilitadoras da aproximação da adenosina do local de ramificação à região 5' SS, configurando a primeira etapa da reação de *splicing*. A identificação da região do sítio de *splicing* 3' pelo spliceossoma envolve três elementos de sequência reconhecidos por três proteínas de interação, U2AF1, U2AF2 e SRSF2, onde a U2AF1 se liga ao dinucleotídeo AG conservado na extremidade 3' do íntron (9).

O SF3B1 é um componente central da proteína ribonuclear U2 pois reconhece o ponto de ramificação. As alterações em sua função comprometem o reconhecimento correto dos padrões de pré-RNA pelo spliceossomo devido à fidelidade reduzida da seleção do ponto de ramificação (11). O U2AF1, por outro lado, se liga ao sítio de *splicing* 3' de uma maneira altamente específica da sequência. Mutações nesse componente do spliceossomo, podem contribuir para as junções incorretas dos exons. Diversas alterações em outros membros do spliceossomo podem impactar o câncer (12).

Uma vez reconhecidos pelos snRNPs U1 e U2, o tri-snRNP U4–U6–U5 também se associam ao complexo nos locais de *splicing*, provocando mudanças conformacionais e trocas de proteínas que permitem a formação do núcleo catalítico do spliceossomo (13). Após reações de transesterificação os exons são unidos, os íntrons são degradados e os snRNPs reciclados, liberando dessa forma o mRNA maduro (14). O mRNA maduro é capaz de codificar variantes de proteínas distintas, contribuindo dessa forma para a homeostase celular, diferenciação e desenvolvimento celular quando o *splicing* acontece corretamente (15,16).

Além dos elementos citados acima, outros elementos em cis, podem contribuir para a decisão de inclusão ou exclusão dos exons. Esses elementos são classificados como silenciadores de junção intrônica (ISSs), intensificadores de junção intrônica (ISEs), silenciadores de junção exônica (ESSs) e intensificadores de junção exônica (ESEs). Esse último, geralmente são ligados por membros da família de proteínas SR (Ser-Arg), as quais possuem domínios RS que são fosforilados e geralmente atuam no *splicing* como ativadores (17).

Quase todas as características do câncer podem ser afetadas por anormalidades na maquinaria de *splicing*, desde elementos em trans até em cis (18–20). Como resumido na figura 2, alterações nos fatores de *splicing* podem contribuir para a progressão do câncer em diversos tumores sólidos, como mama, próstata, ovário, pulmão, pâncreas (18–25). Tal fato, reforça a ideia de que uma terapêutica direcionada para modulação desses elementos pode ser útil para o tratamento mais eficaz do câncer.

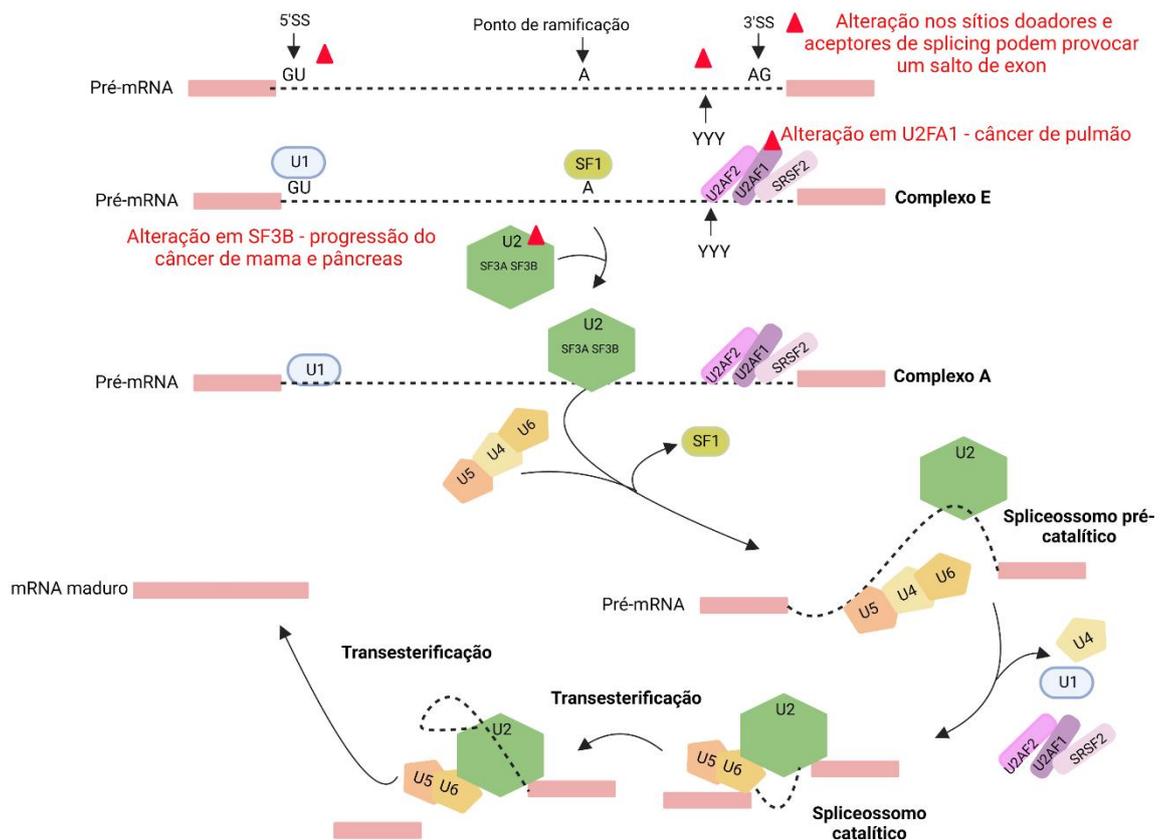


Figura 2 - Alterações na maquinaria de splicing podem contribuir para a progressão do câncer. O snRNP U1 reconhece o sítio de *splicing* 5' (5' SS) e por meio do pareamento de bases RNA-RNA, se liga no íntron (tracejado preto). A proteína, SF1 se liga ao ponto de ramificação ou *branch point site* (BPS), onde encontra-se uma adenosina, A. Alterações nesses pontos de reconhecimento podem provocar o salto do exon. U2AF2 e U2AF1 se ligam à região rica em pirimidinas (YYY) e à região 3' SS, respectivamente, dessa forma, o complexo E está montado. Alterações no U2AF1 podem contribuir para o surgimento do câncer de pulmão. Por meio da proteína U2AF, o U2 snRNP substitui SF1 no BPS também através do pareamento de bases formando o complexo A. Modificações na proteína SF3B, do U2 pode contribuir para a progressão do câncer de mama e de pâncreas. O complexo A é rearranjado com o recrutamento dos snRNP U5/U4/U6, onde o U4 e U6 são combinados por meio do pareamento complementar de seus componentes de RNA e o snRNP U5 é ligado ao complexo através da interação de proteínas, resultando na formação do complexo B. Em seguida, devido a diversas mudanças conformacionais, o snRNP U1 e o U4 saem do complexo e o U6 se liga à região 5' SS. Concomitantemente, o U6 e o U2 pareiam através do snRNA, resultando na formação do complexo B onde o spliceossomo é cataliticamente ativo. Ocorre uma transesterificação a qual gera o Complexo C. Com a segunda transesterificação o complexo pós-splicessômico é gerado, resultando na conexão dos exons (retângulo rosa) e formação do mRNA maduro. Os triângulos em vermelho mostram alguns pontos que quando alterados podem contribuir para o surgimento de doenças, bem como, contribuir para progressão de diversos tipos de câncer.

Nesse sentido, esforços têm sido empregados no desenvolvimento de terapias específicas para corrigir o *splicing* usando oligonucleotídeos *antisense* que se ligam especificamente a um transcrito redirecionando esse mecanismo (26). Esses

compostos *antisense* são pequenas moléculas de ácido nucleico de fita simples, que se ligam a sequências alvo complementares no pré-RNA mensageiro no núcleo (26). Essas sequências alvo podem ser silenciadores, intensificadores de *splicing* ou até mesmo sítios de *splicing* normalmente reconhecidos pelo spliceossomo.

Essa terapia é uma realidade para a distrofia muscular espinhal, onde já identificaram oligonucleotídeos que promovem a produção de SMN completa (27,28). A droga “Nusinersen (nome de mercado Spinraza)” se liga a uma região intrônica flanqueando o exon 7 aumentando sua inclusão no mRNA da SMN2 (29). Assim, a função da proteína que normalmente está ausente na atrofia muscular espinhal devido a mutações homozigóticas ou deleções do gene SMN1 e pela expressão truncada da proteína SMN2, é codificada em comprimento total e funcional (29). Embora nenhuma droga obteve autorização para comercialização, diversos *clinical trials* em andamento têm mostrado que os oligonucleotídeos *antisense* podem ser uma excelente alternativa para o tratamento de câncer (30–33) contudo, devido à heterogeneidade dos fatores tumorigênicos, mais estudos são necessários para se comprovar a efetividade dessa tecnologia para o câncer.

Além do *splicing*, modificação pós-traducional também pode se unir às alterações genéticas e fatores microambientais e contribuir para a transformação maligna (34). Dentre os diversos tipos de modificação pós-traducional, a fosforilação inadequada de proteínas é outro fator adicional que está no cerne, não somente da sinalização celular aberrante que ocorre em tumores, como também na sinalização de muitas outras doenças humanas. Tanto o ganho quanto a perda de fosforilação têm sido mecanismos chaves por trás da transdução de sinal prejudicada provocando mudanças cruciais associadas às doenças (35).

Diante deste cenário, um dos desafios dos cientistas é descobrir alterações, sejam elas genéticas ou não genéticas que poderiam contribuir para o surgimento de tumores e a partir desse conhecimento, desenvolver diagnóstico precoce e terapias especializadas para um tratamento mais eficiente. Neste trabalho, estudamos uma dessas alterações não genéticas visando uma importante quinase da via Hippo, por meio da qual novos diagnósticos e tratamentos específicos para o câncer podem surgir.

1.2. A via Hippo

Nos últimos anos, a via Hippo tem ganhado bastante atenção, não só pelo seu provável envolvimento na regulação de tamanho de órgãos e regeneração tecidual, mas também pelo seu envolvimento em diversos tipos de câncer (36–38). Esta via foi identificada em *Drosófila* regulando genes por transdução de sinais através de seus efetores YAP (*Yes associated protein 1*) e seu parálogo TAZ (*Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif*) (37,39). Dados conflitantes mostraram recentemente que, ao contrário do que se acreditava, a via Hippo não tem como principal função regular o crescimento do órgão e a homeostase em moscas. Contudo, em caso de injúria, Yki (ortólogo de YAP em *Drosófila*) pode ser ativada e responder ao crescimento do órgão de maneira especializada (40).

Os componentes principais da via Hippo são MST1/2, SAV1, LATS1/2 e MOB1. Essas proteínas formam complexos de quinases que atuam em cascata no qual MST1/2-SAV1 fosforila e ativa MOB1-LATS1/2 (39). Uma vez fosforilado, LATS1/2 fosforila YAP e TAZ. Assim, YAP e TAZ são reconhecidas pela proteína 14-3-3 e retidos no citoplasma, onde são ubiquitinados e levados à degradação via proteassoma 26S (41–43). Por outro lado, a inativação da via Hippo, provoca ativação

de YAP/TAZ, por meio da ausência de fosforilação dessas proteínas, as quais podem ser translocadas para o núcleo onde atuam como co-fatores de transcrição, ativando principalmente fatores de transcrição da família TEAD (*Transcriptional Enhancer Factor Domain*) (43) (Figura 3).

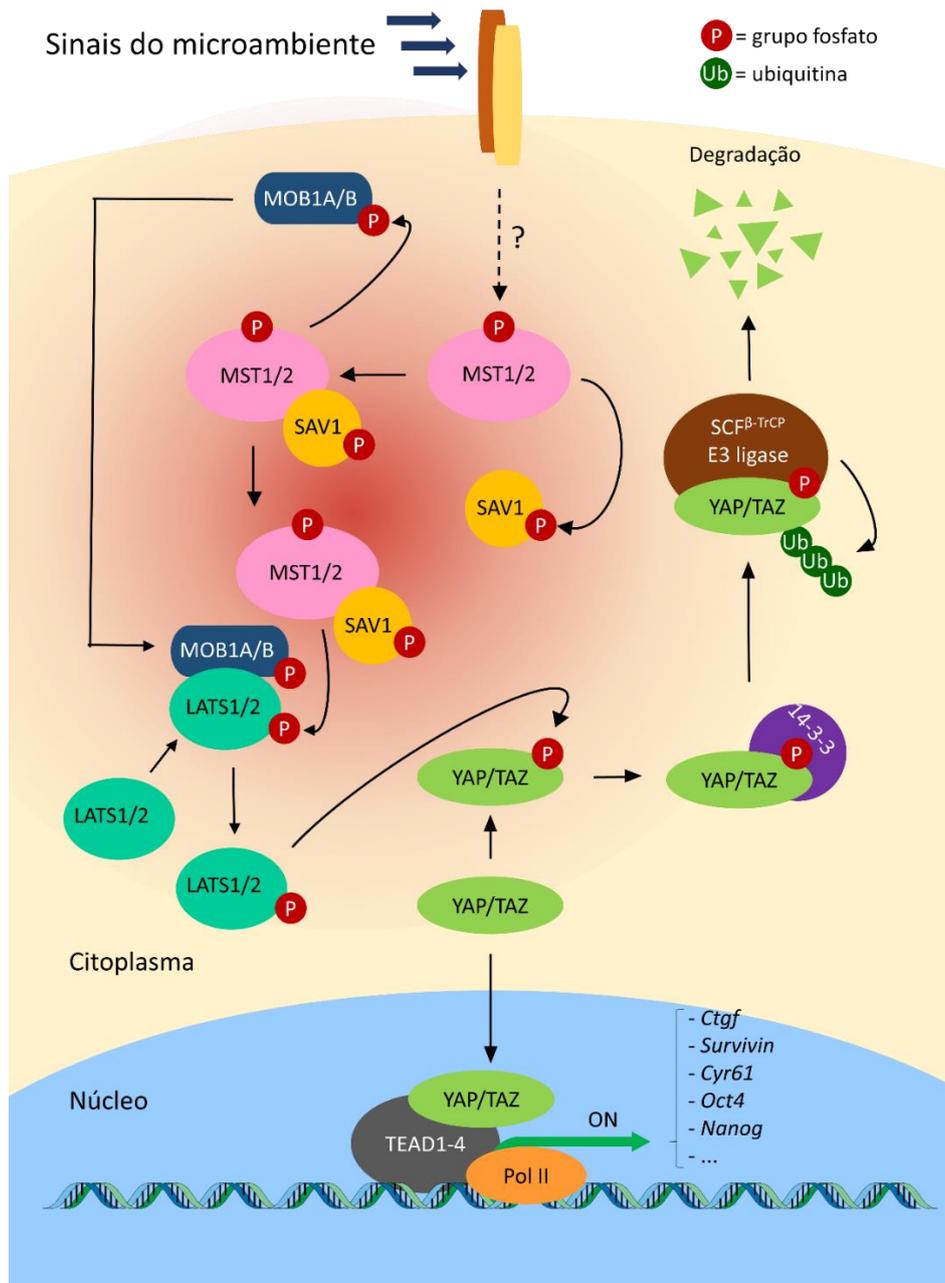


Figura 3 - Esquema da via de sinalização Hippo. Com a fosforilação de MST1/2 e LATS1/2, YAP/TAZ são fosforilados e retidos no citoplasma por proteínas 14-3-3. YAP/TAZ citoplasmáticos são reconhecidos pelo complexo E3 ligase SCF β -TrCP, poliubiquitinados e degradados via proteassoma 26S. Desfosforilados, YAP/TAZ são translocados ao núcleo, onde atuam como co-ativadores de transcrição (Crédito da imagem - Antonio Manucci).

A contribuição da via Hippo-YAP/TAZ na tumorigênese ainda é controversa e pouco compreendida. Estudos demonstraram que a desregulação da via Hippo está relacionada com o câncer de mama e que a superexpressão de YAP/TAZ pode promover a proliferação, migração e invasão celular (44–47). Outros trabalhos mostram que em modelos murinos, a perda de Lats1/2 induz respostas imunes inatas e adaptativas contribuindo para a imunogenicidade e limitando o crescimento e a metástase tumoral (48).

Ademais, os efeitos de supressão tumoral das quinases centrais da via Hippo, MST1 e MST2, têm sido reportados em diversos estudos. Por exemplo, a ativação de MST1 suprimiu a progressão do câncer de pâncreas (36) e sua superexpressão reduziu a invasão e a proliferação das células de câncer de pulmão (49). O knockout tecido-específico de ambos Mst1 e Mst2 no fígado resultou na perda de fosforilação da serina 127 da proteína Yap levando sua ativação, resistência à apoptose e crescimento hepático exacerbado (50). MST1 e MST2 também são conhecidas por suprimir o câncer de cólon por meio da inibição de YAP (51) e foi mostrado que MST2 suprime o desenvolvimento do câncer de tireoide promovendo apoptose e inibindo a proliferação celular (52).

1.3. MST1 e MST2

Mammalian STe20-Like Kinase (MST) são quinases serina treonina centrais da via Hippo. MST1 e MST2 têm aproximadamente 56 kDa, são codificadas pelos genes *STK4* (em 20q13) e *STK3* (em 8 q22.2) e possuem 487 e 491 aminoácidos em sua estrutura, respectivamente. As proteínas MST1 e MST2 humanas compartilham mais de 95% de similaridade dos domínios catalíticos e aproximadamente 75% deles são idênticos em geral (53).

Uma das características mais distintas dessas quinases é a presença do domínio SARAH, um segmento alfa hélice na porção carboxi-terminal de aproximadamente 50 aminoácidos que medeia a formação de homodímeros e heterodímeros MST1-MST2 ou MST1 ou MST2 com outras proteínas que também contém o domínio SARAH como as da família RASSF. A homodimerização por meio do domínio SARAH cria um par altamente estável que compartilha uma interface altamente hidrofóbica (53).

MST1/2 sofrem autofosforilação em sua alça de ativação e este fenômeno requer homodimerização ou heterodimerização mediada pelo domínio SARAH (54). Essas proteínas de comprimento total ou seus domínios quinases purificados de bactérias são fosforilados em seus respectivos loops de ativação, mostrando dessa forma que ambas as proteínas podem sofrer ativação dependente de autofosforilação e não requer quinase *upstream* (55).

Em um estudo meticuloso acerca do mecanismo de ativação de MST2, Ni e colaboradores (2013) (55) criaram um mutante cataliticamente inativo do domínio quinase humano trocando um aspartato por uma asparagina no aminoácido 146. A estrutura cristalina foi resolvida por substituição molecular com a estrutura do domínio quinase de MST1 (código PDB: 3COM). O loop de ativação fosforilado na proteína MST1 ativa adota uma conformação estendida, ideal para a ligação do substrato como ocorre em outras quinases que necessitam da fosforilação em sua alça de ativação (55). O resíduo fosforilado na alça de ativação, na treonina 183 em MST1, faz interações eletrostáticas favoráveis com a arginina 148 em MST1 na alça catalítica (55). Por outro lado, a alça de ativação não fosforilada na estrutura inativa de MST2, se dobra em uma alfa hélice bloqueando o sítio ativo da quinase. Assim, o rearranjo

conformacional mediado pela fosforilação na alça de ativação é a base da ativação de MST1/2 (55).

Os autores ainda mostraram que a mutação nos resíduos de treonina 174 para alanina do domínio quinase ainda mantém a função de MST2 intacta na fosforilação do seu substrato MOB1. Ao contrário disso, a mesma mutação na treonina 180 abole a ação quinase de MST2 (55).

A interface MOB1-MST2 consiste em dois locais de contato separados espacialmente: 1) Sítio HS formado pela sequência hidrofóbica FMDYF, local em que MST2 interage com MOB1 por meio de interações hidrofóbicas e 2) Motivos TM, repetições de treoninas e metioninas. Uma vez ativado, MST2 autofosforila resíduos de treonina nos motivos TM do seu próprio *linker*, entre o domínio quinase e SARAH, e essas fosforilações formam locais de ancoragem para o substrato MOB1 (56). MST2 fosforila as treoninas 12 e 35 de MOB1 o que libera MOB1 de sua conformação autoinibida, permitindo assim a ativação de MOB1 (56–58). Vale ressaltar que, a fosforilação de MST2 acelera a dissociação da hélice *Switch*, um ligante longo flexível de carga positiva, de MOB1. Os autores descrevem esse mecanismo como um “puxar a corda”, por meio do qual MOB1 se torna acessível para a ligação de LATS (57).

Na transdução de sinal da via Hippo ativa, a fosforilação de LATS1/2 ocorre em um processo de duas etapas que requerem MOB1 fosforilado (59). No primeiro evento, MST1/2 fosforila LATS1 na treonina 1079 e no segundo, LATS sofre autofosforilação na serina 909 culminando em sua ativação. As superfícies de ligação de MST2-MOB1 e MOB1-LATS1 não se sobrepõem, sugerindo que MOB1 pode se ligar às duas proteínas simultaneamente (56).

MOB1 se liga simultaneamente à MST2 e LATS1, formando um complexo ternário MST2-MOB1-LATS1. Dessa forma, MOB1 funciona como um modelo de *scaffold* dinâmico para trazer temporariamente MST2 e LATS em estreita proximidade tornando mais eficiente a fosforilação de LATS na treonina 1079 por MST2 (56). O mecanismo de ação da quinase MST2 está resumido na figura 4.

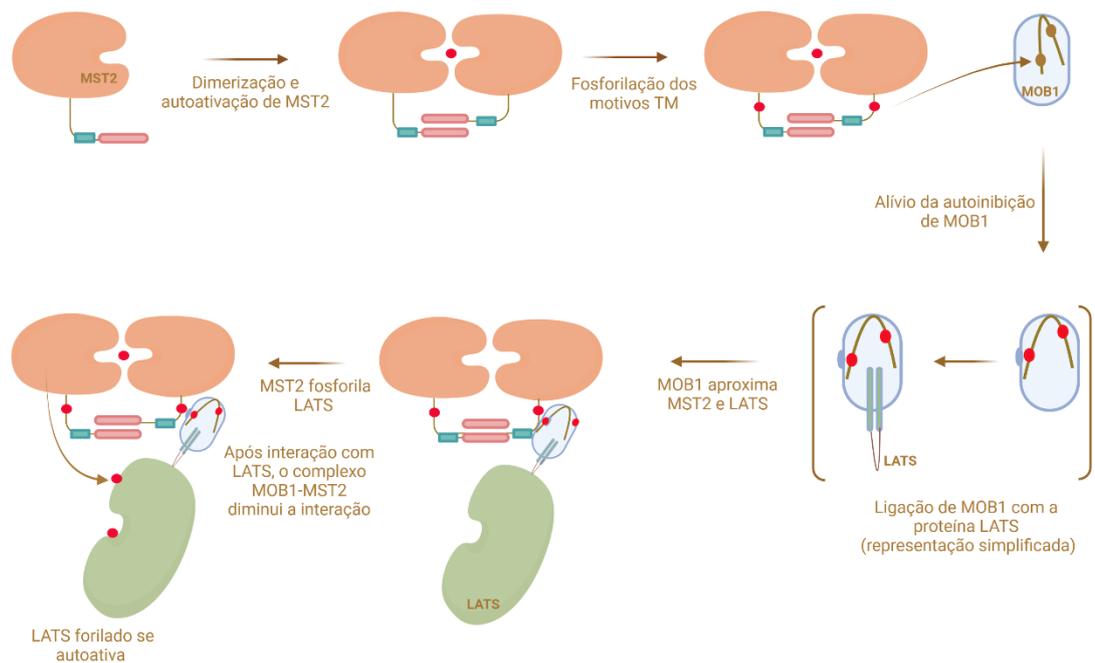


Figura 4 - Mecanismo de ação da quinase MST2. MST2 é dimerizado por meio do domínio SARAH que forma interação do tipo *coiled-coil*. Essa dimerização provoca a autofosforilação na treonina 180. Posteriormente, motivos TM no *linker* da quinase são fosforilados tornando MST2 apta para se ligar e fosforilar MOB1. Com a interação, nas treoninas 12 e 35 a autoinibição de MOB1 é aliviada permitindo que parte da proteína LATS se ligue à MOB1. Quando ligadas, MOB1 funciona como proteína *scaffold* para aproximação de MST2 e LATS, permitindo que a treonina 1079 de LATS seja fosforilada por MST2. Após essa fosforilação, LATS se autofosforila na serina 909, tornando-se totalmente ativada e pronta para fosforilar seus alvos. Após fosforilar MOB1, MST2-MOB1 perdem afinidade e o complexo se desfaz. O domínio SARAH está representado pelo bastão rosa claro, o motivo hidrofóbico (FMDYF) e os motivos TM fosforilados, importantes para interação MOB1-MST2, estão representados pelo bastão azul claro e pelo círculo vermelho, respectivamente. Os círculos vermelhos representam resíduos fosforilados.

Em vertebrados, MST1/2 formam hétero ou homodímeros e interagem com membros da família RASSF e SAV1 (60,61). Dados da literatura mostram que existem

seis genes que codificam proteínas RASSF e eles se ligam à MST1/2 devido a presença do domínio SARAH em sua cadeia polipeptídica (53). RASSF5, por exemplo, pode bloquear a ativação de MST2 através da interrupção da homodimerização de MST2 mediada pelo domínio SARAH. Entretanto, uma vez já ativada, a ligação de RASSF5 não tem efeito sobre a função quinase da proteína (55). SAV pode contribuir para a ativação das MSTs por meio da interação do domínio SARAH, contudo, os dados ainda não são claros (56).

Recentemente publicamos um trabalho, o qual participei ativamente na execução de experimentos de PCRs, silenciamento com siRNA e Western blottings, mostrando como a proteostase de MST2 é regulada. Por meio de uma co-imunoprecipitação (co-IP), onde β TrCP estava ligado à Flag, descobrimos que a proteostase de MST2 se inicia com sua interação com o complexo E3-ubiquitina ligase, formado por *Skp1/Cul1/F-box-protein/ β -transducing-repeat containing protein* (SCF β TrCP) e a degradação acontece via proteossoma 26S (62). Mutamos β TrCP em um local de importante interação com SKP1, região necessária para formação do SCF intacto. Observamos que MST2 interagiu com β TrCP de comprimento total e mutado, mas não com outras proteínas do complexo. Esse dado mostra um reconhecimento específico de MST2 com β TrCP (62). Confirmamos esse achado por meio do silenciamento de β TrCP, onde foi visto o acúmulo de MST2. Para a proteostase, as proteínas do complexo SCF reconhecem seus alvos por meio de motivos de degradação, chamados degrons. Descobrimos que a exclusão do degron EDG (375-377) quase aboliu a ligação de MST2 ao β TrCP, mostrando que SCF β TrCP induz a degradação de MST2 por meio da interação com um degron não canônico (62). A via Hippo responde a sinais mecânicos, deste modo, ainda neste estudo cultivamos células MCF10A em três níveis de substrato rígidos: 0,48 KPa (rigidez

fisiológica baixa), 4,47 KPa (rigidez média do estroma tumoral mamário) e 40,40 KPa (rigidez suprafisiológica). Vimos que quanto maior é a rigidez menor são os níveis proteicos de MST2 (62). Também, observamos que a degradação de MST2 foi aumentada em resposta à hiperativação de integrinas (62), contudo, quando β TrCP foi silenciado, mesmo com hiperativação das integrinas, MST2 acumulou, reforçando assim o papel crucial de β TrCP no mecanismo de degradação de MST2 (62) (Figura 5A).

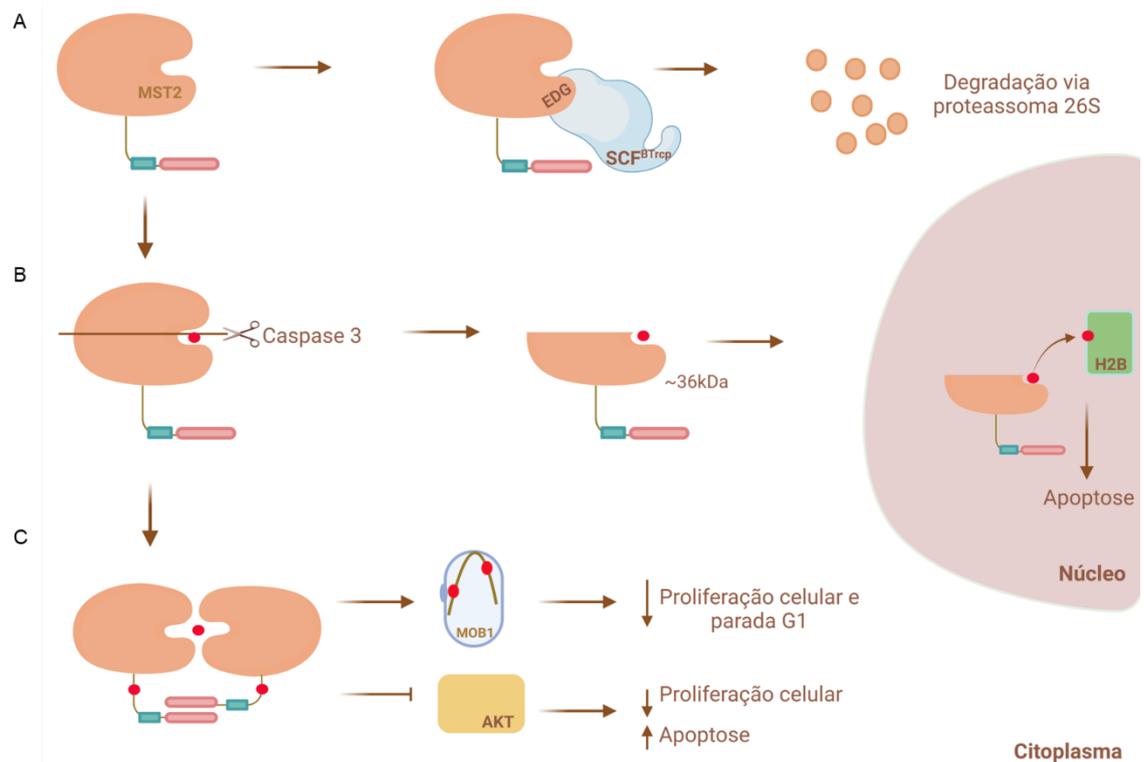


Figura 5 - Regulação da proteostase e os efeitos celulares de MST2. (A) MST2 interage com β TrCP, por meio de um *degron*, EDG, não canônico. Essa interação induz a degradação de MST2 via proteassoma 26S. (B) MST2 ativado é clivado por caspase 3, gera uma proteína de aproximadamente 36 kDa que tem acesso irrestrito ao núcleo. No núcleo, MST2 é capaz de fosforilar a histona H2B e induzir a apoptose. (C) MST2 ativo também fosforila MOB1 e interage com AKT. A ligação com MOB1 diminui a proliferação celular e parada do ciclo celular. A ligação com AKT interrompe a sinalização AKT-mTOR, provocando diminuição da proliferação e aumento de apoptose.

Há diversos registros na literatura apontando o papel de MST1/2 além da via Hippo-YAP, como por exemplo na sinalização que leva à apoptose e na regulação de

AKT-mTOR. Os efeitos pró apoptóticos das MSTs, podem ser atribuídos por clivagem mediada por caspase 3, evento este que requer a função quinase ativa das MSTs (63). Essa clivagem ocorre após a asparagina 326 e 322 nas proteínas MST1 e MST2, respectivamente, produzindo um fragmento cataliticamente ativo de aproximadamente 36 kDa que tem acesso irrestrito ao núcleo (63,64). No núcleo as MSTs são capazes de fosforilar a histona H2B na serina 14 e essa fosforilação pode contribuir para a progressão da apoptose por meio da condensação cromossômica que é um dos eventos cardinais durante a apoptose (64) (exemplificado na figura 5B).

Em murinos, Mst1/2 foram cruciais para a inibição da patogênese nos tecidos hepáticos (50,65). Preservando apenas um alelo de Mst1 ou Mst2, as células evoluíram para a tumorigênese, onde foi observado aumento na proteína c-Myc bem como, no mRNA que a codifica (50). Além de c-Myc, as proteínas Erk1/2 também tiveram seus níveis proteicos aumentados com a inativação das Msts (50).

Também foi observado que MST1 e MST2 podem regular a atividade AKT em câncer de próstata (66). AKT, também conhecida como proteína quinase B, faz parte da via PI3K/AKT/mTORC (67). Quando ativado, mTORC1 dirige a síntese proteica e proliferação celular. Esta via está alterada em diversos tipos de câncer e é bem caracterizada pelos seus efeitos anti-apoptóticos (68). Um estudo mostrou, por meio de espectrometria de massas, que MST1 é capaz de interagir com AKT e o efeito desempenhado por essa interação só é eficiente quando MST1 está ativada (66). Além disso, em células de câncer de próstata, quando as MSTs sofreram *knockdown*, por pequenos RNAs de interferência (siRNA), a fosforilação de AKT na serina 473 aumentou (66). Ainda, a inibição de PI3K só foi eficiente quando as MSTs estavam em plena atividade (66), mostrando que tanto MST1 quanto MST2 medeiam a

apoptose nesse contexto (Figura 5C). Uma análise de lâminas de *microarray* de tecido de câncer de próstata humano, revelou a co-localização de MST1 e AKT. Os baixos níveis de MST1 corresponderam ao alto nível de AKT ativado na serina 473 com a progressão da doença, apontando assim, que os efeitos inibitórios de MST1/2 na atividade de AKT pode ser menor com a progressão para os estágios mais avançados do câncer de próstata (66).

MST2 também pode interferir na proliferação celular por meio de MOB1 (59). Um estudo mostrou que a fosforilação de MOB1 na treonina 12, mas principalmente na treonina 35, por MST1/2 é crucial para a progressão G1/S e saída mitótica (59). Células de osteosarcoma (U2OS) foram usadas na superexpressão, induzida por doxiciclina, de um mutante na treonina 35 para uma alanina de MOB1. O efeito da mutação, tornando MOB1 não fosforilado por MST1/2, aumentou em 37% a progressão do ciclo celular para G2/M (59). Tal achado indica que a fosforilação de MST1/2 em MOB1 atrasa a saída mitótica e diminui a proliferação celular (representado na figura 5C).

1.4. Resultados preliminares que fundamentam o presente trabalho

A via Hippo é crucial para a regulação da proliferação, migração e invasão das células epiteliais (45,46). Para avaliar a integridade da via Hippo-YAP na transição para o fenótipo maligno, o nosso laboratório utilizou células da série HMT-3522, um modelo de progressão do câncer de mama. Essas linhagens são provenientes de células epiteliais da mama humana derivadas de uma amostra de mamoplastia redutora de paciente com doença fibrocística (69). O tecido epitelial foi cultivado em meio definido para dar origem às células S1. Essa linhagem é dependente do fator de crescimento epidérmico (EGF), se tornaram imortalizadas espontaneamente e se

comportam como células não malignas (69). A cultura sem EGF deu origem à S2, essencialmente não maligna. As células S2 quando inoculadas em camundongo deram origem à linhagem maligna T4-2, a qual possui alteração na expressão de diversos genes de capacitação invasiva no câncer de mama, como as metaloproteinases (MMP9, MMP13, MMP15 e MMP17) (69).

Como experimentos preliminares executados no nosso laboratório, antes do início deste projeto, foi realizado ensaio de Western blotting para determinar os níveis e a fosforilação de YAP, LATS e MOB nas linhagens S1 e T4-2. Observou-se que as células T4-2 exibiam redução da fosforilação de YAP na serina 127, bem como de TAZ na serina 89. Esta é uma fosforilação inibitória que marca YAP e TAZ para retenção citoplasmática (Figura 6A). Ademais, foi observado que MOB1, substrato direto de MST1 e MST2, foi menos fosforilado em T4-2 em comparação com células S1 (Figura 6A). LATS, que é a quinase responsável por fosforilar YAP e TAZ, também apresentou níveis reduzidos de fosforilação em células T4-2 (Figura 6A).

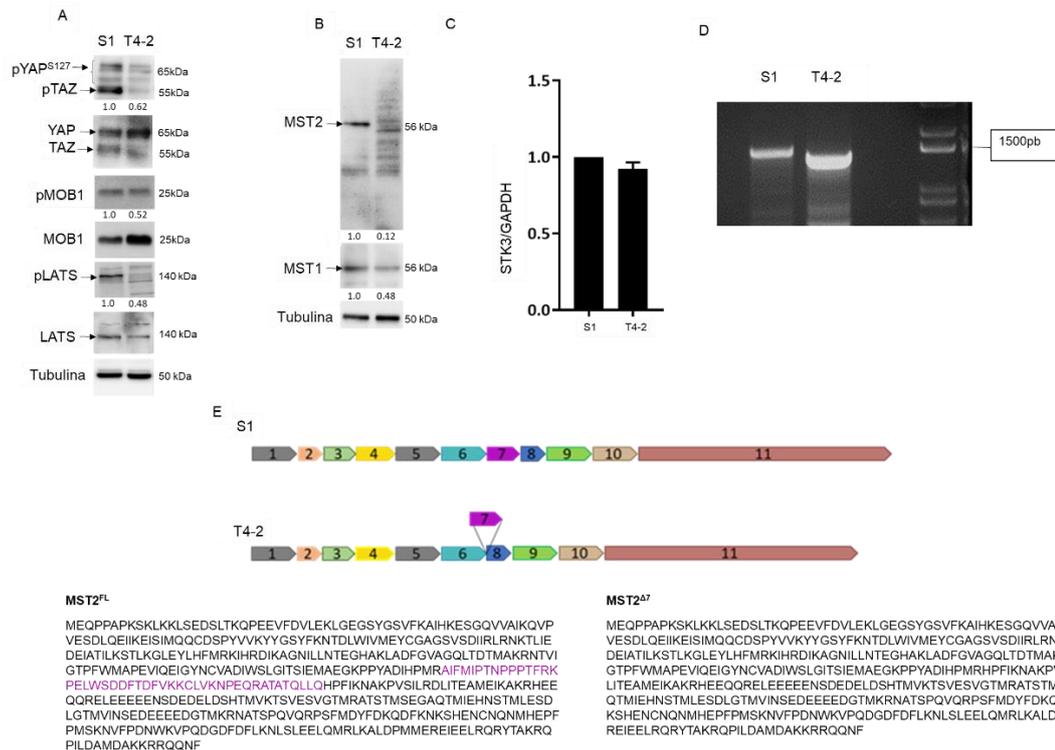


Figura 6 - Uma nova variante de *splicing* de *STK3* foi identificada em células epiteliais malignas da glândula mamária. (A) Proteínas da via Hippo (MOB1, LATS e YAP e TAZ) foram menos fosforiladas na célula maligna, T4-2, em comparação com a linhagem não maligna e singênica, S1. (B) A linhagem celular maligna T4-2 mostrou uma expressão diminuída da proteína MST1 e um padrão de bandeamento em “escada” e uma banda mais proeminente com tamanho menor para a proteína MST2. Nas células não malignas, S1, existe uma banda bem definida de 56 kDa (correspondente ao peso molecular esperado de MST2). (C) O mRNA de *STK3* teve expressão semelhante em ambas as células S1 e T4-2. (D) PCR *endpoint* mostrando que o tamanho do transcrito de *STK3* em T4-2 foi menor do que nas células não malignas. (E) O sequenciamento de Sanger revelou que T4-2 expressa uma variante de *splicing* de *STK3* sem todo o éxon 7, gerando, portanto, uma junção entre os éxons 6 e 8.

Ao avaliar a expressão proteica de MST1/2, foi observado diferenças significativas na linhagem maligna T4-2 em relação a não maligna, S1 (Figura 6B). Para MST1, observamos uma banda acentuada na linhagem não maligna e uma redução importante na linhagem maligna (Figura 6B). Entretanto, o padrão das bandas em diferentes alturas de MST2 no extrato de T4-2 chamou a atenção do grupo, uma vez que poderia indicar maior degradação da quinase nesta linhagem. Ao verificar os níveis de mRNA de *STK3*, não encontramos expressão diferencial entre as células S1

e T4-2 (Figura 6C). Esses dados indicam que a via Hippo é aberrante nas células T4-2 e que a proteína MST2 está sujeita à regulação pós-traducional.

Em seguida, num ensaio de PCR para a amplificação de todo o transcrito (ID: 6788, isoforma 1: NM_006281.4) de *STK3* e identificamos que as células T4-2 possuem um amplicon de cDNA menor que nas células S1 (Figura 6D). Ao sequenciar o cDNA, foi observado que nas células malignas todo o exon 7 estava ausente (Figura 6E) no transcrito maduro. Assim, a partir de agora, chamaremos o transcrito de *STK3* sem o exon 7 de *STK3^{Δ7}* e a proteína resultante desse *splicing* de *MST2^{Δ7}*, enquanto a proteína completa será referida como *MST2^{FL}*.

2. **OBJETIVOS**

Embora se observe um crescente interesse nos efeitos da via Hippo, poucos estudos focam nas quinases centrais (MST1 e MST2). Dessa forma, ao buscar entender se as proteínas da via eram diferencialmente expressas em linhagens singênicas da glândula mamária humana, encontramos uma nova variante de *STK3* (gene codificador da proteína MST2), a qual não apresenta todo o exon 7.

Neste contexto, o principal objetivo deste trabalho foi compreender a relevância da presença *STK3^{Δ7}* em processos celulares e em tumores. E os objetivos específicos foram:

Específico 1: Avaliar se a atividade quinase é alterada em *MST2^{Δ7}*.

Específico 2: Caracterizar os efeitos fenótipos da expressão de *MST2^{Δ7}* em células não malignas e malignas.

Específico 3: Verificar a ocorrência de *STK3^{Δ7}* em tumores presentes no TCGA.

Específico 4: Verificar a ocorrência de *STK3^{Δ7}* em amostras normais presentes no GTEX.

Específico 5: Avaliar a expressão de *STK3^{FL}* e a retenção do exon 7 em diferentes subtipos de câncer de mama de amostras de pacientes já disponíveis no Biobanco do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP).

3. **MATERIAIS E MÉTODOS**

3.1. **Cultura de células**

As linhagens HMT3522, como dito anteriormente, S1 (linhagem celular não maligna) e T4-2 (linhagem celular maligna), são células epiteliais da glândula mamária humana. Elas foram cultivadas em meio Dulbecco Modified Eagle's/HAM F-12 (1:1, DMEM/F-12, Gibco, # 12-500-062), meio definido sem soro contendo insulina (250 µg/mL, Sigma-Aldrich, #I5500), transferrina humana (10 µg/mL, Sigma-Aldrich, #T1147), selenito de sódio (2,6 ng/mL, Sigma-Aldrich, #S9133), estradiol (10⁻¹⁰ M, Sigma-Aldrich, #E2758), hidrocortisona (1,4 x 10⁻⁶ M, Sigma-Aldrich, #H4001), prolactina (5 µg/mL, Sigma-Aldrich, #L6520) e, apenas para S1, usamos EGF (10 ng/mL, Sigma-Aldrich, #E4127).

Como as células S1 são menores que as células T4-2, conforme demonstrado por Fiore e colaboradores (2017)(70), usamos diferentes densidades para obter uma confluência comparável e para obter extratos de proteínas para finalizar todos os experimentos. Assim, as células S1 foram semeadas na densidade de 2 x 10⁴/cm² e células T4-2 em 1 x 10⁴/cm². Após 4 dias, ambas as culturas mostraram confluência semelhante de cerca de ~ 50% para células S1 e ~ 60% para células T4-2. A passagem das células foi feita a cada 4 dias para células T4-2 e a cada 7 dias para S1 usando tripsina 0,25%-EDTA (Thermo Fisher, #252000-56). A inativação da tripsina foi realizada com inibidor de tripsina de soja (STI, Sigma-Aldrich, #T6522).

As células epiteliais da mama não maligna, MCF10A (doadas gentilmente por Mina J. Bissell -Lawrence Berkeley National Laboratory), foram cultivadas em meio Dulbecco Modified Eagle's/HAM F-12 (1:1, DMEM/F-12, Gibco, #12-500 -062), suplementado com 5% de soro de cavalo (Gibco, #16050-122), insulina (10 µg/mL,

Sigma-Aldrich, #I5500), hidrocortisona (10 µg/mL, Sigma-Aldrich, #H4001), toxina colérica (1 µg/mL, Sigma-Aldrich, #C8052), EGF (20 ng/mL, Sigma-Aldrich, #E4127) e 1X penicilina/estreptomicina (Thermo Fisher, #15140122). A passagem foi feita entre 3-4 dias usando Tripsina 0,05%-EDTA (Thermo Fisher, #252000-56) e para inativação da tripsina usamos inibidor de tripsina de soja (STI, Sigma-Aldrich, #T6522).

HEK293FT são células embrionárias de rim humano, elas foram doadas por Mina J. Bissell -Lawrence Berkeley National Laboratory e cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM High Glucose, Gibco, #31600-034), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, #12657-029), L-Glutamina (2 mM, Gibco, #A2916801), piruvato de sódio (1 mM, Gibco, #11360-070), aminoácidos não essenciais MEM (0,1 mM, Gibco, #11140-050) e gentamicina (50 µg/mL, Gibco, #15710-064). Para todos os experimentos, usamos células de densidade de 30K/cm².

A linhagem U2OS são células epiteliais de osteossarcoma humano, elas foram cultivadas em meio Dulbecco Modified Eagle's/HAM F-12 (1:1, DMEM/F-12, Gibco, #12-500-062), suplementado com 10% de SFB (Gibco, #12657-029) e 2X penicilina/streptomicina (Thermo Fisher, #15140122). A passagem das células foi realizada de 3 a 4 dias usando tripsina 0,05%-EDTA (Thermo Fisher, #252000-56) e para inativação da tripsina usamos meio completo 3:1.

Todas as células foram mantidas em condições de cultura padrão a 37°C e 5% de CO₂ em uma incubadora umidificada.

3.2. Extração do RNA de amostras de pacientes disponíveis no ICESP

86 amostras de pacientes, disponíveis no Biobanco do Instituto do Câncer de São Paulo Octavio Frias de Oliveira (ICESP), foram processadas para a extração de

RNA (CAAE: 06373719.0.3001.0065). As amostras se subdividiam em 43 bordas não tumorais adjacentes aos tumores e 43 tumores de mama. Das amostras tumorais, 9 eram luminal A, 9 luminal B, 7 luminal B HER2+, 4 HER2+ e 14 eram triplo negativas. Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), os fragmentos de tumor provenientes do procedimento de ressecção cirúrgica foram congelados imediatamente no N2 líquido. A obtenção das amostras para extração de RNA de tecido tumoral foi realizada por meio de cortes de 6 µm dos tecidos em criostato eletrônico multiuso, marca Carl Zeiss, modelo Hyrax C25. Para realizar os criocortes, inicialmente os tecidos foram incluídos em Tissue-Tek® O.C.T. Compound, Sakura® Finetek. Após, foi retirado o excesso de O.C.T. utilizando água Milli-Q ultrapura, livre de DNase/RNase. As superfícies internas e externas do criostato foram higienizadas com etanol 70% e em seguida com RNase away e mais 15 minutos de luz ultravioleta. Os criocortes de tecidos foram realizados em criostato a -34°C e, em seguida, colocados em tubos de 1,5mL previamente pesados e numerados, para obtenção de aproximadamente 5 mg e 30 mg de tecido para extração de RNA, sendo armazenados a -80°C até o momento do uso. Para a extração do RNA, foi utilizado o AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação de RNA foi realizada utilizando NanoPhotometer® P-Class Spectrophotometer (Implen, Alemanha). A qualidade do RNA foi determinada por eletroforese capilar usando 2200 TapeStation Instrument (Agilent Technologies, EUA). Somente as amostras com razão de absorbância A260/A280 entre 1,8-2,1 e RIN (RNA Integrity Number) > 7 foram utilizados para as análises. Para a eluição do RNA, foi utilizada a água ultrapura (livre de RNase e DNase). As amostras de RNA foram armazenadas no Freezer -80°C até o momento do uso. Para a obtenção do DNA complementar (cDNA), foi realizada a reação de transcrição reversa (RT) a partir

de 500 ng do RNA total utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, #4368814), seguindo as instruções do fabricante.

3.3. RT-PCR

Para o PCR quantitativo, foi utilizado 25 ng de cDNA em uma reação com volume final de 20 μ L, sendo 10 μ L do reagente SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies), e 200 nM de cada par de primer (Tabela 1). Nós desenhamos pares de primers que se anelam em regiões do exon 7, que cobrem regiões entre os exons 7 e 8 e entre os exons 6 e 7 para a detecção da presença do exon 7 de MST2. Para a detecção da deleção de exon 7, nós desenhamos primers que se anelam na junção 6-8. Todos os primers foram desenhados no programa Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/>

primer-blast/) a partir de sequências depositadas no GeneBank. A expressão gênica foi calculada através dos valores CT ($2^{-\Delta CT}$) (dos genes de interesse e do gene de referência) obtidos no programa ABI 7500 System Software (Applied Biosystems).

Tabela 1 - Primers de *STK3* usados no RT-qPCR.

Primer		Sequência
STK3 Exon 7-8	<i>Forward</i>	TGGTCCGATGATTTACCGAT
	<i>Reverse</i>	TGATACAGGTTTGGCATTCTTGA
STK3 Exon 8-9	<i>Forward</i>	ATCAAGAATGCCAAACCTGT
	<i>Reverse</i>	TTTTCATAGTTCCATCTTCT

3.4. Geração das linhagens com MST2 induzível

Células MCF10A e U2OS foram usadas para expressar MST2^{FL} ou MST2^{Δ7} usando um sistema de expressão induzível. A partir de um plasmídeo previamente projetado por nosso grupo(62), amplificamos o Flag2x _Strep2x fundido com as construções MST2^{FL} ou MST2^{Δ7} com Q5 High-Fidelity Polymerase (NEB, #M0492) usando primers específicos (EcoRI_Flag_Fw e MST2_Agel_Rv, listados na tabela 2). Flag2x _Strep2x _MST2 (FL ou Δ7) foram inseridas no vetor lentiviral induzível pLVX_TetOne-Puro (Clontech, #631849).

Para gerar os vírus, as células de empacotamento HEK293FT foram transfectadas usando PEI (Polietilenonimina, Polyscience, #23966), seguindo as recomendações do fabricante, com pLVX-FFSS-MST2^{FL} ou pLVX-FFSS-MST2^{Δ7} (Tabela 2). Coletamos o sobrenadante de 48 e 72 horas e posteriormente eles foram adicionados às células usando polibreno (brometo de hexadimetrina, Sigma-Aldrich, #H9268) para transfecção. Após 5 dias de seleção com puromicina (Sigma-Aldrich, #P8833) foi realizado o Western blotting para a certificação de que as células foram infectadas com sucesso. Para expressão da proteína FFSS-MST2^{FL} ou FFSS-MST2^{Δ7}, as células foram cultivadas na presença de doxiciclina (Sigma-Aldrich, #D9891) de acordo com as concentrações relatadas em cada figura.

Tabela 2 - Plasmídeos usados neste estudo.

Plasmídeo	Backbone	cDNA clonado	Referência
pCDNA3.1_FFSS-MST2Full lenght	pCDNA3.1_Flag2xStrep2x	MST2	(62)

pCDNA3.1_FFSS-MST2 ^{Δ7}	pCDNA3.1_Flag2xStrep2x	MST2 com deleção do exon 7	Este projeto
pLVX_FFSS_MST2	pLVX-TetOne-Puro	MST2	Este projeto
pLVX_FFSS_MST2 ^{Δ7}	pLVX-TetOne-Puro	MST2 com deleção do exon 7	Este projeto

3.5. Extração de proteínas, SDS-PAGE e precipitação

As células foram lavadas em PBS gelado e lisadas diretamente em um tampão Laemmli pré-aquecido (62,5 μM Tris, 2% SDS e 10% glicerol) sem azul de bromofenol e beta-mercaptoetanol. Os lisados foram fervidos por 15 min a 100°C, e a concentração de proteína foi determinada usando o kit DC Protein Assay (BioRad, #5000111). Após normalização das concentrações de proteína e adição de azul de bromofenol (0,15%) e beta-mercaptoetanol, as amostras foram fervidas novamente por 10 min e 20 μg de proteínas foram usadas no carregamento dos géis SDS-PAGE padrão.

Para a precipitação por afinidade (AP), as células foram lisadas em tampão de lise (20 mM Tris pH 8,0, 100 mM NaCl, 0,1% NP-40) contendo protease (Sigma-Aldrich, #11836145001) e inibidores de fosfatase (Sigma-Aldrich, #P5726). A fração insolúvel foi removida por centrifugação a 17.000G por 12 min a 4°C. A concentração de proteína foi determinada usando o kit DC Protein Assay (BioRad, #5000111). Para MCF10A-pLVX-*Empty*, MCF10A-pLVX-MST2^{FL} ou MCF10A-pLVX-MST2^{Δ7}, incubamos 1 mg de extratos de proteína com 20 μL de resina Strep-Tactin®

Sepharose® (Iba, #2-1201-002) e foram deixados em agitação na câmara fria a 4° durante 1 hora.

Posteriormente, 20 µL de cada extrato foram separados e lavados por 3 vezes com o mesmo tampão de lise. Em seguida, o precipitado foi eluído com o tampão de eluição competindo pelo sítio de ligação da Strep-tag. A este extrato, foi adicionado tampão de carregamento concentrado (5X) de forma que a concentração final fosse 1X. Após este processo, as amostras foram aquecidas e corridas em um gel SDS-Page conforme descrito acima.

As proteínas resolvidas foram transferidas para membrana de PVDF (0,22 µm, Millipore, #05317) seguidas por 30 min de incubação em um tampão de bloqueio (5% BSA, 0,1% Tween-20 em TBS). As membranas foram incubadas em um tampão de bloqueio contendo anticorpos primários durante a noite (Tabela 3). Em seguida, as membranas foram finalmente incubadas no anticorpo secundário (HRP) por 45 minutos à temperatura ambiente. O HRP foi detectado pelo kit de detecção Pierce SuperSignal (Thermo-Fisher, #A45916) e o sinal de quimioluminescência foi capturado com um ChemiDoc MP Imaging System (BioRad). Para avaliar o nível total de proteína na mesma membrana, usamos o protocolo de *stripping*. Para o *stripping*, as membranas foram lavadas 2 vezes por 10 min em água destilada e depois submetidas ao tampão de remoção (25 mM Glicina, 1% SDS em pH 2) e finalmente lavadas por 4 vezes com TBS-T por 5 min cada lavagem. Em seguida foram bloqueadas por 30 min e incubadas com o próximo anticorpo. Quando necessário, os sinais foram quantificados usando o *software* ImageJ.

Tabela 3 - Lista de anticorpos.

Alvo	Hospedeiro	Diluição	Fabricante (número de catálogo)
MST2	Rabbit	1:1000	Cell Signaling Technology (#3952S)
MST2	Mouse	1:1000	Proteintech (#66637-1-Ig)
pMST1(Thr183) /pMST2(Thr180)	Rabbit	1:1000	Cell Signaling Technology (#3681S)
pMOB(Thr35)	Rabbit	1:1000	Cell Signaling Technology (#8699S)
MOB	Rabbit	1:1000	Cell Signaling Technology (#13730S)
pLATS1 (Ser909)	Rabbit	1:1000	Cell Signaling Technology (#8654S)
pLATS1 (Thr1079)	Rabbit	1:500	Cell Signaling Technology (#D57D3)
LATS1	Rabbit	1:500	Cell Signaling Technology (#9153S)
pYAP ^{S127} /TAZ ^{S89}	Rabbit	1:500	Cell Signaling Technology (#13008S)
YAP	Rabbit	1:500	Cell Signaling Technology (#4912S)
Flag	Mouse	1:3000	Sigma-Aldrich (#4503365)

α -Tubulina	Mouse	1:10000	Thermo Fisher (#2036)
Mouse light-chain (secundário)	Goat (HRP)	1:10000	Jackson ImmunoResearch (#115-035-174)
Rabbit light-chain (secundário)	Goat (HRP)	1:10000	Jackson ImmunoResearch (#211-032-171)

3.6. Ensaio *live and dead*

As construções com vetor induzível das células MCF10A ou U2OS (pLVX-*Empty*, MST2^{FL} ou MST2 ^{Δ 7}) foram semeadas em uma placa de 96 poços. Após 24 horas, as células foram tratadas com concentrações crescentes de doxiciclina (Sigma-Aldrich, #D9891), conforme informado em cada figura. Após 24, 48 ou 72 horas (apenas 72 horas para as células U2OS), 10 μ M de iodeto de propídio (PI-Invitrogen, #P3566) (entra em células mortas) e 1 μ M de Hoechst (Invitrogen, #H3570) (marca núcleo vivo) foram adicionados por 10 min. As imagens foram adquiridas em um sistema TissueFAXS i-Fluo (TissueGnostics) montado em um microscópio Zeiss AxioObserver 7 (Zeiss), usando objetivas de 20x de abertura numérica 0.5. Foi traçado uma região de 8 x 8 em cada poço da placa de 96 e as imagens foram adquiridas por amostra usando autofocus automatizado. A análise foi feita com o *software* StrataQuest (TissueGnostics). Para quantificação da morte celular, núcleos individuais foram detectados usando o canal DAPI e a intensidade média do sinal PI foi determinada dentro da máscara de núcleos e usada para determinar a morte celular. O resultado da figura 7 mostra a porcentagem de células mortas em rosa e a porcentagem de

células vivas em azul. Os parâmetros de segmentação e detecção de núcleos no StrataQuest foram publicados por Russo e colaboradores (71).

3.7. Ensaio de incorporação de 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU)

O kit Click-iT® EdU (Life Technologies, #C10337) foi usado para determinar a porcentagem de células em proliferação em todas as construções. MCF10A-pLVX-Empty, MCF10A-pLVX-MST2^{FL} ou MCF10A-pLVX-MST2^{Δ7} foram cultivados nas condições descritas no ensaio *live and dead* descrito acima. O EdU é incorporado apenas em células que estão replicando seu DNA. Usamos 10 μM de EdU por 40 min de incubação, posteriormente as células foram fixadas com 2% de PFA e seguimos o protocolo de acordo com as recomendações do fabricante até o momento da incorporação do DAPI. As células foram então contrastadas com DAPI por 10 min e as imagens foram adquiridas em um sistema personalizado TissueFAXS i-Fluo (TissueGnostics) montado em um microscópio Zeiss AxioObserver 7 (Zeiss), usando objetivas de 20X, de abertura numérica 0.5. A análise foi feita com o *software* StrataQuest (TissueGnostics).

A análise estatística para o ensaio de *live and dead* e EdU incluiu análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Dunnett ou teste de Tukey para comparação de vários conjuntos de dados usando o *software* Prism versão 7.0 (GraphPad Software). Os dados representam as médias do número indicado de experimentos independentes. As barras de erro indicam o erro padrão da média (SEM). A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.

3.8. Crescimento tridimensional das construções de MCF10A em Matrigel e análise das imagens de microscopia

Esse ensaio foi adaptado utilizando o protocolo da pesquisadora Joan Brugge como base, os quais estão disponíveis no site do seu laboratório (<https://brugge.hms.harvard.edu/protocols>).

As células MCF10A (MCF10A-pLVX-*Empty*, MCF10A-pLVX-MST2^{FL} ou MCF10A-pLVX-MST2^{Δ7}) foram tripsinizadas conforme o protocolo de cultura mostrado acima. Paralelo a isto, adicionamos 100 µL de Matrigel em cada poço da câmara de 8 poços (BD Falcon CultureSlide, #354118) e incubamos à 37°C por 40 min para permitir que o Matrigel gelifique completamente.

Para este ensaio usamos somente duas condições de cada construção (0 ng/mL e 50 ng/mL de doxíciclina para indução). Para tanto, 5000 células de cada construção, e para cada condição, foram ressuspendidas em 400 µL do meio chamado *Assay medium*, composto por DMEM-F12, soro de cavalo (2%), hidrocortisona (0,5 µg/mL), toxina colérica (100 ng/mL), insulina (10 µg/mL) e Pen/Strp (1X). O *assay medium* ainda foi suplementado com EGF (5 ng/mL) e Matrigel (2%), ambos adicionados de forma fresca.

No dia seguinte ao plaqueamento trocamos o meio de cultura (*assay medium*) suplementado a partir de então com doxíciclina ou não. As próximas trocas de meio foram realizadas a cada 4 dias e as células foram mantidas por 21 dias em cultura até a formação do lúmen.

As imagens de contraste de fase foram capturadas com microscopia DMI8 com objetiva (aumento 20X e abertura numérica 0.3). O número de estruturas

quantificadas por condição está indicado na legenda da figura (Fig. 17). As imagens foram quantificadas com o programa Python com o uso dos pacotes Scikit-image versão 0.18.3 (<https://scikit-image.org/>) e *pyclesperanto-prototype* versão 0.22.0 (<https://clesperanto.github.io/>) para segmentação e medida das estruturas 3D. O script utilizado na quantificação encontra-se anexo (anexo 1).

3.9. Avaliação da expressão de *STK3*⁴⁷ em linhagens de células tumorais, tumores de pacientes e de tecidos saudáveis a partir de dados públicos de sequenciamento de RNA

Esses dados foram adquiridos através da colaboração com o professor Dr. Pedro A F Galante e sua pós-doutoranda Dra. Gabriela D A Guardia. Primeiro, para avaliar se o transcrito da variante *STK3* (*STK3*⁴⁷) foi expresso em amostras de tumores de pacientes, obtivemos dados de sequenciamento de RNA de extremidade pareada (RNA-Seq) de um total de 4.398 pacientes de 11 tipos distintos de tumores no *The Cancer Genome Atlas* - TCGA portal (<https://portal.gdc.cancer.gov/>). Em particular, baixamos diretamente dados de RNA-Seq já mapeados para o genoma humano de referência (versão GRCh38) de: 1.102 Carcinoma invasivo de mama (BRCA), 156 Glioblastoma multiforme (GBM), 500 Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSC), 371 Carcinoma hepatocelular de fígado (LIHC), 534 Adenocarcinoma de pulmão (LUAD), 502 Carcinoma de células escamosas de pulmão (LUSC), 374 Adenocarcinoma seroso de ovário (OV), 177 Adenocarcinoma de pâncreas (PAAD), 499 Adenocarcinoma de próstata (PRAD), 103 Melanoma cutâneo (SKCM) e 80 pacientes com melanoma uveal (UVM).

Em seguida, avaliamos a expressão de *STK3*⁴⁷ em dados de RNA-Seq *paired-end* de 50 linhagens de células de tumores de mama e 35 de células pancreáticas obtidas da *Cancer Cell Line Encyclopedia* - CCLE

(<https://sites.broadinstitute.org/ccle/>). Os dados brutos foram mapeados localmente para o genoma humano de referência (versão GRCh38) usando STAR (versão 2.7.7a) [PMID:23104886]. Por fim, também obtivemos dados de RNA-Seq já mapeados com STAR para a referência humana (versão GRCh38) de 457 amostras de mama e 177 amostras pancreáticas de indivíduos saudáveis disponíveis no repositório *The Genotype-Tissue Expression (GTEx)* (v7; <https://gtexportal.org/home/>).

Para todas as amostras, calculamos os valores *Percent Spliced In (PSI)* das isoformas $STK3^{A7}$ e $STK3^{FL}$, ou seja, a proporção de leituras de extremidades pareadas mapeadas exclusivamente para a junção exon-exon 6-8 de $STK3$ (variante $STK3^{A7}$) e para exon- junções de exon 6-7 e 7-8 (isoforma $STK3^{FL}$) usando samtools v1.13 (<http://www.htslib.org/>) e algoritmos locais. Quando a proporção de *reads* discriminando $STK3^{A7}$ foi maior que zero, considerou-se a amostra expressando $STK3^{A7}$. Gráficos mostrando as proporções de inclusão de $STK3^{A7}$ e $STK3^{FL}$ em linhagens de células tumorais, amostras de tumores de pacientes e tecidos saudáveis foram criados usando o pacote R ggplot2 (v 3.4.0). Para determinar se a presença de $STK3^{A7}$ estava correlacionada com a sobrevivência específica da doença (DSS) de pacientes com câncer, estratificamos os pacientes em dois grupos com base na presença (ou ausência) da expressão de $STK3^{A7}$. As curvas de sobrevivência de Kaplan–Meier foram construídas em R usando os pacotes survival (versão 3.4.0) e survminer (versão 0.4.9), e a significância estatística foi avaliada por testes de log-rank.

4. RESULTADOS

4.1. MOB1 é menos fosforilado em células expressando ectopicamente MST2^{Δ7}

MST2 é ativada por autofosforilação intramolecular catalisada dentro de um dímero (59). Como descrito anteriormente, o domínio SARAH, na porção C-terminal de MST2 é crítico para homodimerização e heterodimerização, bem como, para autofosforilação na treonina 180 da quinase. O exon 7 tem 138 pb de comprimento e sua exclusão gera uma proteoforma de MST2 sem 46 resíduos de aminoácidos, que codificam parte do domínio quinase da proteína (Figura 6E e 7A). Nós ponderamos que tal perda neste segmento poderia comprometer a atividade quinase de MST2^{Δ7}, interferir na autofosforilação de MST2 e possivelmente diminuir a fosforilação de alvos *downstream*.

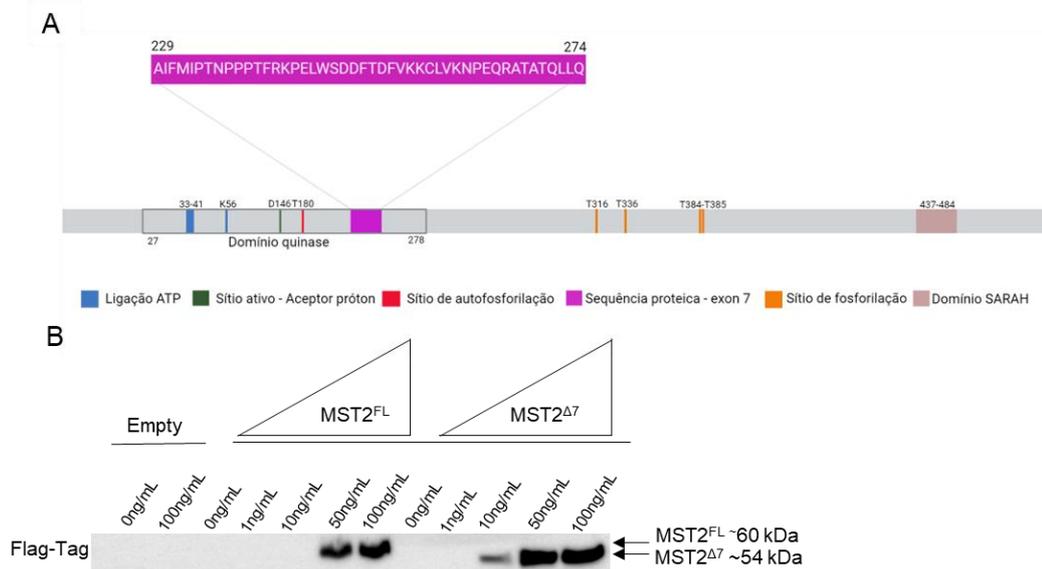


Figura 7- Validação da expressão ectópica de MST2 e MST2^{Δ7} em células não malignas da glândula mamária (MCF10A). (A) Esquema representando regiões importantes da proteína MST2. Em rosa, destaca-se a parte do domínio quinase codificada pelo exon 7 e que está ausente em MST2^{Δ7}. (B) Western blotting para os extratos de células MCF10A-MST2^{FL} ou MCF10A-MST2^{Δ7} tratadas com doses crescentes de doxiciclina (doses indicadas na figura). Após 24 horas de plaqueamento e subsequente indução de doxiciclina por mais 24 horas, os níveis da proteína MST2^{FL} ou MST2^{Δ7} ligada ao Flag-tag foram aumentados.

Dessa forma, criamos uma linhagem onde células MCF10A foram infectadas com um vetor de expressão lentiviral induzível por doxiciclina (pLVX-FFSS-MST2^{FL} ou pLVX-FFSS-MST2^{Δ7}). Ou seja, na presença de doxiciclina (dox), MST2^{FL} ou MST2^{Δ7} fusionados as *tags* Flag-Flag-Strep-Strep são superexpressos. Para verificar a efetividade da infecção, tratamos as células infectadas com doses crescentes de doxiciclina e, por meio de Western blotting, detectamos a *tag* Flag, antes de qualquer outro ensaio (Figura 7B).

Flag não foi detectado no *empty vector* como o esperado e foi detectado quando a concentração de doxiciclina foi maior que 50 ng/mL em MST2^{FL} e a partir de 10 ng/mL em MST2^{Δ7} (Figura 7B). As *tags* Flag-Flag-Strep-Strep fusionadas à MST2^{FL} e MST2^{Δ7} têm aproximadamente 4 kDa de peso molecular. Dessa forma, MST2^{FL} passa a ter uma banda na altura de 60 kDa e MST2^{Δ7} de 54 kDa. Por isso as bandas detectadas com o anticorpo anti-flag apresentaram pesos moleculares diferentes. Mesmo com alta exposição no documentador de quimioluminescência não foi possível detectar ambas isoformas em concentrações menores de dox. Isso pode ter ocorrido devido a superexpressão em altas concentrações de dox, portanto sinal intenso de quimioluminescência, o que leva rapidamente a saturação do sinal podendo ofuscar bandas com baixo sinal.

A proteína MST2 total foi expressa nas construções MST2^{FL} e MST2^{Δ7} seguindo o mesmo padrão da *tag* Flag. A fosforilação de MST1/2 também ocorreu quando MST2^{FL} foi superexpresso em 50 ng/mL e 100 ng/mL. Por outro lado, a exclusão do exon 7 impediu a fosforilação de MST1/2 em todas as concentrações de doxiciclina

avaliadas (Figuras 8A e 8B). Esse dado nos mostra que MST2^{Δ7} pode impedir a autofosforilação de MST2 e por isso falhar na autoativação do dímero.

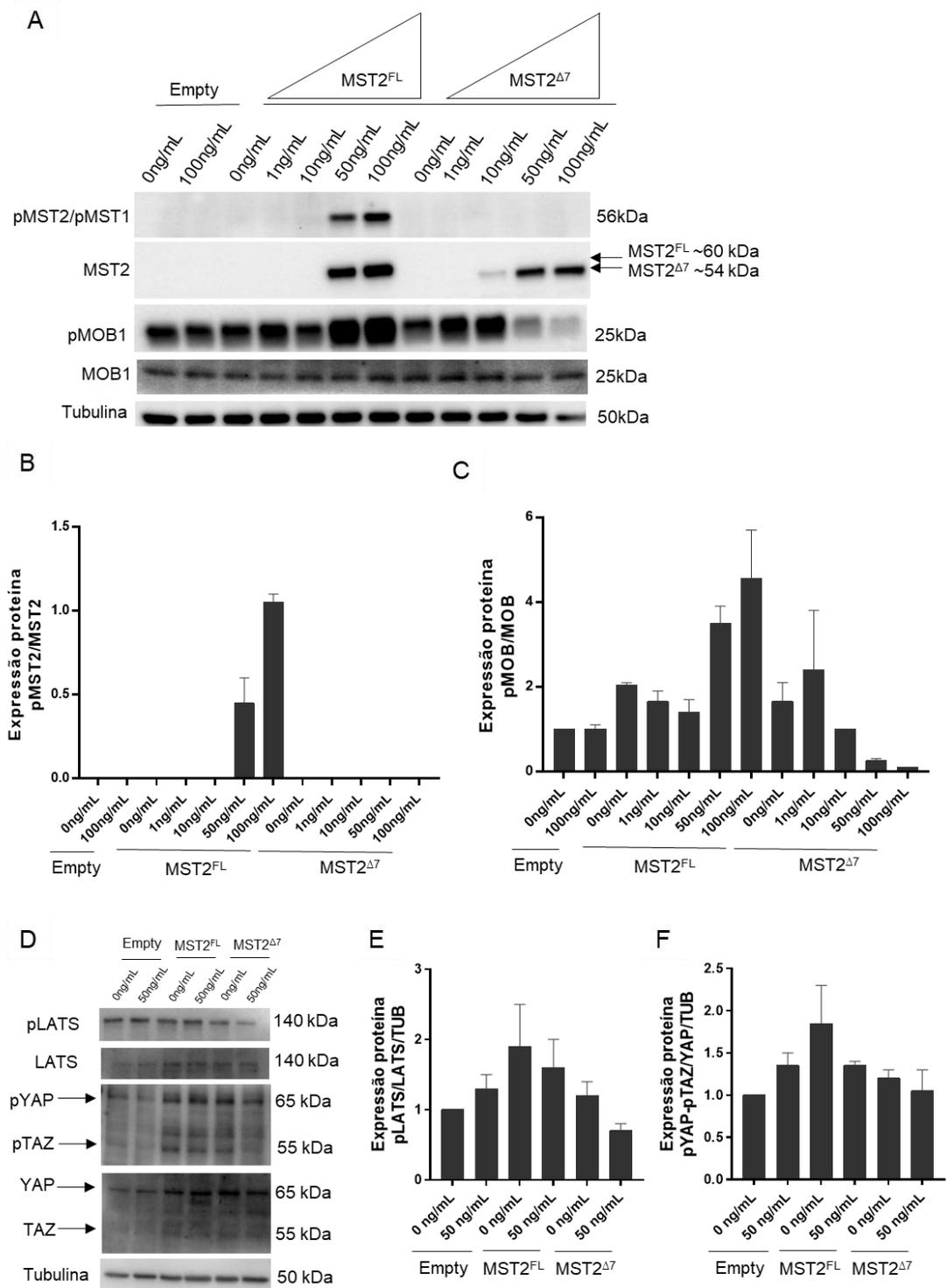


Figura 8 - MOB1 é menos fosforilado em células que superexpressam MST2^{Δ7}. (A) Na indução com doxiciclina, MST2^{FL} ou MST2^{Δ7} têm seus níveis intracelulares aumentados, também observados por Western blotting. Após 24 horas de plaqueamento e subsequente indução por mais 24 horas,

MST2^{Δ7} não é fosforilado e a fosforilação de pMOB1 aumenta em 1 ng/mL e nas concentrações seguintes é reduzida de maneira dose-dependente. (B) Os dados de densitometria de MST2 e (C) MOB1 plotados foram adquiridos pela normalização da proteína fosforilada pela total e pelo *empty 0*, já normalizados pela tubulina. (D) YAP diminui a fosforilação em Serina 127 com superexpressão de MST2^{FL}, bem como, na superexpressão de MST2^{Δ7}. LATS, substrato direto da proteína MST2, é menos fosforilado tanto na superexpressão de MST2^{FL} quanto em MST2^{Δ7}. (E) Densitometria de pYAP/YAP e (F) pLATS/LATS normalizados pela tubulina e pelo *empty 0*. As barras de erro são SEM e os dados apresentados são de pelo menos dois experimentos independentes.

Em seguida, observamos o alvo direto de MST2 para analisar se a atividade quinase do MST2^{Δ7} poderia estar comprometida, uma vez que MST2 aparentemente não foi ativado nessa condição. Nossos resultados mostraram que a expressão da proteína MOB1 total foi uniforme mesmo com níveis crescentes de MST2^{FL} e MST2^{Δ7}. No entanto, a fosforilação de MOB1 mostrou alterações cruciais à medida que a concentração de doxi aumentava (Figuras 8A e 8C). Na superexpressão de MST2^{FL} observamos um declínio na fosforilação de MOB1 endógena a partir de 1 ng/mL, contudo nas concentrações de 50 ng/mL e 100 ng/mL observamos um aumento drástico na fosforilação de MOB1. Quando MST2^{Δ7} foi superexpressa, MOB1 foi fosforilado nas concentrações mais baixas de doxiciclina, de forma similar ao que acontece em MST2^{FL}. A partir de 10 ng/mL de indução de MST2^{Δ7}, a fosforilação de MOB1 foi drasticamente reduzida (Figuras 8A e 8C). Os resultados mostram que MST2^{Δ7} exibe função quinase prejudicada e por isso pode afetar a fosforilação de proteínas *downstream*. A partir desses dados, analisamos a fosforilação de proteínas importantes para a função da via Hippo em duas concentrações de doxiciclina, 0 e 50 ng/mL. A fosforilação de LATS1 não seguiu o padrão esperado. Diferente do que se esperava, quando MST2^{FL} foi superexpresso, LATS1 foi menos fosforilado. Por outro lado, as células MCF10A-MST2^{FL} apresentaram fosforilação de LATS1 basal mais alta que as células transfectadas com o vetor vazio. Com a indução e consequentemente com o aumento dos níveis de MST2^{Δ7} a fosforilação de LATS1 foi ainda menor (Figuras 8D e 8E). YAP seguiu um padrão semelhante à LATS. Quando

MST2^{FL} foi superexpresso, a fosforilação de YAP diminuiu e com superexpressão MST2^{Δ7} diminuiu ainda mais (Figuras 8D e 8F). A fosforilação de LATS e posteriormente de YAP em MST2^{Δ7} se comportaram como esperado, uma vez que MST2 parece não estar ativado nessas condições. Dados da literatura mostram que LATS também pode sofrer influências de outras vias, como de MAPK4 (72) independente de MST2, o que pode justificar o padrão de fosforilação dessa proteína em MST2^{FL}. A conclusão observada para LATS, na superexpressão de MST2^{FL} ou MST2^{Δ7}, pode se estender à YAP uma vez que na cascata de fosforilação da via Hippo, YAP dependa de LATS para sua inativação e retenção citoplasmática.

MOB1 se liga a motivos de ancoragem autofosforilados em MST2 (56) (Figura 4). Nos dados mostrados na Figura 8, observa-se que MST2^{Δ7} não exibiu níveis detectáveis de fosforilação da treonina 180 e a fosforilação de MOB1 na treonina 35 foi diminuída em células com superexpressão de MST2^{Δ7}. Para entender se isso era devido à baixa interação com MOB1, realizamos uma precipitação por afinidade (AP) de MST2^{FL} ou MST2^{Δ7} e avaliamos os níveis relativos de MOB1 por meio de *imunoblotting*. Usando as construções que expressam MST2^{FL} ou MST2^{Δ7} na linhagem celular MCF10A, precipitamos MST2 através da *tag* Strep, que tem afinidade por uma *bead* de Strep Tactin®. Primeiro, analisamos a co-precipitação de MOB1, seguida pela detecção de pMOB1. Os resultados mostraram que MOB1 interage com MST2^{FL}, enquanto a interação de MOB1 com MST2^{Δ7} não foi detectada (Figura 9).

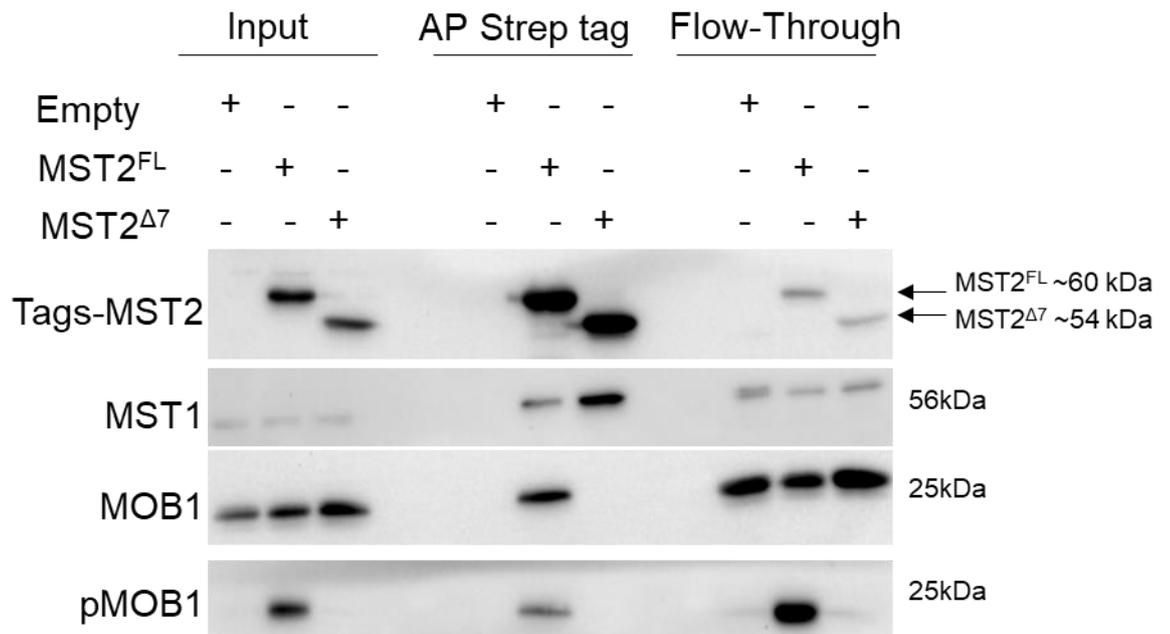


Figura 9 - MOB1 não foi precipitado com MST2^{Δ7}. Ambos, MST2^{FL} e MST2^{Δ7}, foram precipitados com Strep Tactin® e a eficiência da precipitação pode ser confirmada pela detecção de MST2 no *input*, no enriquecimento do precipitado (AP Strep tag) e no *flow-through*. MST2^{FL} com as tags Flag-Flag e Strep-Strep possuem aproximadamente 60 kDa, enquanto MST2^{Δ7} fusionada às tags, devido à ausência do exon 7, possui aproximadamente 54 kDa. MST1 foi precipitado tanto com MST2^{FL} quanto com MST2^{Δ7}, contudo, a interação de MST1 parece ser sido maior com MST2^{Δ7}. MOB1 foi precipitado com MST2^{FL}, mas não com MST2^{Δ7}. O mesmo aconteceu para pMOB1, que diferente das demais proteínas, apresentou níveis aumentados no *flow-through*. Os dados apresentados são de pelo menos dois experimentos independentes.

Confirmando nossos dados anteriores, a fosforilação de MOB1 por MST2^{Δ7} também não foi visível no *input*. No *flow through*, a banda pMOB1 em MST2^{FL} foi mais forte que a do extrato enriquecido. Isso pode ser explicado pela perda da força de interação MST2-pMOB quando MOB já foi fosforilado (56). Curiosamente, o nível de MST1 endógeno ligado a MST2^{Δ7} foi maior do que nas células com superexpressão de MST2^{FL} (Figura 9).

Tomados em conjunto, os dados apresentados aqui apoiados pela literatura, mostram que MST2^{Δ7} pode assumir uma característica de dominante negativo. Conforme mostrado na figura 9, MST2^{Δ7} interagiu fortemente com MST1, porém a interação e a fosforilação de MOB1 foi prejudicada. Nesse contexto, a subunidade não

funcional, MST2^{Δ7}, seria capaz de montar o complexo dimérico, mas incapaz de realizar sua função completa. De acordo com os dados mostrados até agora, sugerimos a hipótese de que MST2^{Δ7} poderia afetar MST2^{FL} ou MST1 na mesma célula bloqueando algum aspecto de sua função. Essa ação transforma a proteína MST2^{Δ7} em um dominante negativo que impacta na função do homo ou heterodímeros formados, podendo levar a um desequilíbrio na homeostase celular devido a perda de sua função.

4.2. Ao contrário de MST2^{FL}, a superexpressão de MST2^{Δ7} não induz morte celular e diminuição da proliferação

Os dados até aqui nos revelaram que a ausência do segmento peptídico codificado pelo exon 7 impacta fortemente a capacidade de MST2 de interagir e fosforilar MOB1, um dos principais substratos de MST2 e proteína crucial para a interação de MST2 com outros alvos. Dessa forma, nos perguntamos se as células reproduziriam o mesmo efeito funcional quando MST2^{FL} ou MST2^{Δ7} eram superexpressos. Desde as primeiras descobertas sobre a via Hippo em mamíferos têm sido relatado o papel de MST1/2 na regulação da morte celular (73,74). Nesse contexto, buscamos avaliar se a superexpressão de MST2^{Δ7} impactaria as taxas de morte celular da mesma forma que MST2^{FL}.

Usando as células MCF10A-MST2^{FL} e MCF10A-MST2^{Δ7}, realizamos um ensaio de *live and dead*, no qual as células são tratadas com uma solução contendo Hoechst, o qual cora as células vivas e mortas e iodeto de propídio que cora somente as células mortas. Diferentes concentrações de doxiciclina após 24 horas de plaqueamento foram usadas e nas 24, 48 ou 72 horas seguintes o perfil de morte celular foi monitorado (Figura 10).

Em 24 horas de superexpressão de ambas isoformas, não observamos nenhuma alteração na morte celular (Figura 10A). Em 48 e 72 horas, a morte celular causada pelo aumento do nível de MST2^{FL} na célula foi significativamente maior do que o efeito causado pelo aumento do nível de MST2^{Δ7} (Figura 10B e 10C). Analisamos também o efeito de morte em células de osteosarcoma (U2OS), U2OS-pLVX-FFSS-MST2^{FL} ou U2OS-pLVX-FFSS-MST2^{Δ7}, geradas sob as mesmas condições que as sublinhagens de MCF10A. Em 72 horas de indução, observamos que a superexpressão de MST2^{FL} também resultou no aumento da morte celular e que a superexpressão de MST2^{Δ7} não teve influência significativa nesse fenótipo (Figura 10D). Além disso, embora a morte provocada pela superexpressão de MST2^{FL} em U2OS tenha sido significativamente maior que a de MST2^{Δ7}, assim como em MCF10A, há uma diferença relevante no padrão de morte das células malignas e não malignas. Quando a indução aumenta de 10 ng/mL para 50 ng/mL a taxa de morte em MCF10A aumenta em aproximadamente 23%. Quando avaliamos essa mesma condição em U2OS, o aumento na taxa de morte fica próximo de 10% (Figuras 10C e 10D).

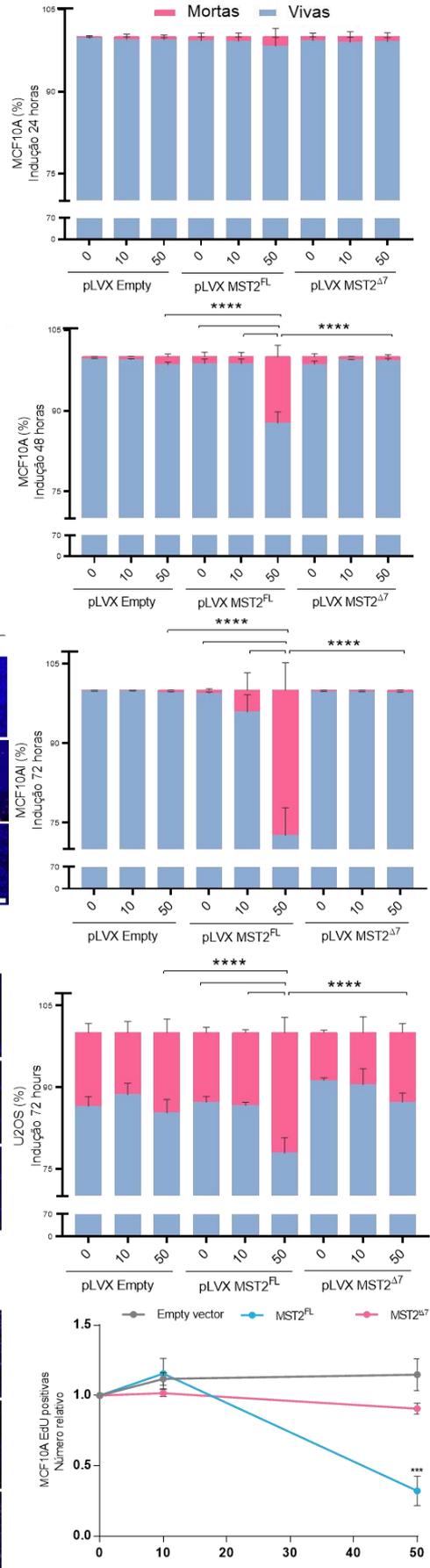
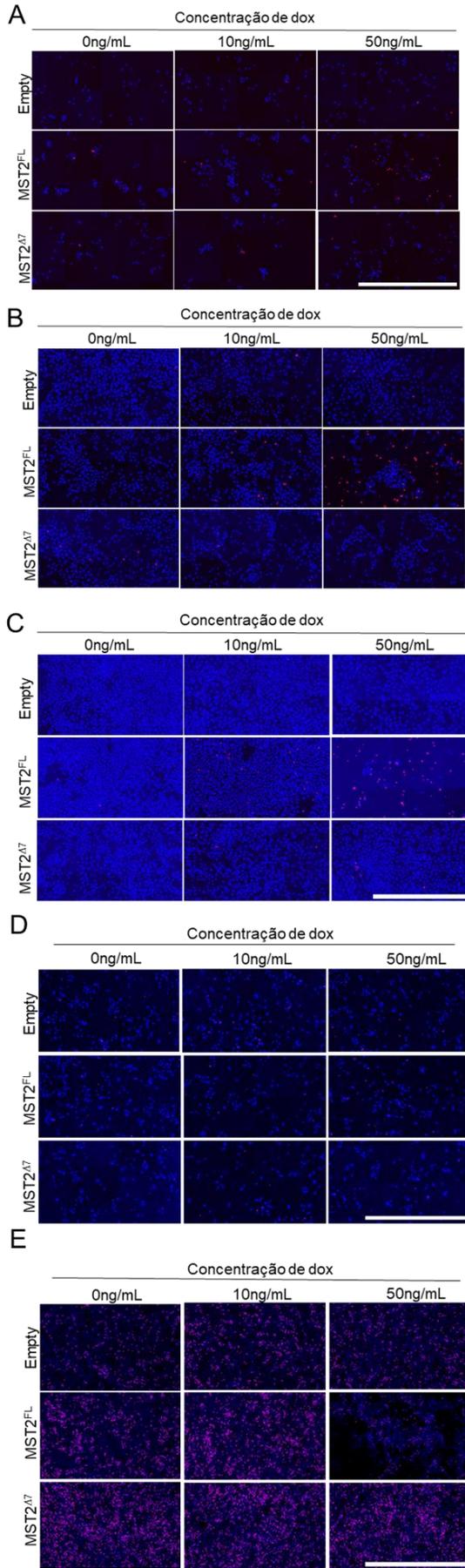


Figura 10 - A exclusão do exon 7 prejudica a capacidade de MST2 induzir morte celular e quiescência. Superexpressão de MST2^{FL} ou MST2^{Δ7} por meio da indução com concentrações crescentes de doxíciclina (10 ng/mL e 50 ng/mL), após (A) 24, (B) 48, (C) 72 horas de indução em células MCF10A e (D) 72 horas de indução em células U2OS. A porcentagem de células mortas em 48 e 72 horas de indução de MST2^{FL} foi maior do que com superexpressão de MST2^{Δ7} em MCF10A e U2OS (72 horas). O aumento da expressão de MST2^{Δ7} não influencia dramaticamente na taxa de morte em nenhuma das linhagens analisadas. (E) O ensaio de EdU nas células MCF10A mostrou que a proliferação celular diminui significativamente quando a MST2^{FL} foi superexpressa (50 ng/mL). Os dados apresentados nesta figura são de triplicatas independentes. Para a estatística, foi realizada ANOVA de 2 vias e $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Tal fato pode indicar que os efeitos indutores de morte em MST2^{FL} sejam muito mais relevantes no início da formação do tumor. Ou seja, a incapacidade de MST2^{Δ7} de induzir morte celular pode ser mais impactante no início da transformação maligna, onde o escape da morte poderá contribuir para as características do câncer, do que com o tumor já estabelecido.

Para avaliar se a superexpressão de MST2^{Δ7} também poderia afetar a proliferação celular, utilizamos o ensaio de EdU, um análogo de nucleosídeo que incorpora no DNA de durante a fase S do ciclo celular e é detectado por *click-chemistry*. Em MST2^{Δ7} a taxa de incorporação de EdU teve uma leve diminuição na maior concentração de dox usada (50 ng/mL) (Figura 10E). Contudo, com a superexpressão de MST2^{FL}, esse fenótipo foi significativamente menor do que na presença da proteína sem o exon 7. Assim, é possível observar que MST2^{Δ7}, em comparação com a proteína completa, não conserva uma função fenotípica relevante no controle da proliferação celular.

Esses dados nos levaram a interpretar que a exclusão do exon 7 da variante de *STK3* canônico resulta em perda da atividade quinase de MST2, o que impacta a função da proteína em regular a morte celular e a quiescência. A expressão de *STK3^{Δ7}* pode ser uma vantagem significativa para células anormais, já que a

resistência à morte e a evasão de sinais que inibem a proliferação são características fundamentais para o surgimento de tumores (1).

4.3. *STK3^{Δ7}* é expresso em amostras de tumores de pacientes e pode ter um potencial clínico

Para confirmar se a isoforma *STK3^{Δ7}* é expressa em amostras de pacientes e é de fato produto de um processamento do tipo exon *skipping*, avaliamos dados de RNA-Seq presentes em bancos de dados do TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) e do GTEx (*The Genotype-Tissue Expression*), bem como, em um banco de dados de linhagens celulares, o CCLE (*Cancer Cell Line Encyclopedia*). Para cada amostra, calculamos a proporção de *reads* de extremidades pareadas mapeadas exclusivamente para a junção exon-exon 6-8 de *STK3* (variante *STK3^{Δ7}*) e para as junções exon-exon 6-7 e 7-8 (isoforma canônica, *STK3^{FL}*) (Figura 11A).

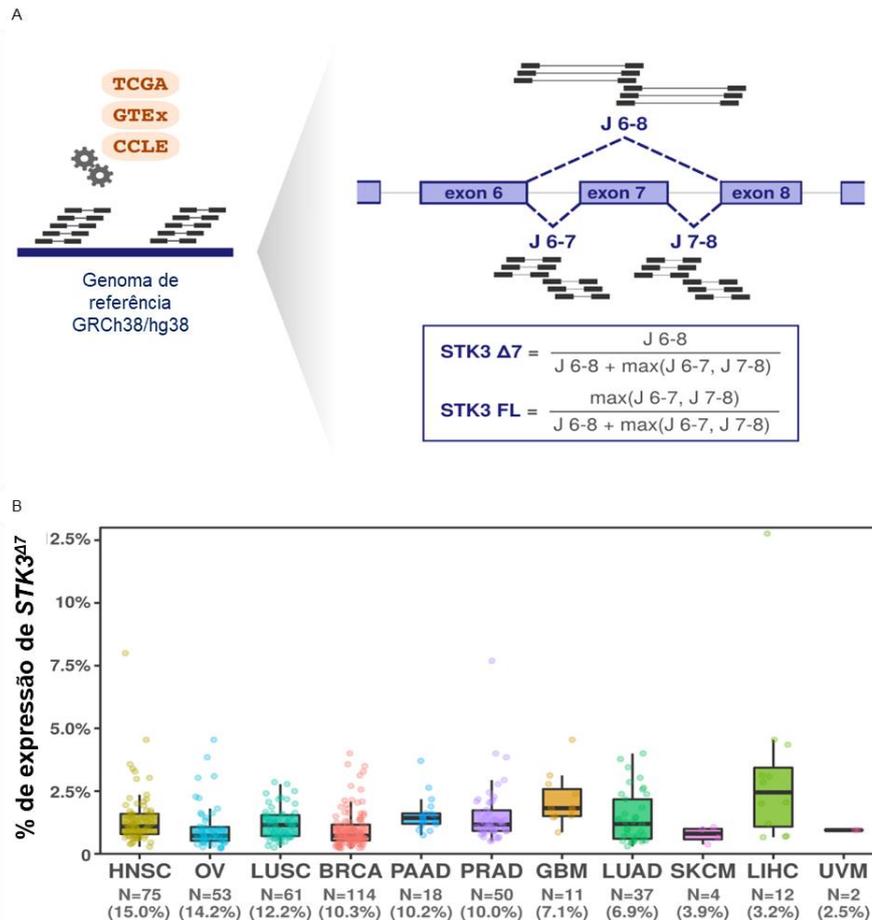


Figura 11 - *STK3^{Δ7}* é expresso em amostras tumorais de pacientes. (A) Representação esquemática do *pipeline* de bioinformática empregado para a análise de amostras de RNAseq dos repositórios TCGA, GTEx e CCLEx. Após o alinhamento dos *reads* ao genoma humano de referência GRCh38/hg38, os *reads* foram alinhados à junção de exon 6-8 (J 6-8) refletindo a expressão de *STK3^{Δ7}* e às junções de exons 6-7 e 7-8 (J6-7 e 7-8) refletindo a expressão de *STK3^{FL}*. (B) Porcentagem de inclusão de *STK3^{Δ7}* em diferentes tipos de câncer. *STK3^{Δ7}* foi mais prevalente no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSC), adenocarcinoma seroso de ovário (OV), carcinoma de células escamosas de pulmão (LUSC), carcinoma invasivo da mama (BRCA), adenocarcinoma de pâncreas (PAAD) e no adenocarcinoma de próstata (PRAD). No glioblastoma multiforme (GBM), carcinoma hepatocelular de fígado (LIHC), adenocarcinoma de pulmão (LUAD), melanoma cutâneo (SKCM) e melanoma uveal (UVM) a nova isoforma de *STK3* foi menos prevalente.

Nós avaliamos 4.398 amostras de pacientes de 11 tipos distintos de câncer. Esta primeira análise revelou que a variante *STK3^{Δ7}* é expressa em pelo menos 10% das amostras de pacientes em 6 tipos distintos de tumores: HNSC (Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço), OV (Adenocarcinoma seroso de ovário), LUSC (Carcinoma de células escamosas de pulmão), BRCA (Carcinoma invasivo de mama), PAAD (Adenocarcinoma de pâncreas) e PRAD (Adenocarcinoma de

próstata). Enquanto nos tumores GBM (Glioblastoma multiforme), LUAD (Adenocarcinoma de pulmão), SKCM (Melanoma cutâneo), LIHC (Carcinoma hepatocelular de fígado) e UVM (Melanoma uveal) a variante *STK3^{Δ7}* foi menos prevalente (Figura 11B).

Para entender se esses pacientes, que expressam *STK3^{Δ7}*, poderiam ter um prognóstico distinto em comparação com aqueles que não expressam essa isoforma, avaliamos a sobrevida específica da doença (DSS) dos pacientes nos 6 tipos de tumor onde *STK3^{Δ7}* era mais prevalente, exceto PRAD, o qual não havia dados de sobrevivência disponíveis (Figura 12). Para PAAD, pacientes que expressam *STK3^{Δ7}* apresentaram uma sobrevida significativamente pior em comparação aos pacientes que não expressam a isoforma (Figura 12A, p-valor de 0,024), enquanto para outros tipos de tumor não houve associação significativa (Figura 12B-E).

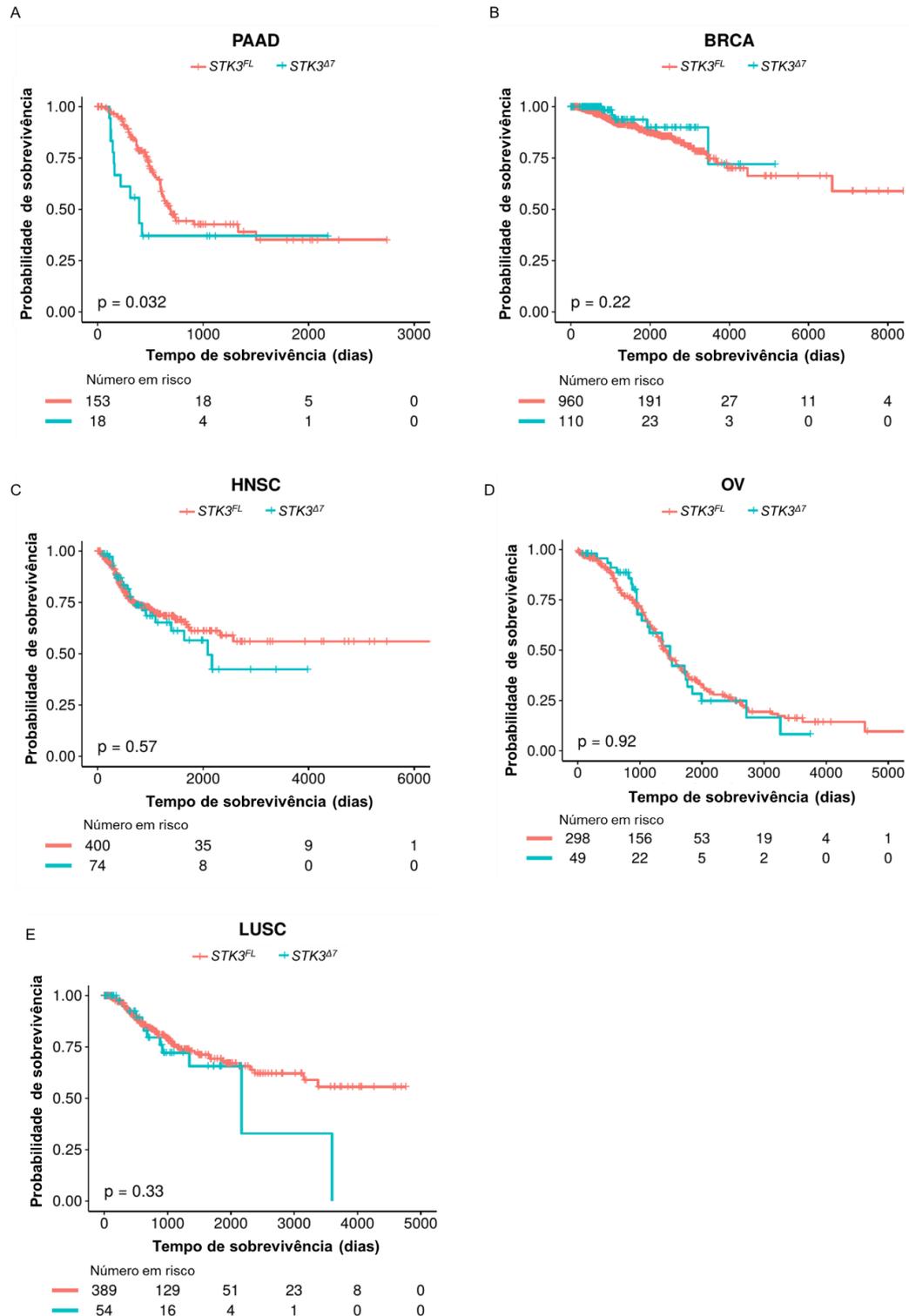


Figura 12 - A sobrevida específica de pacientes com câncer de pâncreas diminuiu significativamente com a expressão de $STK3^{A7}$. (A) A curva de sobrevida específica da doença mostra que pacientes com PAAD que expressam $STK3^{A7}$ têm sobrevida significativamente pior em comparação com pacientes que expressam apenas $STK3^{FL}$. Para (B) BRCA, (C) HNSC, (D) OV e (E) LUSC, não houve diferença significativa na curva de sobrevivência específica de doença quando $STK3^{A7}$ está presente.

A seguir, nós avaliamos se *STK3^{Δ7}* poderia ser diferencialmente expresso de acordo com os estágios da doença. Analisamos a expressão de *STK3^{Δ7}* para todos os tipos tumorais quanto ao estágio da doença. Selecionamos os tipos de tumores que tinham pelo menos 10% dos pacientes com expressão de *STK3^{Δ7}* e que continham informações sobre o estadiamento no TCGA. Grande parte dos cânceres sólidos são classificados, segundo o seu estadiamento, por um sistema que descreve a propagação do câncer no corpo do paciente (<https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/staging>). O sistema tumor, nódulo e metástase (TNM) descreve “T” como tamanho do tumor, “N” como regiões próximas ao tumor atingidas, como os linfonodos, e “M” como a propagação do câncer para outras partes do corpo, ou seja, metástase. Esse sistema foi criado pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) e pela *International Union Against Cancer* (UICC). O câncer de próstata, diferente dos demais, segue outra classificação sendo esta subdividida em T1, T2, T3 e T4. O T1 é assim classificado com base no número de aglomerado de células observadas no microscópio. O T2 se diferencia do T1 em relação aos nódulos, se são ou não palpáveis. Do T2 para o T3 a diferença é se ocorreu ou não invasão microscópica e o T4 é se a doença já sofreu metástase e se é identificada clinicamente. Todas as informações sobre a classificação do estadiamento foram retiradas do site do *National Institute Health* (NIH) (<https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/staging>).

Para o BRCA, não observamos diferenças aparente na porcentagem de inclusão do *STK3^{Δ7}* quanto ao estadiamento (Figura 13A). Para o PAAD, observa-se uma tendência a aumentar a porcentagem exclusão do exon 7 no estágio II, contudo no estágio III, essa tendência cai (Figura 13B). No OV, as análises foram feitas a partir

do estágio II devido à ausência de amostras no estágio I. Neste câncer observamos uma tendência na diminuição da porcentagem de exclusão do exon 7 à medida que o estadiamento aumenta (Figura 13C). No HNSC, semelhante ao que ocorre no PAAD e no OV, o estágio II tende a apresentar expressão mais alta de *STK3^{Δ7}* que nos demais estágios (Figura 13D). No PRAD, diferentemente dos outros cânceres, o estágio T4 apresenta maior porcentagem de exclusão do exon 7 (Figura 13E). Nesses dados, não encontramos uma relação significativa entre o estadiamento e a expressão *STK3^{Δ7}*. As tendências observadas nos estágios iniciais da doença, nos levam à hipótese de que a nova isoforma pode ser relevante para aquisição do fenótipo maligno e pode contribuir para a invasão das células nos tecidos adjacentes, contudo, tem pouco impacto no tumor já estabelecido. Contudo, seria necessário um maior número de amostras de cada estadiamento para aumentar o poder estatístico da análise.

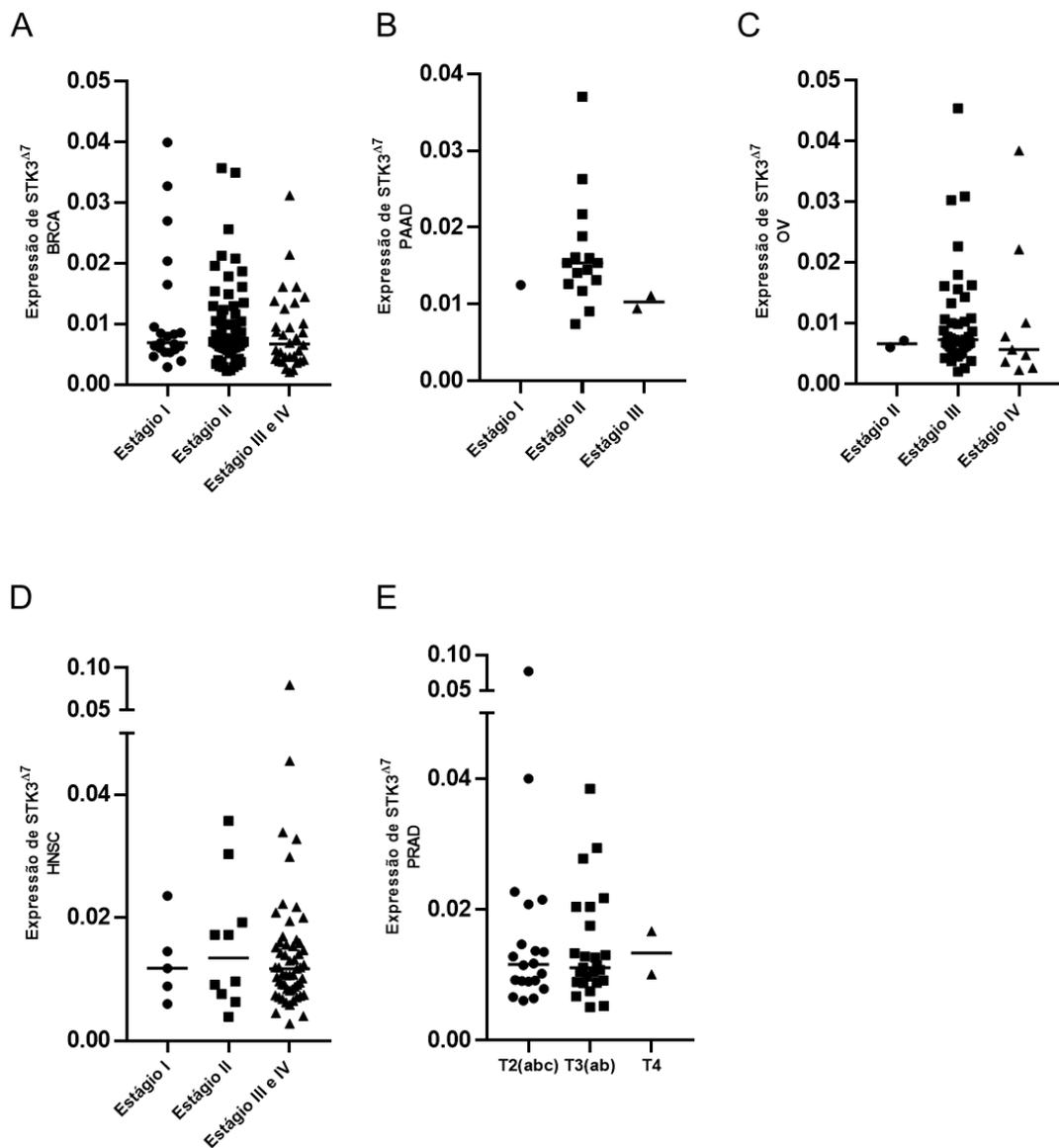


Figura 13 - Análise expressão de $STK3^{\Delta 7}$ nos de acordo com o estadiamento de diferentes tumores. (A) As amostras de câncer de mama (BRCA) foram subdivididas nos estágios I, II e os III e IV; (B) As amostras de câncer de pâncreas (PAAD) foram subdivididas nos estágios I, II e III; (C) As amostras de câncer de ovário (OV) foram subdivididas nos estágios II, III e IV; (D) as amostras do câncer de cabeça e pescoço (HNSC) foram subdivididas nos estágios I, II e os III e IV e os de próstata, seguem uma classificação diferente e nas nossas análises foram subdivididas em T2, T3 e T4.

Com os resultados descritos até o momento, decidimos verificar se a variante $STK3^{\Delta 7}$ era expressa em amostras de tecido saudável da glândula mamária, órgão de origem das células onde a nova isoforma foi inicialmente identificada, e em amostra de pâncreas, cujo tumores que expressaram $STK3^{\Delta 7}$ apresentaram menor sobrevida.

Usando a mesma estratégia de bioinformática, analisamos a expressão de *STK3^{Δ7}* em amostras de indivíduos sem histórico clínico de câncer presentes no repositório do consórcio GTEx, sendo 457 de mama e 177 de pâncreas. De forma curiosa, a expressão de *STK3^{Δ7}* não foi detectada em nenhuma amostra de mama, e observada em uma única amostra pancreática (Figura 14A).

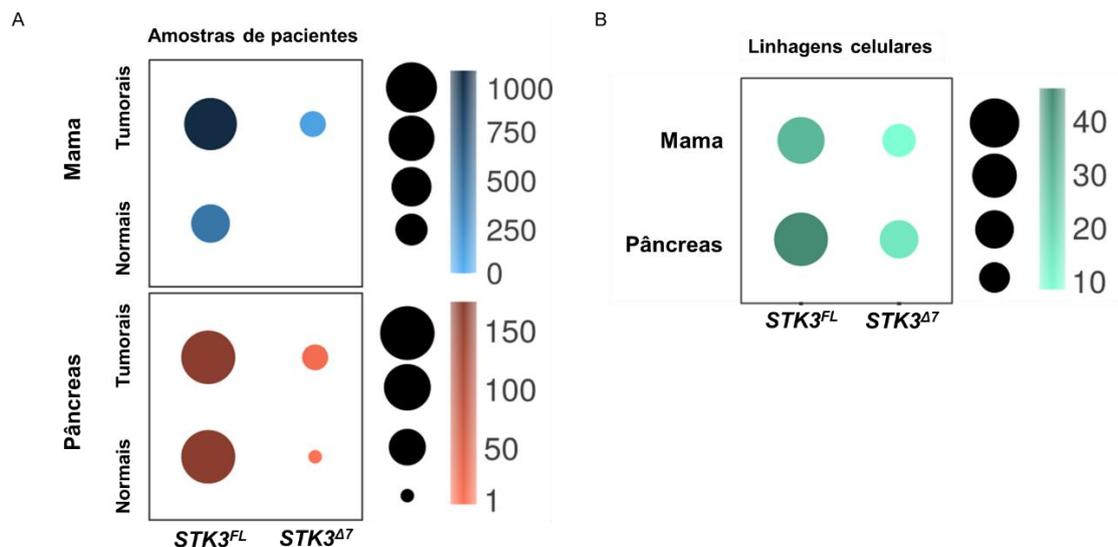


Figura 14 - *STK3^{Δ7}* é preferencialmente expresso em amostras tumorais. (A) Gráficos mostrando a presença de *STK3^{Δ7}* expresso principalmente em amostras de tumor de mama e pâncreas (TCGA), embora ausente em amostras saudáveis do GTEx. (B) Gráficos mostrando que *STK3^{Δ7}* é expresso em várias linhagens celulares de tumores de mama e pâncreas. O tamanho do círculo e a intensidade das cores indicam maior ou menor expressão de *STK3^{FL}* ou *STK3^{Δ7}*, onde tons de azul representa câncer de mama, de marrom câncer de pâncreas e de verde linhagens tumorais de mama e de pâncreas.

Finalmente, para fornecer uma avaliação mais completa da expressão de *STK3^{Δ7}* em modelos de estudo para biologia do câncer, avaliamos a expressão de *STK3^{Δ7}* em várias linhagens de células tumorais e detectamos sua expressão em 40% das linhagens de células da mama (40 linhagens analisadas) e 37% em pâncreas (35 linhagens analisadas) (Figura 14B).

No conjunto, esses resultados sugerem que *STK3^{Δ7}* é expresso preferencialmente em câncer e pode ser um potencial biomarcador diagnóstico e/ou

prognóstico para alguns tipos de tumor. Contudo, investigações adicionais são necessárias para confirmar esta hipótese.

4.4. *STK3^{FL}* é menos expresso em tumores de mama de grau histológico 3

Também buscamos entender quantitativamente como era a expressão de *STK3^{Δ7}* no câncer de mama. Para tanto, analisamos 86 amostras de pacientes disponíveis no Biobanco do Instituto do Câncer de São Paulo Octavio Frias de Oliveira (ICESP). Essas amostras se subdividiam em 43 tumorais de diferentes subtipos e 43 bordas não tumorais adjacentes a esses tumores. As amostras compreendem em 9 luminal A, 9 luminal B, 7 luminal B HER2+, 4 HER2+ e 14 triplo negativo. A classificação clínica do tumor de mama é baseada na expressão dos receptores de estrogênio e progesterona, os quais são denominados positivos para receptores hormonais (luminal A, B e luminal HER2+) (75), na expressão do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano, que são os tumores HER2+ ou ainda tumores que não possuem nenhum dos receptores o qual é conhecido como triplo negativo (75).

A partir de fragmentos de tumor provenientes do procedimento de ressecção cirúrgica, o RNA foi extraído e após obtenção do cDNA, a expressão gênica foi analisada por meio do RT-qPCR. Utilizamos três conjuntos de primers, um para *STK3* total (flanqueando os exons 8-9), um para *STK3* com a presença do exon 7, a qual chamamos *STK3^{FL}*, (flanqueando os exons 7-8) e outro para *STK3^{Δ7}* (junção entre os exons 6-8) (Figura 15A).

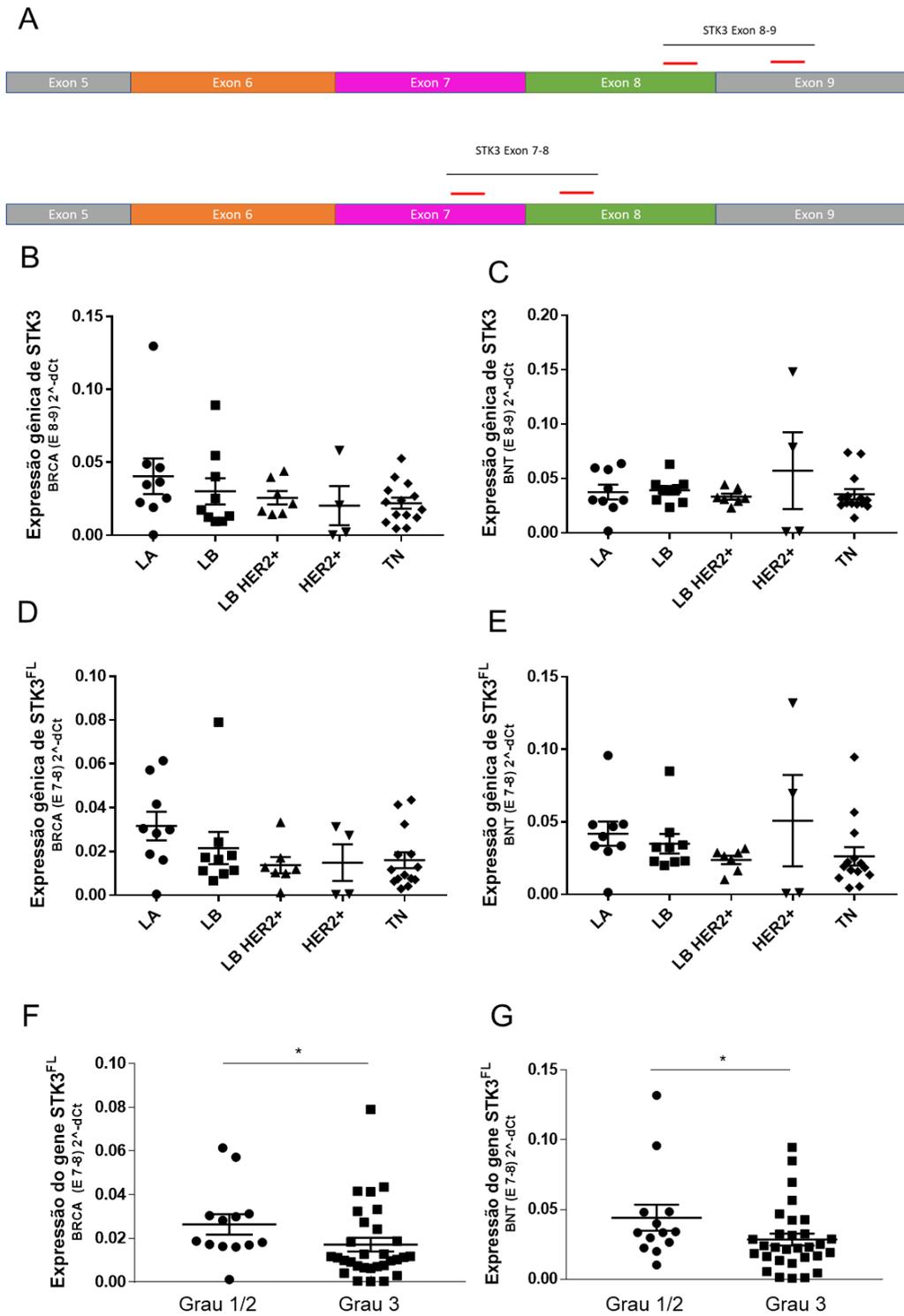


Figura 15 - Expressão do mRNA de *STK3* total e *STK3^{FL}* em amostras da mama de pacientes. (A) Esquema mostrando o primer que flangeia *STK3* total, nos exon 8-9 e *STK3^{FL}* nos exons 7-8. Os resultados significam que a maior expressão *STK3^{FL}* está relacionada a maior retenção do exon 7. (B) Expressão de *STK3* total em amostras tumorais, utilizando os primers que se anelam nos exon 8-9, em diferentes subtipos de câncer de mama: luminal A (LA), luminal B (LB), luminal B com HER2 positivo (LBHER2+), HER2 positivo (HER2+) e triplo negativo (TN). O gráfico mostra que a expressão de *STK3* total diminui com a agressividade do tumor. (C) Expressão de *STK3* total em tecidos adjacentes aos tumores, utilizando os primers flangeando os exons 8-9. (D) Expressão de *STK3^{FL}* em amostras

tumorais mostrando que a retenção do exon 7 em relação a agressividade dos subtipos de tumores da mama. (E) Expressão de *STK3^{FL}* nas bordas não tumorais (BNT) adjacentes aos tumores mostrando a retenção do exon 7 em relação subtipos de câncer de mama. (F) O gráfico mostra que a retenção do exon 7, determinada pelo anelamento dos primers nos exons 7-8, é estatisticamente menor com o aumento do grau histológico do tumor e (G) nas bordas não tumorais o mesmo padrão foi observado. Foi realizado teste de Mann-Whitney e considerado o $p < 0,05$ significativo.

Para nos certificar que os primers estavam amplificando as sequências corretamente, fizemos uma curva baseada em um plasmídeo expressando *STK3^{FL}* ou *STK3^{A7}*. Ao analisar os resultados, percebemos uma limitação metodológica na detecção de *STK3^{A7}*. O primer que deveria amplificar somente o plasmídeo que possuía a junção 6-8, também amplificava o plasmídeo *STK3^{FL}* onde a junção 6-8 estava ausente. Assim, focamos nossas análises na expressão de *STK3* total utilizando o primer que flanqueia os exons 8-9 e na expressão de *STK3^{FL}* utilizando o primer que flanqueia os exons 7-8. Consideramos que menos sinal do primer para *STK3^{FL}* há também menos inclusão do exon 7, e mais sinal, mais retenção.

Sabendo que as taxas de mortalidade estão intrinsecamente relacionadas à agressividade dos tumores (76), analisamos a expressão de *STK3* total em relação à agressividade dos tumores. Observamos que à medida que a agressividade dos subtipos tumorais aumenta (Figura 15B) a expressão de *STK3* total diminui. Também separamos as amostras de bordas não tumorais (BNT) de acordo com o subtipo do tumor adjacente. Observamos que a expressão de *STK3* total tende a se manter uniforme entre os subtipos tumorais, entretanto, no HER2+ a expressão aumenta (Figura 15C). Similar a análise descrita anteriormente, analisamos a retenção do exon 7 (*STK3^{FL}*). Observamos uma tendência a diminuir a retenção do exon 7 em relação à agressividade dos subtipos tanto nos tumores de mama quanto nas bordas adjacentes, exceto para HER2+ e TN (Figuras 15D e 15E). Os tumores de mama ainda podem ser avaliados de acordo com o grau de diferenciação, o qual reflete o

quanto as células tumorais ainda se assemelham às células do tecido normal. O grau 1 representa um tumor diferenciado com características da mama normal. O grau 2 é moderadamente diferenciado. O grau 3 é um tumor com baixa homologia ao tecido epitelial normal, apresenta acentuado pleomorfismo celular e mitoses frequentes (77). Buscamos entender se a retenção do exon 7 variava de acordo com o grau histológico. Para isso, agrupamos os tumores de grau 1 e 2, devido ao baixo número de tumores em ambos os graus, e comparamos a retenção do exon 7 com os tumores de grau 3. Foi observado uma diminuição significativa da retenção do exon 7 em tumores de grau 3 (Figura 15F), bem como, nas bordas não tumorais adjacentes a esses tumores (Figura 15G). Esses resultados sugerem que pode existir uma relação entre a progressão da doença e os baixos níveis do exon 7 quando analisamos a expressão de *STK3* utilizando os primers que flanqueiam o exon 7 e sua relação com o grau do tumor. Entretanto, tal afirmação precisa ser respaldada por um número maior de amostras e primers exclusivos para a junção 6-8.

Com base na relevância que *STK3*^{Δ7} apresentou nas amostras do TCGA, analisamos doze amostras de pâncreas, gentilmente cedidas pelo professor Eduardo Reis do IQ-USP. Das doze, 7 eram tumorais e 5 eram amostras não pareadas de bordas adjacentes aos tumores (BNT). Vale salientar que, a começar pelo cDNA, todos os procedimentos nas amostras de pâncreas foram idênticos às amostras de mama. Inicialmente analisamos a expressão total de *STK3* por meio do primer anelando no exon 8-9 (Figura 16A). Observamos que existe uma tendência a ter menos *STK3* nas amostras tumorais que nas bordas adjacentes à tumores. Quando analisamos a retenção do exon 7, observamos a mesma característica (Figura 16B). Devido ao baixo número de amostras não foi possível observar diferenças significativas, contudo, o fato de haver menor retenção do exon 7 em amostras

tumorais, corrobora com os resultados mostrados anteriormente e reforça a ideia de que a exclusão do exon 7 é característico de tumor.

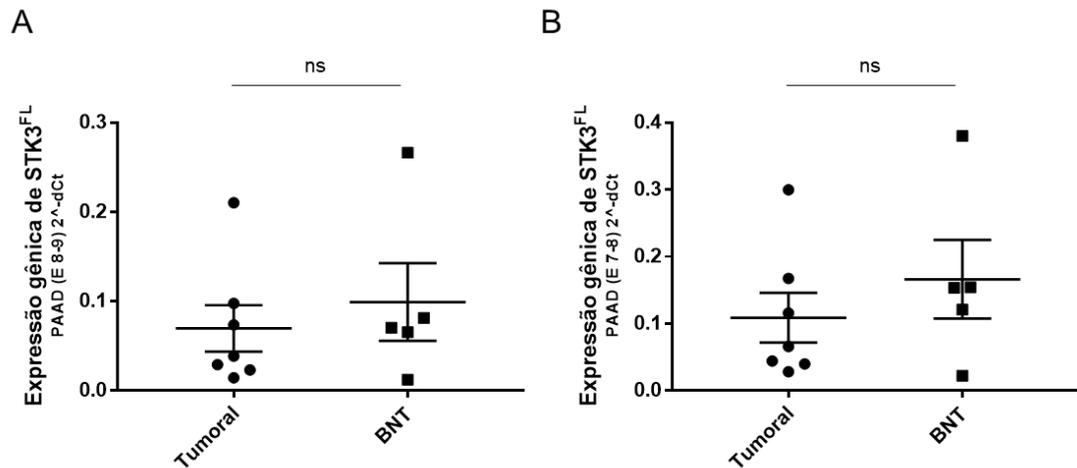


Figura 16 - O exon 7 tem menor retenção em amostras tumorais de pâncreas. (A) Expressão de *STK3* total em amostras de pâncreas tumorais ou em bordas não tumorais adjacentes à tumores (BNT). (B) Retenção do exon 7 em amostras tumorais ou em bordas não tumorais adjacentes à tumores (BNT).

4.5. MST2^{Δ7} parece contribuir para a formação de estruturas maiores

Células MCF10A, com as construções MST2^{FL} ou MST2^{Δ7}, foram plaqueadas em uma matriz extracelular rica em laminina (Matrigel) conforme descrito nos materiais e métodos. Um dia após o plaqueamento as células foram induzidas com 50 ng/mL de doxíciclina. Após 21 dias de cultivo, imagens foram adquiridas no microscópio LEICA DMI8 (Figura 17A) e posteriormente a área das estruturas foram quantificadas usando o um *workflow* computacional na linguagem de programação Python (Figura 17B). A formação de lúmen esperada em 15 dias para esse tipo celular não foi observada nem com 21 dias de cultivo, contudo, procedemos com as análises a fim de quantificar a área das estruturas formadas. Esse experimento foi realizado em duplicatas independentes e no gráfico mostramos o N1 em azul, o N2 em laranja e a média da área das estruturas (azul ou laranja) em círculos grandes.

Independentemente da superexpressão, as estruturas formadas pela célula MST2^{Δ7} foram maiores que o *empty* induzido e MST2^{FL} induzida ou não (Figuras 17A e 17B). As células MCF10A transfectadas com o vetor vazio (*empty*) quando induzidas com doxiciclina teve uma redução na área das estruturas no N1 mostrando que a droga de indução apresentou um efeito na redução da área da estrutura (Figura 17B). Para MST2^{FL} a indução não provoca nenhum efeito no N1, mas no N2 é possível observar uma diminuição na área das estruturas (Figura 17B). Nesse ensaio de indução, mesmo quando a doxiciclina não está presente, há um pequeno escape na expressão da proteína, contudo, como vimos até agora, quando a proteína é induzida o efeito observado é claramente maior. No ensaio 3D, as células MST2^{Δ7} não obedecem aos sinais antiproliferativos da matriz mesmo em concentrações baixas (Figuras 17A e 17B). Este dado associado à capacidade anti-morte, mostrado no ensaio *live and dead*, fortalece a hipótese de que MST2^{Δ7} pode contribuir para a capacitação das células incipientes por meio da evasão dos supressores de crescimento e resistência à morte.

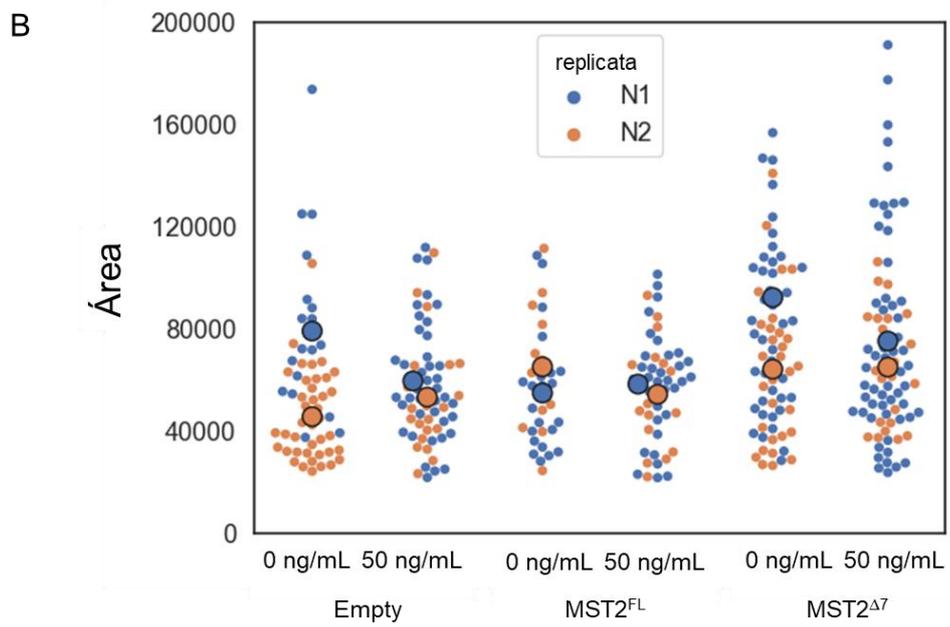
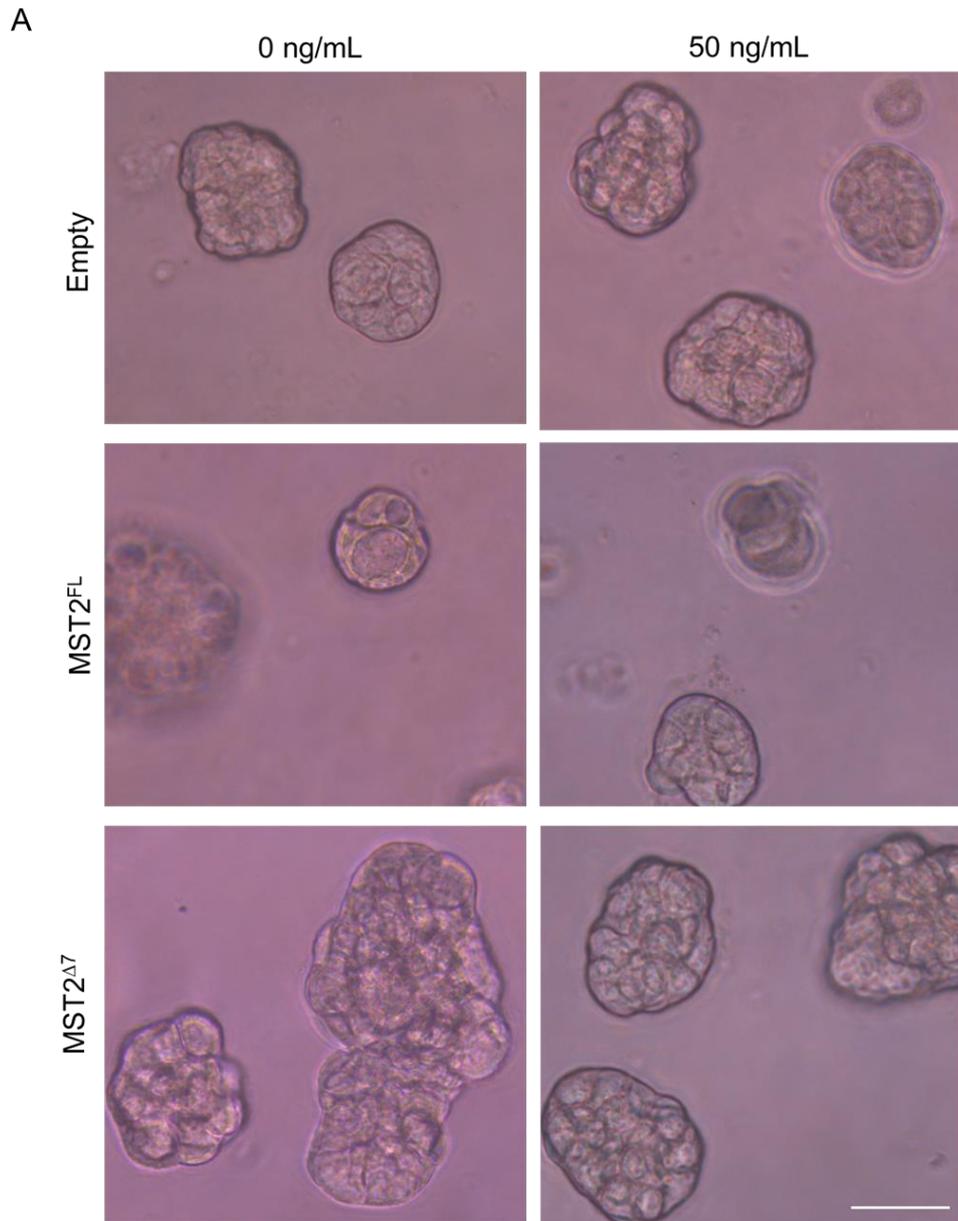


Figura 17 - A superexpressão de deMST2^{Δ7} induz a formação de estruturas 3D maiores. (A) Células MCF10A expressando ou não as construções MST2^{FL} e MST2^{Δ7} em matriz extracelular rica em laminina (Matrigel). Mesmo sem indução com doxiciclina MST2^{Δ7} apresenta maior área. (B) Quantificação da área das estruturas em cada condição (Número de estruturas analisadas: *Empty* 0 ng/mL= 60 e 50 ng/mL= 62; MST2^{FL} 0 ng/mL = 34 e 50 ng/mL = 51; MST2^{Δ7} 0 ng/mL = 75 e 50 ng/mL = 80).

4.6. Hipótese do papel de MST2^{Δ7} na progressão maligna

Tomados em conjunto, os dados aqui apresentados e os dados da literatura sugerem que o MST2^{FL} é uma proteína importante no direcionamento à morte celular. No entanto, se a parte do domínio quinase, codificada pelo exon 7, estiver ausente, esse mecanismo fica comprometido e a proteína perde sua função quinase, e regulação da morte e a diminuição na proliferação celular. Ademais, o ensaio 3D mostrou que apenas com o vazamento do sistema de indução, as células que expressam MST2^{Δ7} apresentam resistência os sinais inibitórios da matriz extracelular e formam estruturas desorganizadas e com área superior à MST2^{FL}.

Dessa forma, acreditamos que MST2^{Δ7} seja relevante principalmente no início da aquisição das características propulsoras da transformação maligna. Neste processo, o desbalanço entre o direcionamento para a morte ou sobrevivência podem permitir a proliferação de células defeituosas bem como a progressão tumoral (Figura 18).

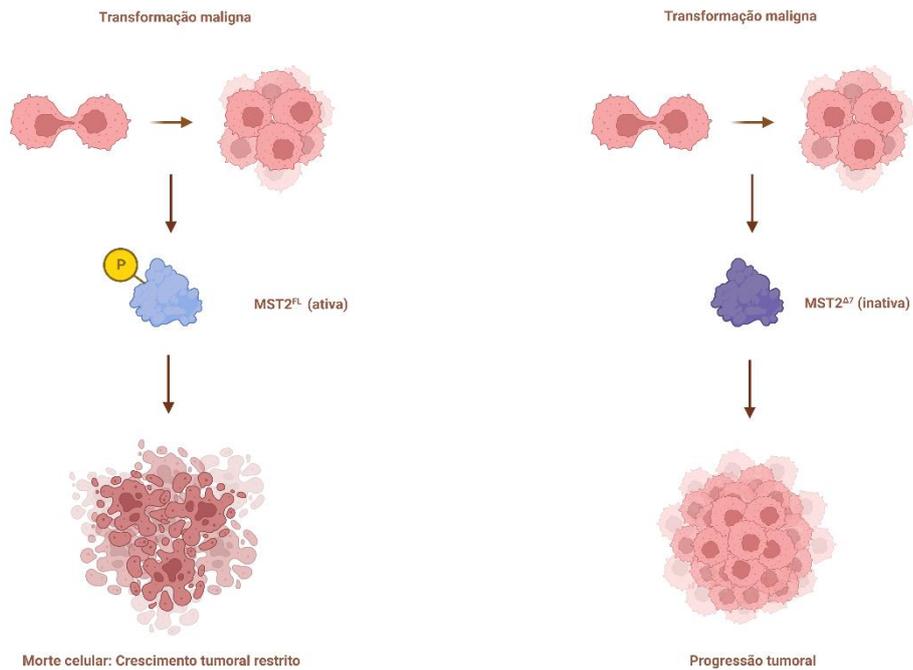


Figura 18 - Hipótese sobre o papel de MST2^{Δ7} na transformação maligna. No processo de transformação maligna, células anormais são dirigidas à morte e MST2^{FL} é uma proteína importante que contribui para esse processo. Quando a parte do domínio quinase codificada pelo exon 7 está ausente, a proteína é inativada impedindo diversas funções. Os dados aqui apresentados mostram que a proteína MST2^{Δ7} gerada não é capaz de induzir a morte celular, bem como, não obedece aos sinais inibitórios da matriz extracelular podendo contribuir para a progressão maligna das células.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho descrevemos uma nova isoforma da proteína MST2 originada de um *splicing* alternativo do gene *STK3*, onde todo o exon 7 é perdido. *STK3^{Δ7}* é encontrado em tumores e a sua presença correlaciona com menor sobrevida de pacientes com câncer de pâncreas. A proteína MST2^{Δ7} tem função quinase reduzida, insensibilidade à morte e resistência aos sinais de controle de crescimento.

As proteínas MST1/2 canônicas sofrem ativação em seu respectivo loop de ativação dependente de autofosforilação. Esse mecanismo não requer quinases *upstream*, contudo a homo ou heterodimerização é um ponto crítico para autofosforilação na treonina 180 de MST2 (55). No ensaio de precipitação por afinidade, MST2^{Δ7} foi capaz de se ligar à MST1 em níveis mais altos que a versão completa de MST2. Entretanto, embora o domínio SARAH em MST2^{Δ7} esteja intacto, permitindo que a homo ou heterodimerização aconteça, o papel quinase de MST2 depende também da função de outros resíduos de aminoácidos. Ni e colaboradores (2013) (55) observaram que a mutação da fenilalanina 231 para uma alanina inibe severamente a autofosforilação de MST2 na treonina 180, enquanto a fosforilação de MOB1 também era defeituosa. O exon 7 contém 138 pb, que codificam resíduos de aminoácidos no domínio quinase, abrangendo resíduos desde a alanina 229 até a lisina 274. Sendo assim, a ausência de fosforilação de MST2 na treonina 180, bem como, a diminuição de pMOB1, quando MST2^{Δ7} foi expresso, pode ser devido à forte influência da fenilalanina 231 excluída em MST2^{Δ7}. A estrutura planar do anel benzênico da fenilalanina, em conjunto com sua natureza altamente hidrofóbica contribuem para a estrutura tridimensional, estabilidade e funcionamento da proteína (78), assim, com a ausência desse resíduo a estrutura tridimensional do domínio quinase pode ser perdida prejudicando sua função. Além disso, o dados da diminuição

da fosforilação em MOB1, a forte precipitação de MST1 em conjunto MST2^{Δ7} somados aos dados da literatura, nos levam a sugerir que MST2^{Δ7} continua sendo capaz de formar dímero, porém perde sua capacidade de autofosforilação e conseqüentemente sua atividade quinase, o que nos leva a sugerir que MST2^{Δ7} possa atuar como dominante negativo (79). Efeitos de dominantes negativos podem contribuir para o surgimento de doenças graves. Na síndrome de Hiperimmunoglobulina E (HIES), por exemplo, as proteínas STAT3 mutantes formam um complexo com STAT3 selvagem, prejudicando sua ligação ao DNA e ativando genes como os da resposta inflamatória no fígado (80).

A expressão de MST2^{FL} aumentou a fosforilação de YAP e LATS1/2 expressos em células HEK293 (55). No entanto, não observamos o mesmo efeito. Entretanto, nas células expressando MST2^{Δ7} LATS e YAP foram menos fosforilados. Ni e colaboradores (2015) (56) sugerem que a presença de fosfatases em células epiteliais humanas pode influenciar os padrões de fosforilação em relação a outras células, por exemplo bacterianas. Além disso, as MAP4Ks também podem fosforilar diretamente LATS1/2 em seus motivos hidrofóbicos resultando em sua ativação e, conseqüentemente, na fosforilação de YAP independente de MST2 (72). Outro fato que pode justificar a baixa influência da supreeexpressão de MST2^{FL} na fosforilação de LATS é que essa proteína também pode sofrer influência da rigidez da matriz em células MCF10A culminando na fosforilação de YAP e na inibição da proliferação celular (62,81).

Desde o início dos estudos das quinases centrais da via Hippo até dados recentes, a participação das MST1 e MST2 na morte celular tem sido destacada (73,82). Mostramos aqui que MST2^{Δ7} perde a função de induzir morte celular,

fenômeno que é observado com a superexpressão de MST2^{FL}. Matsumoto e colegas (2014) (83) demonstraram que *Knockout* de MST2, mas não MST1, diminuiu significativamente a morte de células fotorreceptoras após descolamento da retina e diminuiu a ativação de caspase-3. Neste trabalho, eles avaliaram o papel do MST1/2 na neurodegeneração, já que a morte das células fotorreceptoras é a causa final da perda de visão no descolamento da retina. Usando um modelo animal de descolamento de retina, eles viram através do ensaio TUNEL que a densidade de células TUNEL-positivas para *Knockout* de MST2 era menor do que no tipo selvagem, sugerindo que o bloqueio de MST2 pode suprimir a morte de células fotorreceptoras (83). MST1/2 podem atuar na morte celular por meio de diferentes mecanismos que independem da via Hippo. Cheung e colaboradores (2003) (84) mostraram que a versão completa de MST1 fosforilou a histona H2B na serina 14. Essa fosforilação é catalisada pelo fragmento amino-terminal de MST1, oriundo da clivagem pela caspase-3, que se transloca para o núcleo. Contudo, quando houve uma mutação na lisina 59 do domínio quinase a fosforilação não ocorreu (84). Mais tarde foi visto que MST1 clivado por caspase é capaz de induzir apoptose por meio da via JNK(85). No presente estudo não aprofundamos no tipo de morte induzida por MST2^{FL}. Contudo, independentemente do mecanismo de morte acionada, a perda desta função em MST2^{Δ7} pode dar vantagens às células anormais, contribuindo para o surgimento do câncer, uma vez que a resistência à morte celular configura um desequilíbrio na homeostase celular (1,86). Fizemos o ensaio de morte em duas linhagens diferentes: linhagem de células não malignas da glândula mamária humana e a uma linhagem de células de osteosarcoma. Independente da linhagem, a o padrão na taxa morte celular em resposta a superexpressão de MST2^{FL} e MST2^{Δ7} foi semelhante. Contudo, observamos que nas células de osteosarcoma, a resposta da superexpressão de

MST2^{FL} na morte é menor que em MCF10A. Tal fato pode ocorrer devido ao desbalanço epigenético e genético existente desde a transformação maligna, assim estas células não são tão sensíveis ao estímulo de morte quanto às células não malignas ou em processo de tumorigênese.

Contraditório à linha conservadora de que a morte de células potencialmente perigosas é preventiva para o desenvolvimento tumoral, aparece a visão da morte celular como um meio de seleção de clones potencialmente agressivos. Labi e Erlacher (2015) (87) levantaram a hipótese de que a apoptose pode ser um dos principais impulsionadores da expansão clonal em ambiente de pressão seletiva contínua. Neste contexto, a apoptose poderia ser um condutor na evolução tumoral e uma marca da doença agressiva, sendo potencialmente relevante na transformação maligna (87). Por outro lado, a visão tradicional do desenvolvimento tumoral, ainda é verdadeira em diversos aspectos. Além da desregulação do apoptose, a proliferação sustentada é outra vantagem que potencializa a transformação maligna de células incipientes (3). Nossos dados mostraram que, a superexpressão de MST2^{FL} além de aumentar a morte celular ainda diminui a proliferação em células MCF10A. Dessa forma, tomados em conjunto, nossos dados indicam que a perda da função de MST2^{Δ7}, tanto na morte celular quanto na diminuição da proliferação, pode garantir maior vantagem à clones de células anormais resistentes à morte.

Vários estudos sobre câncer têm demonstrado que o *splicing* alternativo tem papéis importantes no desenvolvimento e prognóstico do câncer (88–90) e o *exon skipping* é o evento mais predominante, representando 27,1% deles (91). Dados da literatura mostraram que o *skipping* do exon 14 faz com que o gene MET seja mais ativado e mais sensível a inibidores específicos (92,93). Para confirmar se *STK3*^{Δ7}

estava presente em pacientes e se poderia apresentar algum potencial clínico, analisamos amostras de RNAseq depositadas em TCGA e GTEX. Encontramos *STK3^{Δ7}* em muitos tipos de câncer. Além disso, nossas análises mostraram que a sobrevida específica de pacientes com câncer pancreático foi reduzida quando houve a exclusão do exon 7. Para os demais cânceres, embora não significativo, é possível ver uma tendência a diminuir a sobrevida específica da doença com a expressão *STK3^{Δ7}*. Para o BRCA, não vimos a mesma relação, contudo a literatura mostra que é necessário um longo período de acompanhamento para analisar a curva de sobrevivência específica de doença em pacientes BRCA, assim, a ausência de associação significativa entre sobrevida e expressão de *STK3^{Δ7}* em nossos dados, pode estar inteiramente relacionada a este fato (94).

Embora ainda necessite estudos adicionais que confirmem a importância de *MST2^{Δ7}* para o câncer pâncreas, esse resultado pode lançar luz sobre alguns dos principais problemas deste tumor que é o diagnóstico precoce e terapias específicas (95). Uma vez confirmada a real importância desta isoforma no pâncreas, novas formas de diagnóstico precoce e terapia podem surgir baseada na expressão de *STK3^{Δ7}*, como por exemplo a detecção de *MST2^{Δ7}* por meio de anticorpos específicos e o uso de oligonucleotídeos *antisense*, similares aos que já são usados em diversas doenças para incluir exons (26,30,32,96).

O diagnóstico precoce é uma das principais vias de sucesso para a cura da maioria das doenças. Nesse contexto, o estadiamento do câncer é a “pedra angular” do atendimento do paciente (97). Uma revisão de pesquisadores da universidade de Toronto (2016) (98) apontou seis objetivos do estadiamento tumoral: planejamento de tratamento, indicação de prognóstico, avaliação dos resultados do tratamento, troca

de informações entre centros de tratamento, investigação de malignidades humanas e controle do câncer. Sabendo desta importância, decidimos analisar os tumores do TCGA que tinham expressão de $STK3^{\Delta 7}$, em relação ao estadiamento. Não encontramos nenhuma relação significativa entre a porcentagem de presença de $STK3^{\Delta 7}$ e o estadiamento do tumor. Contudo, observamos uma tendência a ter mais da isoforma nos estágios II e III na maioria dos tumores. Esse fato, reafirma nossa ideia de que $STK3^{\Delta 7}$ pode apresentar maior impacto nos estágios iniciais dos tumores. Contudo, uma vez que o tumor já está estabelecido, como mostrado nos dados de pâncreas, $STK3^{\Delta 7}$ pode contribuir para um pior prognóstico da doença.

Como já mencionamos, o *splicing* alternativo tem um papel importante na diversidade de proteínas. Somado a este fato, as mutações no DNA por si só, não são suficientes para explicar o comportamento tumoral, necessitando assim de outros mecanismos que contribuem para o melhor diagnóstico e terapia do câncer. Nesse contexto, já foi demonstrado que o *splicing* pode afetar os genes por meio de modificações pós-traducionais, remoção ou alteração dos domínios das proteínas e no truncamento de proteínas impactando diretamente no comportamento tumoral (91). A partir deste conhecimento, analisamos amostras de pacientes presentes no GTEx afim de entender a inclusão de $STK3^{\Delta 7}$ em tecidos normais. Surpreendentemente, observamos que a nova isoforma é uma característica preferencialmente de câncer nos dois tecidos analisados, mama e pâncreas. Essa especificidade pode fornecer caminhos relevantes para o diagnóstico precoce e para a terapia do câncer.

Após saber que $STK3^{\Delta 7}$ é uma isoforma característica de câncer, analisamos se ela era diferencialmente expressa nos subtipos tumorais da mama, uma vez que cada um dos subtipos possui características diferentes que impactam na sua

agressividade. O subtipo luminal A possui crescimento lento e geralmente tem boa resposta às terapias. Eles são caracterizados pela baixa expressão de Ki-67 (marcador de proliferação celular), ausência da proteína HER2 e presença do receptor de estrógeno e progesterona (75). Por outro lado, o subtipo luminal B, tem alta expressão de Ki-67 (maior que 20%) e menor expressão dos receptores de estrogênio que os luminais A o que pode explicar o seu crescimento rápido bem como pior prognóstico em relação ao luminal A (75,99). O Subtipo HER2+ representa de 10-15% dos cânceres de mama (75) é agressivo e possui crescimento rápido. Ele pode ser HER2+ luminal, o qual além do receptor HER2 ainda expressam receptores de estrógeno e progesterona e possui Ki-67 de 15-30% ou HER2 enriquecido, o qual possui pior prognóstico e tem Ki-67 maior que 30% (75). O triplo negativo não possui nenhum dos receptores hormonais, é uma neoplasia altamente proliferativa, caracterizada pela sua agressividade, detecção tardia e recidiva precoce (75).

A expressão do mRNA do gene *STK3* em câncer de mama tende a diminuir de acordo com a agressividade dos subtipos. Essa relação não foi observada em bordas não tumorais. Ao avaliar a retenção do exon 7, percebemos que para os tecidos com câncer, também se observa uma tendência a diminuir a expressão em relação a agressividade dos subtipos. Para as bordas não tumorais, também existe uma tendência na diminuição da retenção do exon 7 de acordo com a agressividade dos tumores. Esse dado é interessante pois as bordas não tumorais adjacentes aos tumores, não podem ser consideradas normais. Dessa forma, a menor inclusão do exon 7 pode impactar na recidiva de tumores de mama a longo prazo, por meio da capacitação das células incipientes na resistência à morte, por exemplo. Diferentemente da nossa ideia que evidencia a participação de *STK3^{Δ7}* nos estágios iniciais do tumor, amostras com maior grau histológico apresentaram diminuição

significativa na inclusão do exon 7. Contudo, outros experimentos onde os primers sejam específicos para a junção 6-8 são necessários para comprovar essa relação.

De todo modo, o estadiamento tumoral é uma variável prognóstica importante para o planejamento do tratamento bem como para traçar o potencial de cura do paciente. Nos estádios iniciais do câncer de mama a sobrevida da paciente em 10 anos é de mais de 90%. Oposto a isso, no câncer metastático a sobrevida relativa de 5 anos é de apenas 25% (98). Assim, quanto mais cedo o paciente for diagnosticado melhores chances ele tem de vida.

Analizamos também amostras de pâncreas e foi observado uma tendência à diminuição na expressão de *STK3* total e na retenção do exon 7, tanto nas amostras tumorais quanto nas bordas não tumorais. Como dito anteriormente o ensaio de qPCR em amostras de pacientes apresentou falhas metodológicas e acreditamos que a melhor forma de quantificar essa isoforma seria por meio de uma sonda Taqman, específica para o exon 7. Assim, para futuros experimentos com essas amostras usaremos uma metodologia mais eficiente para responder nossas perguntas.

Tomados em conjunto, a descoberta por marcadores específicos torna-se cada vez mais necessários. Embora necessite de mais resultados que suportem o papel de *MST2^{Δ7}* como um marcador específico câncer e um alvo terapêutico, acreditamos que a nova isoforma tenha grande potencial para tal função.

6. CONCLUSÃO

- 1- Ao estudar linhagens não malignas e malignas de células epiteliais da mama, identificamos uma nova variante produto de *splicing* alternativo.
- 2- A isoforma não anotada do gene *STK3* humano devido ao salto do exon 7 gera uma proteína de menor tamanho a qual chamamos MST2^{Δ7}.
- 3- MST2^{Δ7} não foi capaz de fosforilar seu alvo, MOB1. Além disso, LATS e YAP, embora possam ser fosforilados por outras vias, também tiveram sua fosforilação diminuída com superexpressão de MST2^{Δ7}.
- 4- MOB1 também não precipitou com MST2^{Δ7}, o que pode explicar a importância do exon 7 para que a interação MST2-MOB aconteça.
- 5- MST2^{Δ7} precipitou com MST1 mostrando que mesmo sem o exon 7 MST2 pode interagir com proteínas MST. Essa característica pode dar à MST2^{Δ7} um efeito de dominante negativo, tem capacidade para formar dímeros, mas é incapaz de desempenhar sua função.
- 6- A exclusão do exon 7 leva a perda da capacidade de MST2 de induzir morte celular quando superexpresso.
- 7- A superexpressão de MST2^{FL} diminuiu significativamente a proliferação celular, contudo, a superexpressão de MST2^{Δ7} não foi capaz de provocar esse mesmo efeito.
- 8- *STK3*^{Δ7} está presente em diversos tipos tumorais e é preferencialmente expresso em amostras tumorais de mama e de pâncreas em comparação com os mesmos órgãos sem a doença.
- 9- A presença de *STK3*^{Δ7} correlacionou com menor sobrevida de pacientes com câncer pancreático indicando o potencial terapêutico desta isoforma

- 10- A superexpressão de MST2^{Δ7} em culturas 3D induz a formação de esferoides maiores, e indica que a nova isoforma pode impactar arquitetura dos ácinos da glândula mamária.
- 11-Devido a expressão quase que exclusiva em tumores de pâncreas e mama, atividade bioquímica e celular perturbada, STK3^{Δ7} pode ser um alvo interessante para o diagnóstico precoce do câncer e para terapias específicas alvejando o processo de *splicing* alternativo que gera a isoforma.

7. REFERÊNCIAS

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Vol. 144, Cell. 2011. p. 646–74.
2. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of pre. Vol. 100, Cell. 2000.
3. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Vol. 12, Cancer Discovery. American Association for Cancer Research Inc.; 2022. p. 31–46.
4. Williams N, Lee J, Mitchell E, Moore L, Baxter EJ, Hewinson J, et al. Life histories of myeloproliferative neoplasms inferred from phylogenies. Nature. 2022 Feb 3;602(7895):162–8.
5. Shlyakhtina Y, Moran KL, Portal MM. Genetic and non-genetic mechanisms underlying cancer evolution. Vol. 13, Cancers. MDPI AG; 2021. p. 1–42.
6. Wu S, Zhu W, Thompson P, Hannun YA. Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. Vol. 9, Nature Communications. Nature Publishing Group; 2018.
7. Bonnal SC, López-Oreja I, Valcárcel J. Roles and mechanisms of alternative splicing in cancer — implications for care. Vol. 17, Nature Reviews Clinical Oncology. Nature Research; 2020. p. 457–74.
8. Anna A, Monika G. Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. Vol. 59, Journal of Applied Genetics. Springer Verlag; 2018. p. 253–68.

9. Wahl MC, Will CL, Lührmann R. The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine. Vol. 136, Cell. Elsevier B.V.; 2009. p. 701–18.
10. Berglund JA, Chua K. The Splicing Factor BBP Interacts Specifically with the Pre-mRNA Branchpoint Sequence UACUAAC. Vol. 89, Cell. 1997.
11. Zhou Z, Gong Q, Wang Y, Li M, Wang L, Ding H, et al. The biological function and clinical significance of SF3B1 mutations in cancer. Vol. 8, Biomarker Research. BioMed Central; 2020.
12. Ilagan JO, Ramakrishnan A, Hayes B, Murphy ME, Zebari AS, Bradley P, et al. U2AF1 mutations alter splice site recognition in hematological malignancies. *Genome Res.* 2015 Jan 1;25(1):14–26.
13. Wan R, Bai R, Shi Y. Molecular choreography of pre-mRNA splicing by the spliceosome. Vol. 59, Current Opinion in Structural Biology. Elsevier Ltd; 2019. p. 124–33.
14. Zhang Y, Qian J, Gu C, Yang Y. Alternative splicing and cancer: a systematic review. Vol. 6, Signal Transduction and Targeted Therapy. Springer Nature; 2021.
15. Baralle FE, Giudice J. Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity. Vol. 18, Nature Reviews Molecular Cell Biology. Nature Publishing Group; 2017. p. 437–51.
16. Gallego-Paez LM, Bordone MC, Leote AC, Saraiva-Agostinho N, Ascensão-Ferreira M, Barbosa-Morais NL. Alternative splicing: the pledge, the turn, and the prestige: The key role of alternative splicing in human biological systems. Vol. 136, Human Genetics. Springer Verlag; 2017. p. 1015–42.

17. Long JC, Caceres JF. The SR protein family of splicing factors: Master regulators of gene expression. Vol. 417, *Biochemical Journal*. 2009. p. 15–27.
18. Wang Y, Chen D, Qian H, Tsai YS, Shao S, Liu Q, et al. The Splicing Factor RBM4 Controls Apoptosis, Proliferation, and Migration to Suppress Tumor Progression. *Cancer Cell*. 2014;26(3):374–89.
19. Dvinge H, Kim E, Abdel-Wahab O, Bradley RK. RNA splicing factors as oncoproteins and tumour suppressors. Vol. 16, *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group; 2016. p. 413–30.
20. Wang Y, Bao Y, Zhang S, Wang Z. Splicing dysregulation in cancer: from mechanistic understanding to a new class of therapeutic targets. Vol. 63, *Science China Life Sciences*. Science in China Press; 2020. p. 469–84.
21. Anczuków O, Rosenberg AZ, Akerman M, Das S, Zhan L, Karni R, et al. The splicing factor SRSF1 regulates apoptosis and proliferation to promote mammary epithelial cell transformation. *Nat Struct Mol Biol*. 2012 Feb;19(2):220–8.
22. Fan L, Zhang F, Xu S, Cui X, Hussain A, Fazli L, et al. Histone demethylase JMJD1A promotes alternative splicing of AR variant 7 (AR-V7) in prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 May 15;115(20):E4584–93.
23. Iborra S, Hirschfeld M, Jaeger M, Hausen A Zur, Braicu I, Sehouli J, et al. Alterations in expression pattern of splicing factors in epithelial ovarian cancer and its clinical impact. *International Journal of Gynecological Cancer*. 2013;23(6):990–6.

24. Alors-Perez E, Blázquez-Encinas R, Alcalá S, Viyuela-García C, Pedraza-Arevalo S, Herrero-Aguayo V, et al. Dysregulated splicing factor SF3B1 unveils a dual therapeutic vulnerability to target pancreatic cancer cells and cancer stem cells with an anti-splicing drug. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 2021 Dec 1;40(1).
25. Imielinski M, Berger AH, Hammerman PS, Hernandez B, Pugh TJ, Hodis E, et al. Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. *Cell*. 2012 Sep 14;150(6):1107–20.
26. Kole R, Krainer AR, Altman S. RNA therapeutics: Beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. Vol. 11, *Nature Reviews Drug Discovery*. 2012. p. 125–40.
27. Naryshkin NA, Weetall M, Dakka A, Narasimhan J, Zhao X, Feng Z, et al. SMN2 splicing modifiers improve motor function and longevity in mice with spinal muscular atrophy.
28. Palacino J, Swalley SE, Song C, Cheung AK, Shu L, Zhang X, et al. SMN2 splice modulators enhance U1-pre-mRNA association and rescue SMA mice. *Nat Chem Biol*. 2015 Jul 20;11(7):511–7.
29. Michelson D, Ciafaloni E, Ashwal S, Lewis E, Narayanaswami P, Oskoui M, et al. Evidence in focus: Nusinersen use in spinal muscular atrophy Report of the Guideline Development, Dissemination, and Implementation Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2018;91(20):923–33.
30. Hong D, Kurzrock R, Kim Y, Woessner R, Younes A, Nemunaitis J, et al. AZD9150, a next-generation antisense oligonucleotide inhibitor of STAT3 with early evidence of

clinical activity in lymphoma and lung cancer [Internet]. Available from: www.ScienceTranslationalMedicine.org

31. Xiong H, Veedu RN, Diermeier SD. Recent advances in oligonucleotide therapeutics in oncology. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2021.
32. Chi KN, Yu EY, Jacobs C, Bazov J, Kollmannsberger C, Higano CS, et al. A phase I dose-escalation study of apatorsen (OGX-427), an antisense inhibitor targeting heat shock protein 27 (Hsp27), in patients with castration-resistant prostate cancer and other advanced cancers. *Annals of Oncology*. 2016 Jun 18;27(6):1116–22.
33. Xiong H, Veedu RN, Diermeier SD. Recent advances in oligonucleotide therapeutics in oncology. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2021.
34. Wang H, Yang L, Liu M, Luo J. Protein post-translational modifications in the regulation of cancer hallmarks. *Cancer Gene Therapy*. Springer Nature; 2022.
35. Singh V, Ram M, Kumar R, Prasad R, Roy BK, Singh KK. Phosphorylation: Implications in Cancer. Vol. 36, *Protein Journal*. Springer Science and Business Media, LLC; 2017.
36. Cui J, Zhou Z, Yang H, Jiao F, Li N, Gao Y, et al. MST1 suppresses pancreatic cancer progression via ROS-induced pyroptosis. *Molecular Cancer Research*. 2019 Jun 1;17(6):1316–25.
37. Messina B, Lo Sardo F, Scalera S, Memeo L, Colarossi C, Mare M, et al. Hippo pathway dysregulation in gastric cancer: from *Helicobacter pylori* infection to tumor promotion and progression. Vol. 14, *Cell Death and Disease*. Springer Nature; 2023.

38. Wang X, Su L, Ou Q. Yes-associated protein promotes tumour development in luminal epithelial derived breast cancer. *Eur J Cancer*. 2012 May;48(8):1227–34.
39. Gokhale R, Pflieger CM. The Power of Drosophila Genetics: The Discovery of the Hippo Pathway. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2019. p. 3–26.
40. Kowalczyk W, Romanelli L, Atkins M, Hillen H, Bravo González-Blas C, Jacobs J, et al. Hippo signaling instructs ectopic but not normal organ growth. *Science* (1979) [Internet]. 2022 Nov 18;378(6621). Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.abg3679>
41. Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J, et al. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev*. 2007 Nov 1;21(21):2747–61.
42. Liu CY, Zha ZY, Zhou X, Zhang H, Huang W, Zhao D, et al. The hippo tumor pathway promotes TAZ degradation by phosphorylating a phosphodegron and recruiting the SCF β -TrCP E3 ligase. *Journal of Biological Chemistry*. 2010 Nov 26;285(48):37159–69.
43. Zhao B, Li L, Tumaneng K, Wang CY, Guan KL. A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF β -TRCP. *Genes Dev*. 2010 Jan 1;24(1):72–85.
44. Overholtzer M, Zhang J, Smolen GA, Muir B, Li W, Sgroi DC, et al. Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on the chromosome 11q22 amplicon [Internet]. 2006. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0605579103

45. Siew WC, Chun JL, Guo K, Chee PN, Lee I, Hunziker W, et al. A role for TAZ in migration, invasion, and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cancer Res.* 2008 Apr 15;68(8):2592–8.
46. Wang X, Su L, Ou Q. Yes-associated protein promotes tumour development in luminal epithelial derived breast cancer. *Eur J Cancer.* 2012 May;48(8):1227–34.
47. Wang Y, Xu X, Maglic D, Dill MT, Mojumdar K, Ng PKS, et al. Comprehensive Molecular Characterization of the Hippo Signaling Pathway in Cancer. *Cell Rep.* 2018 Oct 30;25(5):1304-1317.e5.
48. Moroishi T, Hayashi T, Pan WW, Fujita Y, Holt M V., Qin J, et al. The Hippo Pathway Kinases LATS1/2 Suppress Cancer Immunity. *Cell.* 2016 Dec 1;167(6):1525-1539.e17.
49. Liu XF, Han Q, Yang M, Lin XY, Han YC. Original Article MST1 inhibits cell proliferation and invasion of non-small-cell lung cancer by regulating YAP phosphorylation and Hippo pathway [Internet]. Vol. 11, *Int J Clin Exp Pathol.* 2018. Available from: www.ijcep.com/
50. Zhou D, Conrad C, Xia F, Park JS, Payer B, Yin Y, et al. Mst1 and Mst2 Maintain Hepatocyte Quiescence and Suppress Hepatocellular Carcinoma Development through Inactivation of the Yap1 Oncogene. *Cancer Cell.* 2009 Nov 6;16(5):425–38.
51. Zhou D, Zhang Y, Wu H, Barryg E, Yin Y, Lawrence E, et al. Mst1 and Mst2 protein kinases restrain intestinal stem cell proliferation and colonic tumorigenesis by inhibition of Yes-associated protein (Yap) overabundance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Dec 6;108(49).

52. Zhang H, Qu X, Han L, Di X. Mst2 Overexpression Inhibits Thyroid Carcinoma Growth and Metastasis by Disrupting Mitochondrial Fitness and Endoplasmic Reticulum Homeostasis. *J Oncol.* 2021;2021.
53. Galan JA, Avruch J. MST1/MST2 Protein Kinases: Regulation and Physiologic Roles. *Biochemistry.* 2016 Oct 4;55(39):5507–19.
54. Avruch J, Zhou D, Fitamant J, Bardeesy N, Mou F, Barrufet LR. Protein kinases of the Hippo pathway: Regulation and substrates. Vol. 23, *Seminars in Cell and Developmental Biology.* Elsevier Ltd; 2012. p. 770–84.
55. Ni L, Li S, Yu J, Min J, Brautigam CA, Tomchick DR, et al. Structural basis for autoactivation of human Mst2 kinase and its regulation by RASSF5. *Structure.* 2013 Oct 8;21(10):1757–68.
56. Ni L, Zheng Y, Hara M, Pan D, Luo X. Structural basis for Mob1-dependent activation of the core Mst–Lats kinase cascade in Hippo signaling. *Genes Dev.* 2015 Jul 1;29(13):1416–31.
57. Kim SY, Tachioka Y, Mori T, Hakoshima T. Structural basis for autoinhibition and its relief of MOB1 in the Hippo pathway. *Sci Rep.* 2016 Jun 23;6.
58. Xiong S, Couzens AL, Kean MJ, Mao DY, Guettler S, Kurinov I, et al. Regulation of protein interactions by Mps one binder (MOB1) phosphorylation. *Molecular and Cellular Proteomics.* 2017 Jun 1;16(6):1111–25.
59. Praskova M, Xia F, Avruch J. MOBKL1A/MOBKL1B Phosphorylation by MST1 and MST2 Inhibits Cell Proliferation. *Current Biology.* 2008 Mar 11;18(5):311–21.

60. Guo C, Tommasi S, Liu L, Yee JK, Dammann R, Pfeifer GPP. RASSF1A Is Part of a Complex Similar to the Drosophila Hippo/Salvador/Lats Tumor-Suppressor Network. *Current Biology*. 2007 Apr 17;17(8):700–5.
61. Callus BA, Verhagen AM, Vaux DL. Association of mammalian sterile twenty kinases, Mst1 and Mst2, with hSalvador via C-terminal coiled-coil domains, leads to its stabilization and phosphorylation. *FEBS Journal*. 2006 Sep;273(18):4264–76.
62. Fiore APZP, Rodrigues AM, Ribeiro-Filho HV, Manucci AC, de Freitas Ribeiro P, Botelho MCS, et al. Extracellular matrix stiffness regulates degradation of MST2 via SCF β TrCP. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2022 Dec 1;1866(12).
63. Graves JD, Gotoh Y, Draves KE, Ambrose D, Han DKM, Wright M, et al. Caspase-mediated activation and induction of apoptosis by the mammalian Ste20-like kinase Mst1. Vol. 17, *The EMBO Journal*. 1998.
64. Lin Y, Khokhlatchev A, Figeys D, Avruch J. Death-associated protein 4 binds MST1 and augments MST1-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2002 Dec 13;277(50):47991–8001.
65. Zhou D, Conrad C, Xia F, Park JS, Payer B, Yin Y, et al. Mst1 and Mst2 Maintain Hepatocyte Quiescence and Suppress Hepatocellular Carcinoma Development through Inactivation of the Yap1 Oncogene. *Cancer Cell*. 2009 Nov 6;16(5):425–38.
66. Cinar B, Fang PK, Lutchman M, Di Vizio D, Adam RM, Pavlova N, et al. The pro-apoptotic kinase Mst1 and its caspase cleavage products are direct inhibitors of Akt1. *EMBO Journal*. 2007 Oct 31;26(21):4523–34.

67. Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PRJ, Reese CB, et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B.
68. Nitulescu GM, Van De Venter M, Nitulescu G, Ungurianu A, Juzenas P, Peng Q, et al. The Akt pathway in oncology therapy and beyond (Review). Vol. 53, International Journal of Oncology. Spandidos Publications; 2018. p. 2319–31.
69. Rizki A, Weaver VM, Lee SY, Rozenberg GI, Chin K, Myers CA, et al. A human breast cell model of preinvasive to invasive transition. *Cancer Res.* 2008 Mar 1;68(5):1378–87.
70. Fiore APZP, Spencer VA, Mori H, Carvalho HF, Bissell MJ, Bruni-Cardoso A. Laminin-111 and the Level of Nuclear Actin Regulate Epithelial Quiescence via Exportin-6. *Cell Rep.* 2017 Jun 6;19(10):2102–15.
71. Russo LC, Tomasin R, Matos IA, Manucci AC, Sowa ST, Dale K, et al. The SARS-CoV-2 Nsp3 macrodomain reverses PARP9/DTX3L-dependent ADP-ribosylation induced by interferon signaling. *Journal of Biological Chemistry.* 2021 Sep 1;297(3).
72. Meng Z, Moroishi T, Mottier-Pavie V, Plouffe SW, Hansen CG, Hong AW, et al. MAP4K family kinases act in parallel to MST1/2 to activate LATS1/2 in the Hippo pathway. *Nat Commun.* 2015 Oct 5;6.
73. Lee KK, Ohyama T, Yajima N, Tsubuki S, Yonehara S. MST, a Physiological Caspase Substrate, Highly Sensitizes Apoptosis Both Upstream and Downstream of Caspase Activation. *Journal of Biological Chemistry.* 2001 Jun 1;276(22):19276–85.

74. Radu M, Chernoff J. The DeMSTification of Mammalian Ste20 Kinases. Vol. 19, Current Biology. 2009.
75. Breast Cancer. Breast Cancer. Exon Publications; 2022.
76. Ren JX, Gong Y, Ling H, Hu X, Shao ZM. Racial/ethnic differences in the outcomes of patients with metastatic breast cancer: contributions of demographic, socioeconomic, tumor and metastatic characteristics. *Breast Cancer Res Treat.* 2019 Jan 15;173(1):225–37.
77. Rakha EA et al. , 2010. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res*, v. 12, n. 4, p. 207, 2010
78. Makwana KM, Mahalakshmi R. Implications of aromatic-aromatic interactions: From protein structures to peptide models. *Protein Science.* 2015 Dec 1;24(12):1920–33.
79. Bergendahl LT, Gerasimavicius L, Miles J, Macdonald L, Wells JN, Welburn JPI, et al. The role of protein complexes in human genetic disease. Vol. 28, *Protein Science.* Blackwell Publishing Ltd; 2019. p. 1400–11.
80. Minegishi Y, Saito M, Tsuchiya S, Tsuge I, Takada H, Hara T, et al. Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature.* 2007 Aug 30;448(7157):1058–62.
81. Dasgupta I, McCollum D. Control of cellular responses to mechanical cues through YAP/TAZ regulation. Vol. 294, *Journal of Biological Chemistry.* American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.; 2019. p. 17693–706.
82. Won GW, Park SH, Park J, Lee Y, Lee YH. Mammalian Hippo kinase pathway is downregulated by BCL-2 via protein

degradation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019 Apr 23;512(1):87–92.

83. Matsumoto H, Murakami Y, Kataoka K, Lin H, Connor KM, Miller JW, et al. Mammalian STE20-like kinase 2, not kinase 1, mediates photoreceptor cell death during retinal detachment. *Cell Death Dis*. 2014 May 29;5.
84. Cheung WL, Ajiro K, Samejima K, Kloc M, Cheung P, Mizzen CA, et al. Apoptotic Phosphorylation of Histone H2B Is Mediated by Mammalian Sterile Twenty Kinase (volving caspases and kinases) that promote or prevent cell death are better characterized (reviewed in Kaufmann and The fundamental unit of eukaryotic chromatin is the cell death during *Xenopus* tail resorption. Using an in-gel kinase assay, we identified an apoptotic-induced 34 [Internet]. Vol. 113, Hengartner. 2003. Available from: www.cell.com/cgi/content/full/113/4/507/DC1
85. Ura S, Nishina H, Gotoh Y, Katada T. Activation of the c-Jun N-Terminal Kinase Pathway by MST1 Is Essential and Sufficient for the Induction of Chromatin Condensation during Apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2007 Aug 1;27(15):5514–22.
86. Carafa V, Altucci L. Deregulation of cell death in cancer: Recent highlights. Vol. 12, *Cancers*. MDPI AG; 2020. p. 1–4.
87. Labi V, Erlacher M. How cell death shapes cancer. Vol. 6, *Cell Death and Disease*. Nature Publishing Group; 2015.
88. Zhang H, Qu X, Han L, Di X. Mst2 Overexpression Inhibits Thyroid Carcinoma Growth and Metastasis by Disrupting Mitochondrial Fitness and Endoplasmic Reticulum Homeostasis. *J Oncol*. 2021;2021.

89. Li Y, Sun N, Lu Z, Sun S, Huang J, Chen Z, et al. Prognostic alternative mRNA splicing signature in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 2017 May 1;393:40–51.
90. Bjørklund SS, Panda A, Kumar S, Seiler M, Robinson D, Gheeya J, et al. Widespread alternative exon usage in clinically distinct subtypes of Invasive Ductal Carcinoma. *Sci Rep.* 2017 Dec 1;7(1).
91. Kahles A, Lehmann K Van, Toussaint NC, Hüser M, Stark SG, Sachsenberg T, et al. Comprehensive Analysis of Alternative Splicing Across Tumors from 8,705 Patients. *Cancer Cell.* 2018 Aug 13;34(2):211-224.e6.
92. Paik PK, Drilon A, Fan PD, Yu H, Rekhtman N, Ginsberg MS, et al. Response to MET inhibitors in patients with stage IV lung adenocarcinomas harboring met mutations causing exon 14 skipping. *Cancer Discov.* 2015 Aug 1;5(8):842–50.
93. Frampton GM, Ali SM, Rosenzweig M, Chmielecki J, Lu X, Bauer TM, et al. Activation of MET via diverse exon 14 splicing alterations occurs in multiple tumor types and confers clinical sensitivity to MET inhibitors. *Cancer Discov.* 2015 Aug 1;5(8):850–60.
94. Liu J, Lichtenberg T, Hoadley KA, Poisson LM, Lazar AJ, Cherniack AD, et al. An Integrated TCGA Pan-Cancer Clinical Data Resource to Drive High-Quality Survival Outcome Analytics. *Cell.* 2018 Apr 5;173(2):400-416.e11.
95. Puik JR, Swijnenburg RJ, Kazemier G, Giovannetti E. Novel Strategies to Address Critical Challenges in Pancreatic Cancer. Vol. 14, *Cancers.* MDPI; 2022.
96. Skordis LA, Dunckley MG, Yue B, Eperon IC, Muntoni F. Bifunctional antisense oligonucleotides provide a trans-acting

splicing enhancer that stimulates SMN2 gene expression in patient fibroblasts [Internet]. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0633863100

97. Brierley J, Gospodarowicz M, O'Sullivan B. The principles of cancer staging. Vol. 10, *ecancermedicalscience*. *ecancer Global Foundation*; 2016.
98. Bonotto M, Gerratana L, Poletto E, Driol P, Giangreco M, Russo S, et al. Measures of Outcome in Metastatic Breast Cancer: Insights From a Real-World Scenario. Available from: <http://dx.doi.org/10.1634/theoncologist.2014->
99. Inic Z, Zegarac M, Inic M, Markovic I, Kozomara Z, Djuricic I, et al. Difference between Luminal A and Luminal B subtypes according to Ki-67, tumor size, and progesterone receptor negativity providing prognostic information. *Clin Med Insights Oncol*. 2014 Sep 11;8:107–11.