UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)

EDMILSON OZORIO DOS SANTOS

INVESTIGAÇÃO DAS QUINASES AURORA A E AURORA B NA TUMORIGENICIDADE MEDIADA PELO ONCOGENE *KRAS*.

Versão corrigida da tese defendida

São Paulo
Data do Depósito na SPG
30/11/2016

EDMILSON OZORIO DOS SANTOS

INVESTIGAÇÃO DAS QUINASES AURORA A E AURORA B NA TUMORIGENICIDADE MEDIADA PELO ONCOGENE *KRAS*.

Tese apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciência (Bioquímica).

Orientador: Daniela Sanchez Bassères

São Paulo
2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Santos, Edmilson Ozorio dos
S237in Investigação das quinases Aurora A e Aurora B na tumorigenicidade mediada pelo oncogene *KRAS* / Edmilson Ozorio dos Santos. -- São Paulo, 2016.
178p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica
Orientador: Bassères, Daniela Sanchez

1. Biologia molecular 2. Neoplasias I. T. II. Bassères, Daniela Sanchez, orientador.

574.88 CDD

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

"Investigação das quinases aurora A e aurora B na tumorigenicidade mediada pelo oncogene *KRAS*"

EDMILSON OZORIO DOS SANTOS

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovado (a) por:

Profa. Dra. Daniela Sanchez Bassères
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. Hugo Aguirre Armelin
IQ - USP

Prof. Dr. Alexandre Bruni Cardoso
IQ – USP

Profa. Dra. Nathalie Cella
ICB – USP

Profa. Dra. Vilma Regina Martins
A. C. Camargo

SÃO PAULO
08 de fevereiro de 2017

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, CAPES, FAPESP e FAMRI, pelo apoio financeiro.

À Dra. Daniela Bassères, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, pela sua orientação, e a todos os membros atuais e ex-integrantes de seu laboratório, dentre eles: Amanda Padilha, Vanessa Miranda, Thalita Bueno, Luiza Scalabrini, Sandro Mascena, Lutero Hasenkamp e Felipe Rodrigues, que, juntos, possibilitaram a conclusão deste trabalho.

À Dra. Giulia Guarguaglini, do Consiglio Nazionale delle Ricerche, Università di Roma *La Sapienza*, por sua orientação, e a todos os membros de seu laboratório, dentre eles Valentina Sterbini, Elena Crecca, Paola Rovella, Annalisa Verrico, Michela Damizia, Jessica Bartoli, Eugenia Gillistro e Lia Asteriti, pelo carinho e acolhimento ao longo de meu período sanduíche de doutorado.

À toda minha família, especialmente aos meus amados pais, Maria Laura e Nestor, pelo apoio incondicional em toda a minha vida para a realização dos meus objetivos pessoais.

Aos meus amigos, inúmeros, que me ajudaram e incentivaram.

A Deus, por tudo.

RESUMO

dos Santos, E. O. Investigação das quinases Aurora A e Aurora B na tumorigenicidade mediada pelo oncogene *KRAS*. 2016. 178p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O câncer de pulmão é a principal causa de morte relacionada ao câncer no mundo. Mutações em *KRAS* são altamente prevalentes no câncer e têm sido diretamente associadas ao processo tumorigênico. Apesar disso, até hoje todas as terapias visando inibir KRAS diretamente falharam e a caracterização de alvos indiretos, importantes para a oncogênese mediada por *KRAS*, é fundamental para o desenvolvimento de novas terapias contra o câncer de pulmão. Nós mostramos previamente que as quinases Aurora A (AURKA) e B (AURKB) são alvos a jusante de KRAS, importantes para o crescimento, viabilidade e oncogenicidade de linhagens celulares derivadas de tumores pulmonares mediados por *KRAS*. Aqui, nós aprofundamos os nossos estudos para melhor caracterizar AURKA e AURKB como potenciais alvos terapêuticos no câncer de pulmão. Os objetivos deste trabalho foram (1) investigar o mecanismo de perda de viabilidade induzido pela inibição de AURKA e/ou AURKB; (2) avaliar como a inibição de AURKA e/ou AURKB afeta propriedades oncogênicas relacionadas à agressividade tumoral; e (3) como a inibição destas quinases afeta o crescimento tumoral *in vivo*. Para tanto, nós utilizamos dois modelos celulares: (1) células A549 e H358, que apresentam mutações em *KRAS*, geneticamente modificadas para a expressão estável e induzível de shRNAs contra AURKA ou AURKB, e (2) células tumorais H1703, que não apresentam mutações em *KRAS*, geneticamente modificadas para a expressão induzível de $KRAS^{G12V}$, tratadas ou não com inibidores farmacológicos das quinases Aurora. A inibição farmacológica ou por interferência de RNA de AURKA e/ou AURKB em células H358 e A549 reduziu a proliferação celular, sendo esta inibição acompanhada de anomalias mitóticas, além de aneuploidia e poliploidia. A inibição destas quinases também induziu morte celular *in vitro,* tanto em mitose, quanto em interfase. Mais interessantemente, a inibição farmacológica dual de AURKA e AURKB induziu morte celular *in vitro* em células H1703, somente na presença de $KRAS^{G12V}$, indicando que a inibição das quinases Aurora afeta preferencialmente células portadoras de mutações em *KRAS*. Além disso, a inibição de AURKA e/ou AURKB reduziu propriedades malignas celulares relacionadas à agressividade tumoral, como migração, invasão e adesão. Finalmente, a inibição de AURKA por RNA de interferência em células A549 também reduziu a formação de tumores *in vivo*. Entretanto, como a inibição destas quinases levou a anomalias mitóticas e à instabilidade genética, nós resolvemos investigar se a inibição de TPX2, um substrato e ativador de AURKA, poderia ser uma abordagem alternativa para inibir esta via em câncer de pulmão induzido por *KRAS*. Primeiramente, nós observamos nos nossos modelos celulares que KRAS regula positivamente a expressão de TPX2. Além disso, a inibição de TPX2 em células pulmonares portadoras de KRAS oncogênica reduziu a viabilidade e proliferação celulares e induziu morte celular. Mais interessantemente, esses efeitos ocorreram preferencialmente em células que expressam KRAS oncogênica. Em conclusão, nossos resultados apoiam a hipótese de que a ativação de AURKA/TPX2 e AURKB por KRAS são eventos importantes no câncer de pulmão e sugerem a inibição destas vias, possivelmente em combinação com outras terapias citotóxicas, como uma nova abordagem terapêutica para o câncer de pulmão induzido por *KRAS*.

Palavras-chave: KRAS, AURKA, TPX2, AURKB, câncer de pulmão.

ABSTRACT

dos Santos, E. O. Investigation of Aurora kinases A and B in KRAS-induced lung tumorigenesis. 2016. 178p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Lung cancer is the leading cause of cancer-related deaths worldwide. *KRAS* mutations are widespread in lung cancer and have been causally linked to tumorigenesis. Nonetheless, therapies targeting KRAS directly have so far failed and characterization of indirect KRAS targets, which play important roles in KRAS-mediated oncogenesis, is crucial for the development of new therapies for lung cancer. We have previously shown that mitotic kinases Aurora A (AURKA) and B (AURKB) are downstream targets of oncogenic KRAS, important for the growth, viability, and oncogenicity of KRAS-transformed lung cancer cell lines. Here, we studied these kinases more in depth in order to better characterize them as potential therapeutical targets for KRAS-induced lung cancer. The aims of this study were (1) to investigate the mechanism leading to loss of viability upon AURKA and/or AURKB targeting; (2) to evaluate how AURKA and/or AURKB inhibition affects malignant properties associated with tumor aggressiveness; and (3) to determine whether AURKA and/or AURKB inhibition reduces KRAS-induced tumor growth *in vivo*. For that purpose, we used two cell-based models: (1) KRAS mutant A549 and H358 cells with stable and inducible shRNA-mediated knockdown of AURKA or AURKB, and (2) KRAS wildtype H1703 tumor cell lines, genetically engineered to inducibly express oncogenic $KRAS^{G12V}$ treated or not with Aurora kinase pharmacological inhibitors. Targeting AURKA and/or AURKB pharmacologically or by RNA interference in H358 and A549 cells led to decreased cell proliferation, which was accompanied by mitotic abnormalities, leading to aneuploidy and hyperploidy. Aurora kinase targeting also induced cell death *in vitro*, both during mitosis and interphase. More importantly, AURKA and AURKB inhibition with a dual pharmacological inhibitor in H1703 cells induced cell death *in vitro*, but only in the presence of $KRAS^{G12V}$, indicating that Aurora kinase targeting affects preferentially lung cells harboring oncogenic KRAS. Furthermore, AURKA and/or AURKB targeting reduced malignant properties associated with tumor aggressiveness, such as cell migration, invasion and adhesion. Finally, AURKA targeting by RNA interference in A549 cells also reduced growth of xenograft tumors *in vivo*. Nonetheless, since Aurora targeting was associated with mitotic abnormalities and genetic instability, we decided to investigate if targeting TPX2, a substrate and an activator of AURKA, could constitute an alternative approach to targeting this pathway in KRAS-induced lung cancer. First, using our cell-based models, we determined that KRAS positively regulates TPX2 expression. In addition, TPX2 inhibition by RNA interference in KRAS-positive lung cells reduced cell viability and proliferation and induced cell death. Finally, these effects occurred preferentially in cells harboring oncogenic KRAS. In conclusion, our results support the hypothesis that activation of AURKA/TPX2 and AURKB by KRAS are important events in lung cancer and suggest inhibition of these pathways, possibly in combination with other cytotoxic therapies, as a new approach for KRAS-induced lung cancer therapy.

Keywords: KRAS, AURKA, TPX2, AURKB, lung cancer.

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1.1	Variação internacional das incidências de neoplasias pulmonares em 2012.	**14**
Fig. 1.2	Sobrevida relativa em cinco anos comparando-se diferentes neoplasias ou diferentes estágios do desenvolvimento tumoral pulmonar.	**15**
Fig. 1.3	Principais mutações associadas ao desenvolvimento de NSCLC e drogas utilizadas atualmente na clínica.	**16**
Fig. 1.4	Estrutura tridimensional dos cinco motivos G e domínio C-terminal de KRAS.	**18**
Fig. 1.5	Modificações pós-traducionais de RAS.	**19**
Fig. 1.6	Regulação da atividade de KRAS, exemplificada a partir de um receptor tirosina quinase.	**22**
Fig. 1.7	Frequência das principais mutações em *RAS*.	**24**
Fig. 1.8	Abordagens no desenvolvimento de inibidores farmacológicos diretos ou indiretos de KRAS oncogênica.	**26**
Fig. 1.9	Inibidores de efetores de RAS em estudos clínicos.	**32**
Fig. 1.10	Triagem em larga escala por RNAi aplicado à descoberta de genes de letalidade sintética em tumores mediados por KRAS.	**34**
Fig. 1.11	Estrutura comparativa das quinases Aurora A, Aurora B e Aurora C.	**36**
Fig. 1.12	Microscopia de fluorescência para as quinases AURKA e AURKB durante as várias fases da mitose.	**38**
Fig. 1.13	Funções das quinases AURKA e AURKB na mitose.	**39**
Fig. 4.1	Estrutura de Aurora Inhibitor II (AI II) e Alisertibe ou MLN8237 (MLN).	**56**
Fig. 4.2	Avaliação da inibição de AURKA e AURKB por MLN e AI II por imunofluorescência.	**57**
Fig. 4.3	Avaliação da inibição de AURKA e AURKB por *western blot* em extrato mitótico após tratamento com MLN ou AI II.	**58**
Fig. 4.4	A inibição farmacológica dual das quinases AURKA e AURKB reduz a proliferação de células portadoras de *KRAS* oncogênica.	**58**
Fig. 4.5	Sincronização com timidina e *time-course* do *release* de células A549.	**60**
Fig. 4.6	Esquema de análise do ciclo celular por técnicas de *time-lapse* para células A549 tratadas com MLN ou AI II.	**60**
Fig. 4.7	A inibição de AURKA e/ou AURKB em células portadoras de mutação em KRAS altera os tempos de interfase de modo dose e geração dependente.	**61**
Fig. 4.8	A inibição de AURKA e/ou AURKB em células portadoras de mutação em KRAS altera os tempos de mitose de modo dose e geração dependente.	**62**
Fig. 4.9	A inibição de AURKA e/ou AURKB em células portadoras de mutação em KRAS altera os tempos de ciclo celular de modo dose e geração dependente.	**63**
Fig. 4.10	Análise da progressão mitótica induzida pela inibição de AURKA e/ou AURKB em células A549.	**64**

Fig. 4.11	A inibição de AURKA e/ou AURKB reduz a proliferação celular.	**65**
Fig. 4.12	Painel representativo das anomalias mitóticas induzidas pela inibição de AURKA e/ou AURKB observáveis por microscopia de *time-lapse* em células A549.	**67**
Fig. 4.13	Representação gráfica da frequência e distribuição das principais anomalias mitóticas induzidas pela inibição de AURKA e/ou AURKB em células A549.	**68**
Fig. 4.14	Frequência e distribuição das anomalias mitóticas induzidas pela inibição das quinases AURKA e/ou AURKB em células A549.	**69**
Fig. 4.15	A inibição de AURKA e/ou AURKB induz poliploidização intermitente.	**71**
Fig. 4.16	A inibição de AURKA e/ou AURKB induz poliploidização intermitente e amplificação do centrossomo associada à aneuploidia e instabilidade genética.	**72**
Fig. 4.17	Validação da inibição de AURKA ou AURKB por RNA de interferência em células portadoras de mutações em *KRAS*.	**73**
Fig. 4.18	A inibição da expressão de AURKA ou AURKB por interferência de RNA em células portadoras de mutações em *KRAS* reduz a proliferação celular e induz acúmulo de células em G2/M.	**75**
Fig. 4.19	Modelo experimental para imageamento ao vivo de células A549 shAURKA.	**76**
Fig. 4.20	Análise dos tempos de mitose e interfase em células A549 geneticamente manipuladas para a inibição da quinase Aurora A.	**77**
Fig. 4.21	A inibição de AURKA por RNA de interferência induz acúmulo de células mitóticas em prometáfase.	**78**
Fig. 4.22	A inibição da quinase Aurora A em células portadoras de mutações em *KRAS* induz diversas anomalias mitóticas.	**79**
Fig. 4.23	A inibição farmacológica dual das quinases AURKA e AURKB induz morte em células portadoras de KRAS oncogênica.	**80**
Fig. 4.24	A inibição farmacológica dual das quinases Aurora A e Aurora B induz morte por apoptose em células portadoras de KRAS oncogênica.	**81**
Fig. 4.25	A inibição das quinases AURKA e AURKB em células portadoras de mutação em KRAS induz morte celular em mitose e interfase.	**82**
Fig. 4.26	Diferentes condições de inibição das quinases Aurora AURKA e/ou AURKB induzem diferentes perfis de morte mitótica.	**83**
Fig. 4.27	A inibição da expressão de AURKA ou AURKB por interferência de RNA em células portadoras de mutações em *KRAS* induz morte celular por apoptose.	**84**
Fig. 4.28	A inibição da quinase Aurora A em c[elulas portadoras de mutação em *KRAS* induz morte celular em interfase.	**85**
Fig. 4.29	A inibição farmacológica das quinases AURKA e AURKB induz morte celular de modo dependente da presença de KRAS oncogênica.	**87**
Fig. 4.30	A inibição farmacológica dual das quinases AURKA e AURKB induz morte por apoptose de modo dependente da presença de KRAS oncogênica.	**88**
Fig. 4.31	A inibição farmacológica da atividade de AURKA e/ou AURKB por AI II em células portadoras de mutações em *KRAS* reduz a migração celular.	**90**
Fig. 4.32	A inibição farmacológica das quinases AURKA e/ou AURKB reduz a migração de células portadoras de mutação em *KRAS*.	**90**

Fig. 4.33	A inibição farmacológica dual das quinases AURKA e AURKB reduz a atividade gelatinolítica de MMP2 e MMP9.	**91**
Fig. 4.34	A inibição farmacológica dual das quinases AURKA e AURKB reduz a abundância das formas ativas das metaloproteinases de matriz MMP2 e MMP9.	**92**
Fig. 4.35	A inibição farmacológica dual das quinases AURKA e AURKB reduz a adesão de células portadoras de KRAS oncogênica.	**93**
Fig. 4.36	A inibição da expressão de AURKA ou AURKB por interferência de RNA em células portadoras de mutações em KRAS reduz a migração celular.	**96**
Fig. 4.37	A inibição genética de AURKA em células portadoras de mutação em *KRAS* reduz a migração celular.	**97**
Fig. 4.38	A inibição da expressão de AURKA ou AURKB por interferência de RNA em células portadoras de mutações em *KRAS* reduz a atividade gelatinolítica das metaloproteinases de matriz MMP2 e MMP9.	**98**
Fig. 4.39	As quinases AURKA e AURKB promovem a adesão de células portadoras de KRAS oncogênica.	**99**
Fig. 4.40	A inibição da expressão de AURKA por interferência de RNA em células portadoras de mutação em *KRAS* reduz o crescimento de tumores xenográficos, mas não induz apoptose *in vivo*.	**102**
Fig. 4.41	A indução de $KRAS^{G12V}$ leva ao aumento da expressão de AURKA e TPX2 em extratos proteicos totais de células geneticamente manipuladas para expressar KRAS oncogênica.	**104**
Fig. 4.42	A indução de $KRAS^{G12V}$ leva ao aumento da expressão de CCNB1 em extratos proteicos totais de células geneticamente manipuladas para expressar KRAS oncogênica.	**104**
Fig. 4.43	A indução de $KRAS^{G12V}$ leva a um aumento dos níveis mitóticos de AURKA e TPX2 em células geneticamente manipuladas para expressar KRAS oncogênica.	**106**
Fig. 4.44	A indução de $KRAS^{G12V}$ leva a um aumento de AURKA em interfase em células geneticamente manipuladas para expressar KRAS oncogênica.	**107**
Fig. 4.45	A indução de $KRAS^{G12V}$ induz o acúmulo de AURKA nuclear em interfase.	**107**
Fig. 4.46	A indução de $KRAS^{G12V}$ leva a um aumento de TPX2 em interfase em células geneticamente manipuladas para expressar KRAS oncogênica.	**108**
Fig. 4.47	A superexpressão $KRAS^{G12V}$ é acompanhada pela co-expressão de AURKA e TPX2.	**109**
Fig. 4.48	A alta expressão de AURKA e TPX2 está associada a NSCLC de alto risco.	**110**
Fig. 4.49	A expressão alta de AURKA ou TPX2 está associada à menor sobrevida de pacientes com NSCLC.	**111**
Fig. 4.50	A inibição de TPX2 em células pulmonares transformadas por KRAS induz a perda completa da viabilidade celular.	**112**
Fig. 4.51	A inibição de TPX2 reduz a viabilidade celular preferencialmente em células tumorais pulmonares portadoras de mutações em *KRAS*.	**113**
Fig. 4.52	A inibição de TPX2 em células portadoras de mutação em KRAS induz bloqueio em G2/M, hiperploidia e morte celular.	**113**
Fig. 4.53	A inibição de TPX2 por RNA de interferência em células geneticamente modificadas para expressar induzivelmente $KRAS^{G12V}$ causa morte celular de modo levemente dependente de KRAS oncogênica.	**114**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	**13**
1.1. O câncer de pulmão	**13**
1.2. A pequena GTPase KRAS	**17**
1.2.1. Histórico	**17**
1.2.2. Estrutura	**17**
1.2.3. Função e regulação	**20**
1.2.4. KRAS e câncer	**22**
1.2.5. KRAS como alvo terapêutico	**26**
1.2.5.1. Inibição direta de KRAS	**26**
1.2.5.1.1. Inibidores competitivos análogos de GDP	**27**
1.2.5.1.2. Inibidores de GEFs	**27**
1.2.5.1.3. Inibidores da formação dos complexos RAS/RAF e RAS/PI3K	**27**
1.2.5.1.4. Inibidores específicos de KRAS oncogênica.	**28**
1.2.5.2. Inibidores de modificações pós-traducionais de RAS	**29**
1.2.5.2.1. Inibidores da farnesiltransferase e geranilgeraniltransferase	**29**
1.2.5.2.2. Inibidores de RCE1 e ICMT	**30**
1.2.5.2.3. Inibidores da palmitoiltransferase	**31**
1.2.5.3. Inibidores de efetores de sinalização	**31**
1.2.5.4. Inibidores de genes de interação letal sintética	**33**
1.3. As quinases Aurora	**35**
1.3.1. Estrutura e localização	**36**
1.3.2. Função e regulação	**38**
1.3.3. Quinases Aurora e câncer	**42**
1.3.3. Quinases Aurora e KRAS	**43**
2. OBJETIVOS	**46**
2.1. Objetivo geral	**46**
2.2. Objetivos específicos	**46**
3. MATERIAL E MÉTODOS	**47**

	3.1. Linhagens celulares	**47**
	3.2. Ensaios biológicos	**48**
	3.2. Western Blot	**49**
	3.3. Zimografia.	**49**
	3.4. Ensaio de ciclo celular baseado na incorporação de PI e detecção por citometria de fluxo.	**50**
	3.5. Ensaio de proliferação baseado na incorporação de BrdU e/ou PI e detecção por citometria de fluxo.	**50**
	3.6. Ensaio de morte celular baseado na marcação com Anexina V e PI e detecção por citometria de fluxo.	**51**
	3.7. Ensaio de adesão celular	**52**
	3.8. Ensaio de migração celular por wound-healing	**52**
	3.9. Ensaio de migração celular por imageamento ao vivo.	**53**
	3.10. Ensaios xenográficos.	**53**
	3.11. Imunofluorescência	**54**
	3.12. Microscopia de time-lapse ao vivo.	**54**
	3.13. Ensaio de viabilidade baseado na clonogenicidade celular	**54**
	3.14. Análise de bioinformática	**55**
4. RESULTADOS		**56**
	4.1. A inibição farmacológica das quinases AURKA e AURKB em células portadoras de mutação em KRAS promove uma redução da proliferação, induz prolongamento do ciclo celular, instabilidade genética e hiperploidia.	**56**
	4.2. A inibição das quinases AURKA e AURKB por interferência de RNA em células portadoras de mutação em KRAS reduz a proliferação celular e a inibição de AURKA altera o tempo de ciclo celular, reduzindo a proliferação, além de induzir hiperploidia e outras anomalias mitóticas.	**73**
	4.3. A inibição farmacológica das quinases AURKA e AURKB em células portadoras de mutação em KRAS induz morte celular.	**80**
	4.4. A inibição das quinases AURKA e AURKB por interferência de RNA em células portadoras de mutação em KRAS induz morte celular.	**84**
	4.5. A indução de morte celular pela inibição das quinases AURKA e AURKB em linhagens pulmonares depende da presença de KRAS oncogênica.	**86**
	4.6. A inibição farmacológica das quinases AURKA e AURKB em células portadoras de mutação em KRAS reduz a migração, adesão e expressão e atividade proteolítica de metaloproteinases de matriz associadas à invasão celular.	**89**
	4.7. A inibição das quinases AURKA e AURKB por interferência de RNA em células portadoras de mutação em KRAS reduz a migração, adesão e atividade proteolítica de metaloproteinases de matriz associadas à invasão celular.	**95**

	4.8. A inibição da quinase AURKA por interferência de RNA em células portadoras de mutação em KRAS promove uma redução da formação de tumores in vivo.	**101**
	4.9. A KRAS oncogênica, não só induz a expressão de AURKA em células tumorais pulmonares, mas também do ativador de AURKA TPX2.	**103**
	4.10. A expressão de AURKA e TPX2 está aumentada em pacientes de câncer de pulmão portadores de mutações oncogênicas em KRAS e está associada a um pior prognóstico.	**110**
	4.11. A inibição de TPX2 por interferência de RNA reduz o crescimento e viabilidade celulares e induz morte celular de modo dependente de KRASG12V.	**112**
5. DISCUSSÃO		**115**
6. CONCLUSÃO		**128**
7. BIBLIOGRAGIA		**129**

1. INTRODUÇÃO

1.1. O câncer de pulmão.

O câncer de pulmão é a principal causa de morte relacionada ao câncer em homens e a segunda em mulheres, com uma estimativa de 1,6 milhões de mortes em 2012 em todo o mundo, considerando-se ambos os sexos. Em países desenvolvidos, entretanto, é a principal causa de morte relacionada ao câncer em mulheres, superando inclusive o câncer de mama **(IARC, 2012)**. De fato, países desenvolvidos, seguidos por países emergentes, apresentam maiores incidências de neoplasias pulmonares em relação aos países subdesenvolvidos **(Fig. 1.1)**.

As diferenças epidemiológicas observadas refletem, sobretudo, o estágio epidêmico de tabaco **(Youlden et al, 2008; Bray et al, 2010; Thun et al, 2012)**. O fumo é essencialmente o fator de risco mais importante para o desenvolvimento de neoplasias pulmonares, sendo responsável por cerca de 80% de todas as mortes relacionadas ao câncer de pulmão em homens e 50% em mulheres **(Eriksen et al, 2012)**. Em países desenvolvidos, onde o hábito de fumo tem decaído, o câncer de pulmão vem decrescendo em homens e mantendo um platô em mulheres **(Bosetti et al, 2012; Malvezzi et al, 2013; Siegel et al, 2013; Torre et al, 2014)**. Contrariamente, em países onde o consumo de tabaco vem aumentando recentemente, como no Brasil, a prevalência e incidência de câncer de pulmão tendem a aumentar nas próximas décadas, caso não ocorram intervenções de larga escala que incentivem o abandono do fumo **(Lam et al, 2004; Jha et al, 2009)**.

Apesar do crescente número de novas técnicas cirúrgicas e terapias combinadas desenvolvidas nas últimas décadas, o câncer de pulmão é altamente letal. A sobrevivência global em cinco anos para tumores pulmonares é semelhante em todo o mundo e é uma das menores comparadas às demais neoplasias humanas **(Fig. 1.2)**. A sobrevida global em cinco anos varia entre 10 e 20% a partir do momento do diagnóstico, considerando-se todos os graus da doença **(ACS, 2015)**. Como os primeiros estágios da doença geralmente são assintomáticos, os tumores tendem a ser superestadiados no momento do diagnóstico. Esse quadro implica a adoção de tratamentos pouco eficazes, geralmente associados à recorrência da doença **(Tan et al, 2003)**. De fato, a sobrevida em cinco anos para o câncer de pulmão decai em função do estadiamento da doença, chegando menos de 5% para os tumores pulmonares mais avançados **(Fig. 1.2)**.

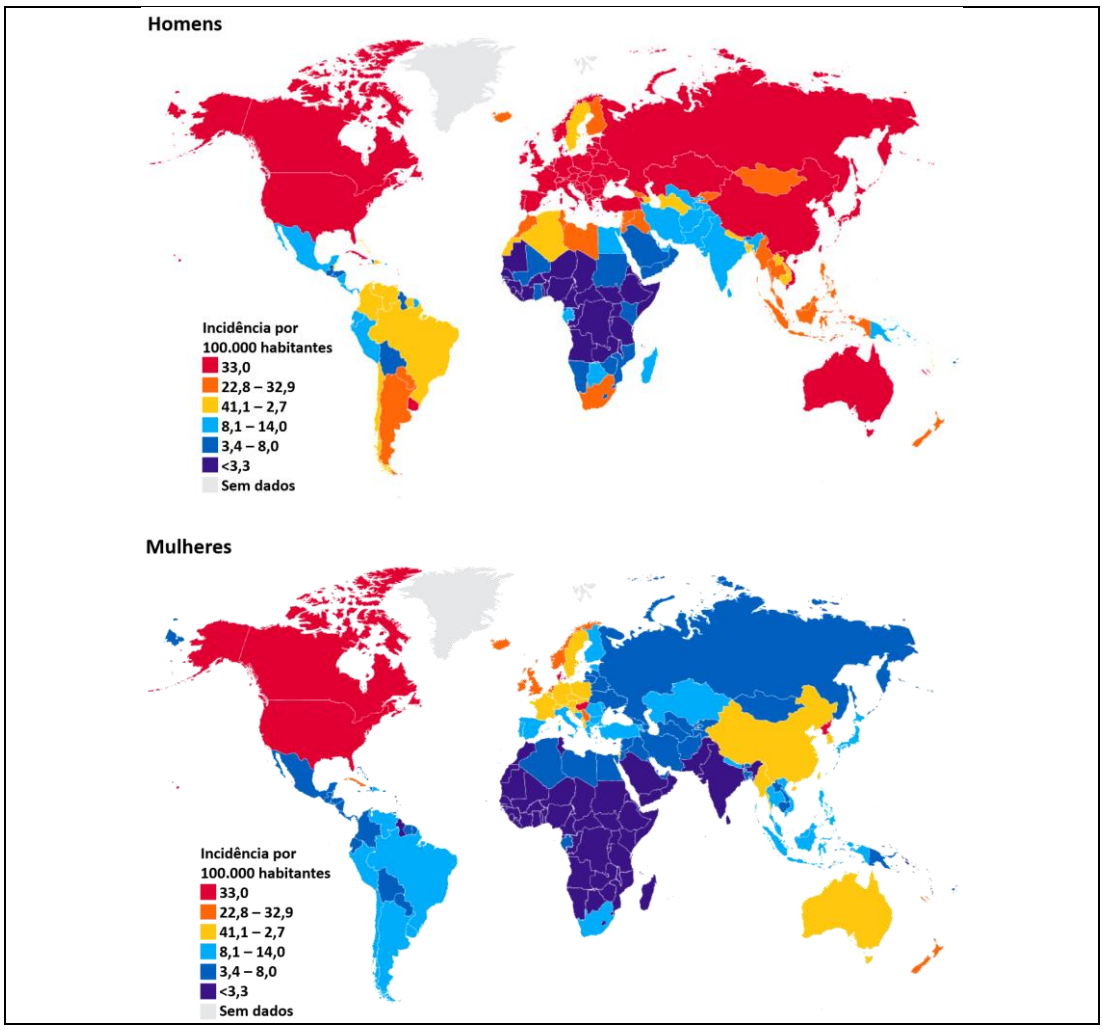


Fig. 1.1. Variação internacional das incidências de neoplasias pulmonares em 2012. Países desenvolvidos, nos quais o consumo de tabaco iniciou-se precocemente, apresentam maior incidência de câncer de pulmão em relação a países subdesenvolvidos, onde o consumo instalou-se mais recentemente. *Modificado de IARC, 2012.*

O câncer de pulmão é classificado histopatologicamente em câncer de pulmão de células pequenas (SCLC, do inglês "*small cell lung cancer*") ou câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC, do inglês "*non-small cell lung cancer*") **(Ramalingam et al, 2011)**. O primeiro é mais invasivo e metastático, sendo de difícil tratamento. O segundo é responsável por 80% dos casos de neoplasias pulmonares **(NCI, 2009)**. Dependendo do tipo e estágio de evolução da doença, os tratamentos incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia e terapias-alvo. Para os estágios iniciais de NSCLC a cirurgia é usualmente o tratamento de escolha, porém, em muitos casos, a quimioterapia combinada à radioterapia é adotada em paralelo ao tratamento cirúrgico **(ACS, 2015)**. Os pacientes em estágios avançados de NSCLC são geralmente submetidos a tratamentos combinados com drogas alvo-dirigidas **(Lord et al, 2002; Simon et al, 2007)**. A quimioterapia sozinha, ou combinada à radioterapia, é geralmente ineficiente no tratamento. Independente do tratamento adotado, o índice de remissão do câncer de pulmão permanece bastante baixo **(NCI, 2009; ACS, 2015)**.

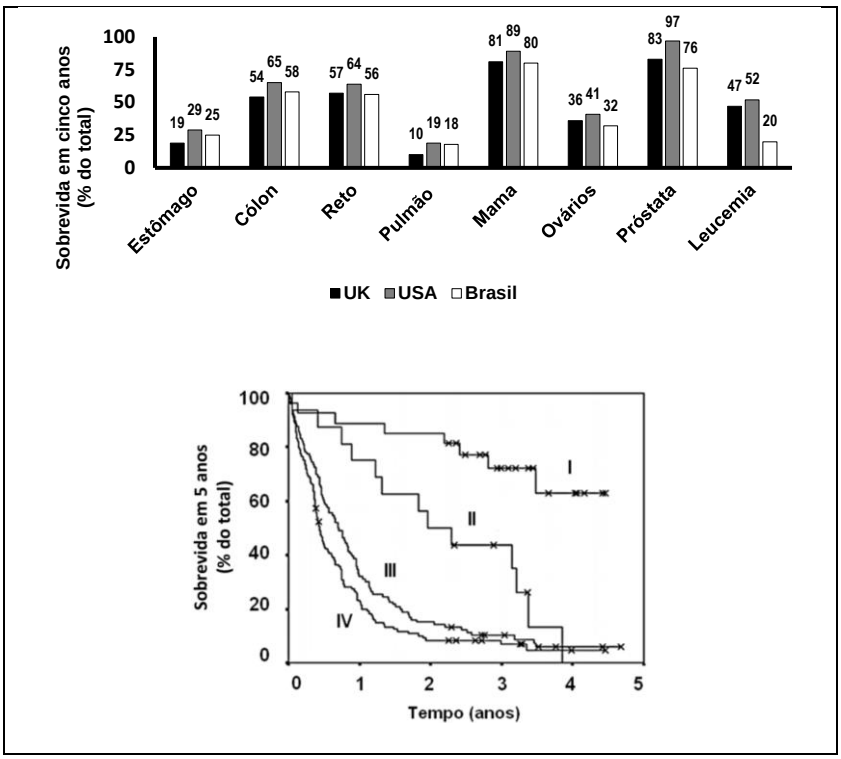


Fig. 1.2. Sobrevida relativa em cinco anos comparando-se diferentes neoplasias ou diferentes estágios do desenvolvimento tumoral pulmonar. ***Acima***. Sobrevida relativa em cinco anos para diversas neoplasias, incluindo o câncer de pulmão, a partir do momento do diagnóstico. A letalidade em cinco anos para o câncer de pulmão é uma das menores em relação a outras neoplasias em todo o mundo, atingindo cerca de 80 a 90%, considerando-se todos os estágios da doença. *Modificado de ACS, 2015.* ***Abaixo***. Sobrevida relativa em cinco anos para os graus variados de câncer de pulmão a partir do momento do diagnóstico. O curso inicial assintomático da doença leva ao diagnostico tardio. Consequentemente, a grande maioria dos tumores é classificada em estágios III ou IV. A letalidade em cinco anos para o câncer de pulmão aumenta em função da evolução tumoral e resistência ao tratamento, atingindo mais de 95% para casos mais graves da doença. *Modificado de Tan et al, 2003.*

Nos últimos anos, um progresso significativo tem sido feito no entendimento dos mecanismos moleculares do câncer de pulmão e múltiplas vias de sinalização que são ativas em NSCLC foram identificadas **(Salgia et al, 1998)**. As modificações moleculares encontradas em tumores pulmonares são mutações pontuais em genes que regulam a sobrevida e a proliferação celulares, tais como em *KRAS*, *BRAF* e *EGFR* **(Sharma et al, 2010)**. De fato, diversos genes já foram descritos como agentes causadores diretos de neoplasias pulmonares **(Fig. 1.3)**. Com a descoberta da etiologia dos processos oncogênicos pulmonares e o estudo detalhado das vias de sinalização que culminam com a transformação celular, diferentes drogas foram desenvolvidas para inibir as vias de sinalização ativadas no câncer de pulmão. Nesse sentido, vários trabalhos foram publicados demonstrando o uso de drogas alvo-dirigidas no tratamento de neoplasias pulmonares. Além disso, muitas drogas que bloqueiam a vascularização tumoral ou interferem na atividade de receptores de fatores de crescimento estão sendo atualmente usadas com sucesso clínico **(Lee et al, 2013; Majem et al, 2013; Morabito et al, 2013)**. Por exemplo, o desenvolvimento de drogas que bloqueiam a atividade de EGFR oncogênica, como o gefitinibe **(Paez et al, 2004)**, ou que inibem a atividade de VEGF, como o bevacizumabe **(Sandler et al,**

2006), ou ainda capazes de inibir a translocação de ALK, como o crizotinibe **(Gerber et al, 2010)**, sozinhas ou em combinação com outras terapias, foram um marco histórico no tratamento do NSCLC, atingindo um sucesso clinico altamente relevante.

Todavia, esses tratamentos beneficiam uma parcela muito pequena dos pacientes, uma vez que estas alterações moleculares não são muito frequentes. Além disso, os tratamentos, embora eficazes em um primeiro momento, são associados com o desenvolvimento de resistência em longo prazo **(Xu et al, 2010; Katayama et al, 2012)**. A maior parte dos pacientes com NSCLC, cerca de 30 a 50% (dependendo do banco de dados de referência), possuem mutações no gene que codifica a GTPase KRAS. Drogas eficientes capazes de bloquear a atividade de KRAS oncogênica no câncer de pulmão beneficiariam uma parcela muito maior dos pacientes acometidos por essa doença. Entretanto, apensar de três décadas de intensos esforços, nenhuma terapia KRAS-dirigida foi eficiente em estudos clínicos. KRAS tem sido, desde então, considerado um alvo "*undruggable"* **(Fig. 1.3) (Friday et al, 2005)**.

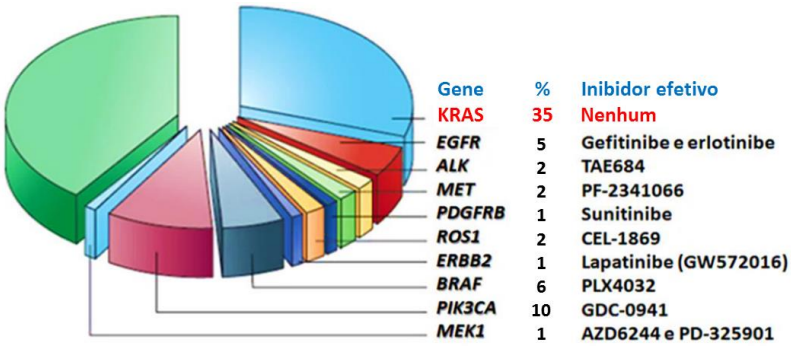


Fig. 1.3. Principais mutações associadas ao desenvolvimento de NSCLC e drogas utilizadas atualmente na clínica. As principais alterações genéticas causalmente relacionadas ao câncer de pulmão são mutações de ponto em genes que codificam proteínas que regulam a sobrevida e a proliferação celulares, como *KRAS*, *PIK3CA*, *BRAF* e *EGFR*. Para a grande maioria das mutações (mas não a maioria dos casos de câncer de pulmão), o entendimento das vias moleculares que culminam com a proliferação e a sobrevida celulares descontroladas tornou possível o desenvolvimento de drogas alvo-dirigidas altamente eficientes no tratamento do câncer de pulmão. Entretanto, a maioria das neoplasias do NSCLC são causadas por mutações de ponto em *KRAS*, para o qual ainda não existem terapias alvo-dirigidas efetivas. *Modificado de Sharma et al, 2010.*

Embora todas as inúmeras falhas passadas tenham diminuído o entusiasmo pela busca de drogas que inibissem diretamente a atividade de RAS oncogênica, sabe-se que o maior sucesso em terapias baseadas na inibição da transdução de sinal foi obtido contra alvos mutacionalmente ativados. Apesar de esta realidade estar ainda um pouco longe de ser alcançada para KRAS, para que novos pacientes possam ser beneficiados com terapias alvo-dirigidas, as vias de sinalização de KRAS que culminam com a proliferação e sobrevida exacerbados no câncer de pulmão precisam ser identificadas.

1.2. A pequena GTPase KRAS

1.2.1. Histórico

KRAS é o membro mais bem estudado e caracterizado de uma família de pequenas GTPases denominas RAS, da qual também fazem parte NRAS e HRAS. Os primeiros genes *RAS* foram identificados durante o estudo de dois vírus causadores de câncer, os vírus dos sarcomas de Harvey e Kirsten **(Harvey et al, 1964; Kirsten et al, 1970; Chang et al, 1982; Malumbres et al, 2003)**. Anos depois, **Der et al (1983)** descreveram uma forma anormal de uma proteína de 21 kDa expressa em linhagens celulares tumorais de cólon e pulmão com alto potencial transformador. Na tentativa de se encontrar genes humanos homólogos aos dos sarcomas de Harvey e Kirsten, em experimentos conduzidos por **Parada et al (1982)**, e posteriormente por **Land et al (1983)**, material genético isolado de células tumorais humanas foi utilizado para transformar NIH/3T3, uma linhagem celular derivada de *Mus musculus* altamente sensível a ensaios de formação de foco mediado pelos vírus dos sarcomas de Harvey e Kirsten **(Jainchill et al, 1969; Andersson et al, 1979; Copeland et al, 1979; Westerman et al, 1996)**. Seus estudos mostraram que todos os focos formados continham fragmentos do gene *HRAS*. Ademais, identificou-se que mutações no códon 12 do mesmo gene eram cruciais para a transformação dos fibroblastos murinos **(Parada et al, 1982; Land et al, 1983, Parada et al, 1984)**. Simultaneamente, **Hall et al (1983)** descobriram o gene *NRAS*, que encontrava-se alterado em neuroblastomas. As mutações nos códons 13 ou 61 também se mostraram fundamentais para a transformação mediada por *KRAS* e *NRAS* **(Shimizu et al, 1983; Newbold, 1984)**. Por fim, com a descoberta de que 30% de todas as neoplasias humanas são causadas por alterações moleculares nos genes *RAS*, essas proteínas têm sido consideradas chaves em processos de transformação celular, o que afeta diretamente a diferenciação, crescimento, quimiotaxia, apoptose, adesão e migração celulares **(Esser et al, 1998; Zuber et al, 2000)**.

1.2.2. Estrutura

KRAS é uma pequena proteína 21 kDa, compartilhando de 82 a 90% de identidade com os demais membros da família, HRAS e NRAS **(Barbacid, 1987)**. *KRAS* codifica duas variantes de *splicing* que resultam da utilização alternativa do éxon 4, gerando extremidades C-terminais diferentes. Os éxons 4A e 4B codificam 39 e 38 aminoácidos, respectivamente. KRAS4A é a isoforma mais semelhante à KRAS retroviral, enquanto que KRAS4B é a isoforma predominantemente expressa em células humanas

(Cox et al, 2014). Todas as proteínas RAS apresentam dois domínios, um domínio G de 166 aminoácidos e cerca de 20 kDa, que se liga a nucleotídeos de guanina, e uma região C-terminal conhecida como *CAAX box*, de cerca de 1 kDa, que sofre modificação pós-traducional. O domínio G contém cinco motivos G que se ligam a trifosfato de guanosina (GTP) ou difosfato de guanosina (GDP) diretamente. O motivo G1, também conhecido como *P-loop*, liga-se ao β-fostato do nucleotídeo de guanina. O motivo G2, também chamado de *Switch* I, contém a treonina 35 que liga o γ-fosfato do GTP. O motivo G3, ou *Switch* II, possui uma sequência DXXGQ. D (aspartato 57) é específico para a ligação da guanina e, portanto, impede a ligação da adenina. Essa função é compartilhada com os motivos G4 e G5. Q (glutamina 61) ativa uma molécula de água catalítica capaz de hidrolisar o GTP a GDP, no sítio ativo de RAS **(Vetter et al, 2001) (Fig. 1.4)**. Os dois motivos *Switch*, G2 (aminoácidos 30-38) e G3 (aminoácidos 60 a 76), são também os responsáveis pela interação de KRAS com proteínas reguladoras, denominadas GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*, ou fatores de troca do nucleotídeo de guanina) e GAPs (*GPTase-activating proteins*, ou proteínas ativadoras de GTPases), respectivamente **(Pai et al, 1989).** *Switch* I e II sofrem alteração conformacional em função da formação do complexo KRAS-GDP ou RAS-GTP, respectivamente **(Cox et al, 2014)**. De fato, a estrutura cristalina de RAS revela que essas proteínas existem em diferentes conformações em virtude da sua capacidade de ligação ao GTP e ao GDP **(Boriack-Sjodin et al, 1998)**. Outros estudos mostram que as conformações estruturais do complexo RAS-GTP e RAS-GDP são também importantes para a sua ligação às GAPs e GEFs, respectivamente **(Margarit et al, 2003)**.

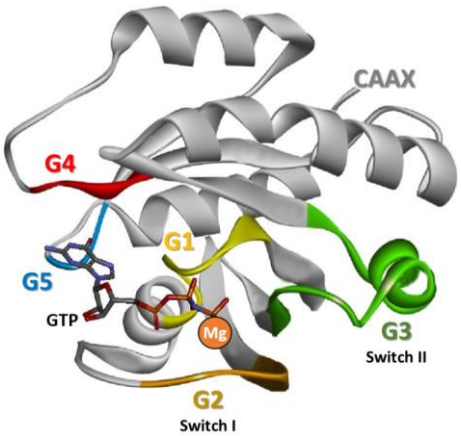


Fig. 1.4. Estrutura tridimensional dos cinco motivos G e domínio C-terminal de KRAS. A proteína KRAS contém um número definido de motivos G funcionais. Múltiplas regiões, incluindo os motivos G1, G3, G4 e G5, participam da ligação do GTP ou GDP. Essa ligação é também estabilizada pela presença de magnésio. *Switch* I (G2) é responsável pela interação com as GAPs e uma série de efetores de RAS, enquanto que *Switch* II (G3) é responsável pela interação com as GEFs. O domínio hipervariante (região C-terminal) contém uma região rica em resíduos de lisina e uma sequência de resíduos de aminoácidos conservados, denominada CAAX, que são importantes para a atividade de KRAS. Primeiro, porque regula a atividade de KRAS, bem como a ativação de efetores desta proteína. Segundo, porque guia uma série de modificações pós-traducionais fundamentais para a localização subcelular de KRAS. *Modificado de Loirand et al, 2013.*

As proteínas RAS são inicialmente sintetizadas como polipeptídeos citosólicos e inativos. A atividade de RAS na transdução de sinais oriundos de receptores associados à membrana plasmática é inteiramente dependente de modificações pós-traducionais da proteína **(Friday et al, 2005)**, que envolvem múltiplos estágios de ganho de hidrofobicidade na extremidade carboxiterminal de RAS **(Fig. 1.5)**.

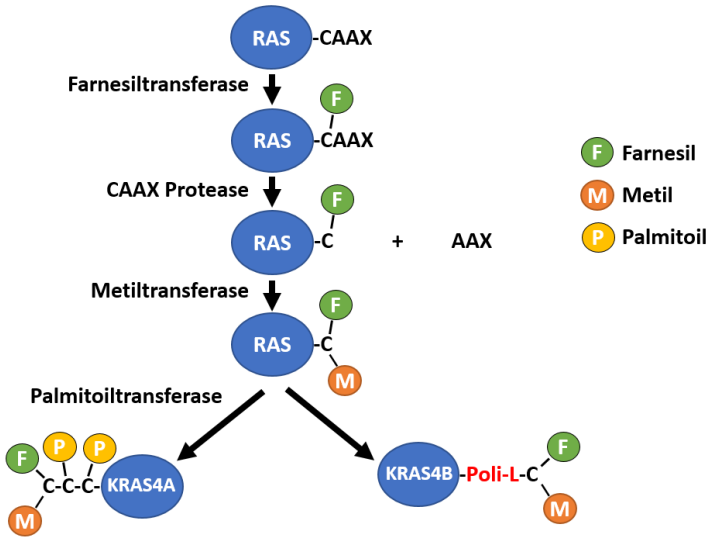


Fig. 1.5. Modificações pós-traducionais de RAS. A extremidade carboxiterminal de RAS é altamente conservada entre todas as proteínas da família. Um motivo CAAX presente nessa região direciona uma sequência de modificações pós-traducionais da proteína. Inicialmente, o resíduo de cisteína em CAAX sofre farnesilação por uma farnesiltransferase, que é crucial para ancoragem de KRAS à membrana. Posteriormente, o tripeptídeo AAX é clivado por uma protease e uma metiltransferase promove a metilação da cisteína remanescente. Além disso, KRAS4B, que possui uma região rica em lisina (Poli-L) na extremidade carboxiterminal, que interage com fosfolipídeos negativos na membrana plasmática. As demais proteínas RAS (KRAS4A, HRAS e NRAS), embora não possuam esta região Poli-L, possuem resíduos de cisteínas adicionais na extremidade carboxiterminal, que sofrem palmitoilação, o que também contribui para a ancoragem à membrana plasmática.

Todas as proteínas RAS possuem um motivo tetrapeptídico CAAX, que é alvo de várias transferases e uma protease. C representa um resíduo invariável de cisteína; A, um aminoácido afilático qualquer (leucina, isoleucina ou valina); e X, uma metionina, serina, leucina ou glutamina **(Cox et al, 2014)**. Inicialmente, uma farnesiltransferase reconhece este motivo tetrapeptídico e insere um substituinte farnesil na cisteína presente em CAAX de RAS **(Schaber et al, 1990)**. Dependendo do aminoácido X terminal de CAAX, RAS pode ser alternativamente geranilgeranilada por uma geranilgeranilase do grupo I (GGT1). Na presença de inibidores da farnesiltransferase, KRAS pode ser também geranilgeranilada por GGT2 **(Moores et al, 1991; Whyte et al, 1997)**. Uma vez farnesilado, o tripeptídeo AAX é clivado pela enzima proteolítica RCE1 **(Trueblood et al, 2000)** e a cisteína remanescente é metilada por ICMT **(Clarke et al, 1992)**. Ademais, todas as proteínas RAS, exceto

KRAS4B, sofrem palmitoilação do grupo SH em resíduos de cisteína próximos à extremidade carboxiterminal, permitindo sua ancoragem à membrana plasmática **(Resh et al, 2004)**. KRAS4B não é palmitoilada, entretanto essa isoforma apresenta uma região rica em resíduos de lisina, que auxiliam na ancoragem da proteína à membrana **(Jackson et al, 1994) (Fig. 1.5)**.

1.2.3. Função e regulação

Embora KRAS apresente grande homologia estrutural em relação às demais proteínas RAS, elas são funcionalmente distintas entre si. Isso é diretamente observado na relação causal entre o desenvolvimento de um grupo de tumores distintos associados a mutações em genes *RAS* específicos **(Mitsuuchi et al, 2002; Grady et al, 2002; Jaffee et al, 2002; Almoguerra et al, 1988)**, o que é em parte explicado pelos diferentes padrões de expressão, processamento pós-traducional, localização subcelular e ativação de efetores distintos entre os membros da família RAS **(Castellano et al, 2011)**.

Uma vez ancorada à membrana plasmática, RAS atua na transdução de sinais. Embora receptores tirosina quinase sejam os mais bem estudados em relação à sua associação com RAS **(Heldin, 1995)**, diversos outros receptores podem se associar funcionalmente a proteínas RAS, tais como integrinas, proteínas G heterotriméricas e receptores de citocinas **(Henning et al, 1998; Parise et al, 2000; Avruch et al, 2001; Liebmann, 2001; Ghobrial et al, 2002; Cantrell, 2003; Kimbara, 2003)**. Os sinais transduzidos por RAS ativam inúmeros efetores moleculares já bem caracterizados, levando ao crescimento, sobrevida, diferenciação e angiogênese **(Friday et al, 2005)**.

As primeiras evidências de que RAS estava envolvida na transdução de sinais veio da observação de que RAS se liga ao GTP e GDP com alta afinidade **(Shih et al, 1980; Shih, 1986; Spiegel, 1987)**. O mecanismo pelo qual RAS é capaz de ligar GTP e GDP e os mecanismos pelos quais isso ocorre é fundamental para o entendimento do seu papel na oncogênese pulmonar.

KRAS, como qualquer GTPase envolvida na transdução de sinais, existe sob duas formas, uma ativa, ligada ao GTP, e uma inativa, ligada ao GDP. A estrita regulação da interconversão entre as duas formas é fundamental para a transdução de sinais. Uma vez que a ativação de KRAS por receptores tirosina quinase, como EGFR, já foi bem estudada e caracterizada **(Heldin, 1995)**, nós a usaremos como exemplo para ilustrar o mecanismo de ativação de KRAS e sua regulação.

A ligação de EGF ao EGFR induz sua dimerização, levando à justaposição dos domínios catalíticos citoplasmáticos com atividade de tirosina quinase **(Lemmon et al, 1994; Flaswinkel et al, 1995)**, em um processo que resulta na autofosforilação cruzada e consequente ativação desse receptor

(Weiss et al, 1997; Sibilia et al, 2007). Uma vez ativado, uma série de proteínas adaptadoras são recrutadas. GRB2, a mais bem estudada e caracterizada das proteínas adaptadoras, interage com outro grupo de proteínas denominado GEFs (fatores de troca do nucleotídeo de guanina, do inglês *"guanine nucleotide exchange factors"*) **(Schlessinger, 2000; Ahmed et al, 2015)**. SOS1 e SOS2, membros de uma família de GEFs, são proteínas fortemente relacionadas que medeiam a ativação RAS pelos receptores do tipo tirosina quinase **(Simon et al, 1993; Vo et al, 2015)**, por meio do reconhecimento e interação com o motivo *Switch* II do complexo RAS-GDP **(Boriack-Sjodin et al, 1998)**. A interação de GEFs com RAS-GDP causa uma alteração conformacional que induz a liberação do GDP do sitio catalítico de RAS. Uma vez vazio, o sitio catalítico de RAS está livre para interagir novamente com GDP ou GTP. RAS selvagem se liga igualmente a nucleotídeos de guanina com afinidade picomolar. Com os níveis citoplasmáticos de GDP e GTP em concentrações milimolares, uma diferença de ordem de grandeza 10^9 faz com que RAS esteja sempre ligada ao seu substrato **(Cox et al, 2014)**. Entretanto, a concentração citoplasmática do GTP é cerca de dez vezes maior que a do GDP e, consequentemente, o equilíbrio químico é deslocado no sentido da formação do complexo ativo RAS-GTP **(Barbacid, 1987)**.

A inativação do complexo RAS-GTP ocorre quando a RAS hidrolisa o GTP a sua forma bifosfatada. Entretanto, a atividade catalítica intrínseca de RAS é ineficiente para essa função. As GAPs (proteínas ativadoras de GTPases, do inglês *"GTPase activating proteins*") **(Scheffzek et al, 1997**) são proteínas que interagem com o complexo RAS-GTP, aumentando a eficiência catalítica de RAS e facilitando a hidrólise de GTP em GDP. NF1 e p120GAP (RASA1) são duas GAPs responsáveis pela regulação negativa da atividade de RAS, auxiliando a hidrólise do GTP. O mecanismo molecular pelo qual as GAPs auxiliam RAS na hidrólise do GTP está representado na Figura 6. O sítio catalítico de RAS apresenta dois resíduos de aminoácidos fundamentais para a catálise enzimática, a glutamina 61 e a tirosina 35, que participam diretamente da hidrólise do GTP, estabilizando-o no sitio ativo. Essa interação, entretanto, é ineficiente para hidrolisar a ligação fosfodiéster entre os fosfatos β e γ do GTP. Quando o complexo RAS-GAP é formado, uma arginina fornecida pela GAP é posicionada no sítio catalítico de RAS e sua interação direta com o γ-fosfato diminui a energia de ativação necessária para a hidrólise do GTP **(Scheffzek et al, 1997)**. Uma vez hidrolisado o nucleotídeo de guanina, RAS torna-se inativa, e um novo clico de ativação e inativação pode iniciar-se **(Fig. 1.6).**

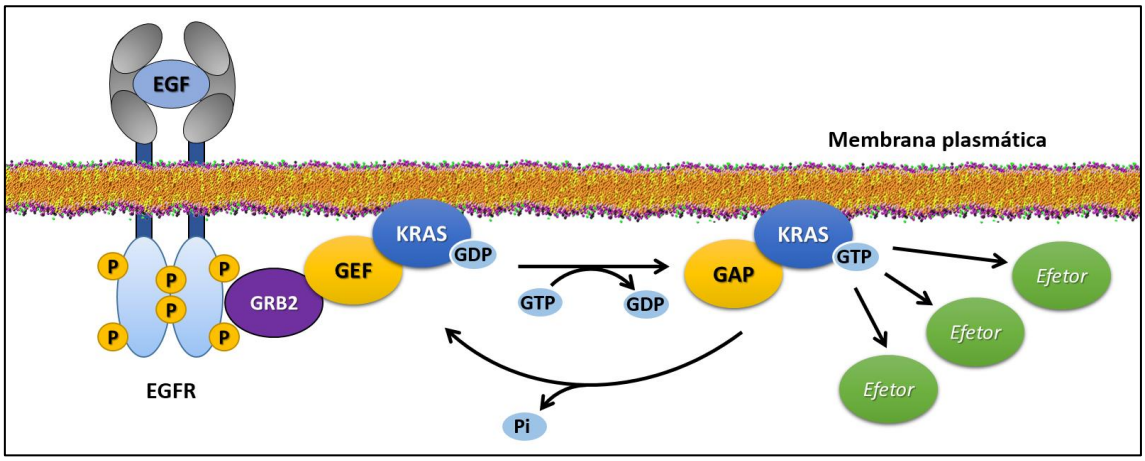


Fig. 1.6. Regulação da atividade de KRAS, exemplificada a partir de um receptor tirosina quinase. Um sinal externo (representado por EGF) é reconhecido pelo receptor de tirosina quinase (representado por EGFR), induzindo sua dimerização e autofosforilação cruzada. Esse processo recruta a proteína acessória GRB2, que interage com as GEFs. Uma vez ativadas, as GEFs reconhecem a forma inativa de KRAS ligada ao GDP, e induzem uma alteração conformacional da proteína que expele o nucleotídeo de guanina do sítio ativo de KRAS. Como a concentração citoplasmática de GTP é maior do que a concentração de GDP, KRAS se liga preferencialmente ao nucleotídeo trifosfatado, tornando-se ativa. A KRAS ativada, por sua vez, recruta efetores *downstream* com funções relacionadas à proliferação e sobrevida celulares. Quando o sinal externo proveniente da interação do EGF com o seu receptor cessa, as GEFs são inativadas e as GAPs passam a ter um papel predominante sobre o reconhecimento de KRAS, desta vez ligada ao GTP. As GAPs introduzem no sitio catalítico de KRAS um terceiro aminoácido essencial à catálise do GTP a GDP. Quando isso acontece, a ativação de efetores mediada por KRAS cessa e um novo ciclo de ativação e inativação pode ser iniciado.

1.2.4. KRAS e câncer

Uma vez que RAS desempenha papel crucial na regulação de efetores de vias de sinalização que levam à maior proliferação e sobrevida celulares, não é estranho que alterações em sua expressão ou atividade estejam relacionadas à tumorigênese. O mecanismo pelo qual o oncogene RAS leva à transformação maligna é baseado em sua capacidade de interação com proteínas regulatórias ou sua capacidade enzimática intrínseca. O motivo G2 (*Switch* I) da extremidade N-terminal de KRAS é fundamental para o reconhecimento de GAPs. Mutações de ponto neste motivo, tais como nos códons 12 ou 13, abolem completamente o reconhecimento do complexo KRAS-GTP pelas GAPs **(Aviel-Ronen et al, 2006)**. Por outro lado, mutações no códon 61, localizado dentro do sítio catalítico de KRAS, não impedem que as GAPs reconheçam e se liguem à KRAS. Entretanto, essas mutações extinguem totalmente a capacidade catalítica de KRAS sobre o GTP **(Friday et al, 2005)**. Independentemente do mecanismo, o GTP não é hidrolisado e KRAS permanece constantemente ativa, enviando sinais aos seus efetores, de modo independente de EGFR ou outros receptores transmembranares associados a KRAS.

De um modo geral, cerca de 30% de todos os tumores humanos sequenciados apresentam mutações ativadoras nos oncogenes *RAS* **(Friday et al, 2005)**. A frequência e a distribuição das

mutações em *RAS* não é uniforme **(Tabela 1.1)**. Cerca de 86% de todos os tumores mediados por *RAS* são causados por mutações pontuais em *KRAS*, seguido por *NRAS* (11%) e mais infrequentemente *HRAS* (3%) **(Ellis et al, 2000; Cox et al, 2014).** O sequenciamento em larga escala de tumores humanos mostra que tumores epiteliais, como o adenocarcinoma pulmonar e o adenocarcinoma de ducto pancreático, são mais propensos a apresentarem mutações em *KRAS*. De fato, 30 a 35% dos adenocarcinomas pulmonares e quase 100% dos adenocarcinomas de ducto pancreático são causados por mutações em *KRAS* **(Ding et al, 2008; Jones et al, 2008; Biankin et al, 2012)**. Mutações em *NRAS* e *HRAS* são raras nesses tumores. Mutações em *NRAS* ocorrem frequentemente em mieloma cutâneo e mieloma múltiplo ao passo que alterações em *HRAS* e *KRAS* são raramente encontradas nesses tumores. Já tumores, como o adenocarcimona pulmonar são comumente oriundos de mutações em *KRAS* e *HRAS*. Outros tumores, entretanto, como o sarcoma, carcinoma ovariano de pequenas células e osteosarcoma, rarissimamente apresentam mutações em *RAS* **(Rochlitz et al, 1989; Rodenhuis et al, 1992; Almoguerra et al, 1998; Watzinger et al, 1999; Cichowski et al, 2001; Tartaglia et al, 2005; Bentiresalj et al, 2006; Wood et al, 2007, Jones et al, 2008; Ding et al, 2008; Ken et al, 2010; Bass et al, 2011; Biankin et al, 2012; Seshagiri et al, 2012; Imielinski et al, 2012; Hodis et al, 2012; Krauthammer et al, 2012; Agrawal et al, 2012; Peifer et al, 2012; Shah et al, 2012; Banerji et al, 2012; Landau et al, 2013; Kandoth et al, 2013; Bolli et al, 2014; Lohr et al, 2014; Chen et al, 2014; Ramos et al, 2014, Witkowski et al, 2014; Wang et al, 2015)**.

Tabela 1.1. Distribuição e frequência de mutações em RAS em tumores humanos. *Modificado de* **Friday et al, 2005.**

Câncer	***KRAS***	***NRAS***	***HRAS***	***RAS* total**
Adenocarcinoma de ducto pancreático	97,7	0,0	0,0	97,7
Adenocarcinoma coloretal	44,7	7,5	0,0	52,2
Mioloma múltiplo	22,8	19,9	0,0	42,6
Adenocarcinoma pulmonar	30,9	0,9	0,3	32,2
Carcinoma de colo uterino	21,4	3,6	0,4	24,6
Adenocarcinoma de estômago	11,4	0,9	0,0	12,3
Carcinoma de células escamosas pulmonares	2,2	0,0	2,2	4,4
Carcinoma pulmonar de células pequenas	1,4	0,0	1,4	2,8
Carcinoma da tireoide	1,0	8,5	3,5	12,5
Melanoma cutâneo	0,8	27,6	1,0	29,1
Carcinoma de mama invasivo	0,7	0,4	0,3	1,4
Sarcoma	0,0	0,0	0,0	0,0
Carcinoma de ovário de pequenas células	0,0	0,0	0,0	0,0
Osteosarcoma	0,0	0,0	0,0	0,0

As principais alterações genéticas encontradas em tumores associados a *RAS* são mutações de ponto, 99% delas encontradas nos códons G12, G13 e Q61. Mutações no códon G12 são predominantemente encontradas em *KRAS,* ao passo que mutações no códon Q61 são particularmente raras nessa isoforma . Por outro lado, em *NRAS* as principais alterações ocorrem no códon Q61. Já *HRAS* possui uma distribuição relativamente uniforme da frequência de distribuição de mutações entre tais códons **(Fig. 1.7A).** Existem também diferenças em relação à frequência relativa dessas mutações entre os diferentes tipos de cânceres. G12 é o códon mais frequentemente mutado em tumores humanos. De fato, 76% dos carcinomas coloretais humanos mediados por *RAS* são causados por mutações em G12. Nos adenocarcinomas pulmonar e de ducto pancreático humanos, essa frequência chega a 91 e 94%, respectivamente **(Fig. 1.7B)**. Outras diferenças podem ser encontradas também em relação às substituições mais frequentemente encontradas no códon G12 em função do tipo do tumor. Em adenocarcinoma pulmonar humano, as mutações G12V, G12D e G12C são as mais frequentes. Por outro lado, no carcinoma coloretal ou adenocarcinoma de ducto pancreático as substituições G12D e G12V são muito frequentes, ao passo que substituições G12C ocorrem mais raramente. **(Fig. 1.7C) (Jones et al, 2008; Ken et al, 2010; Bass et al, 2011; Hodis et al, 2012; Krauthammer et al, 2012; Kandoth et al, 2013; Cox et al, 2014; Varsan et al, 2014; Wang et al, 2015)**.

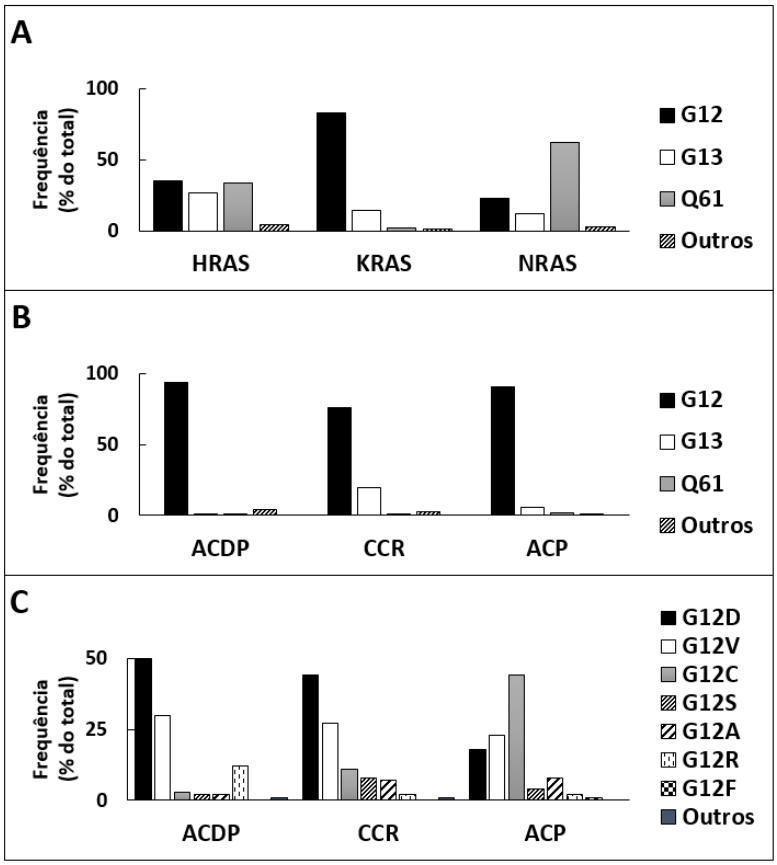


Fig. 1.7. Frequência das principais mutações em *RAS*. (A) Frequência de mutação dos três códons mais frequentemente alterados em *RAS*, G12, G13 e Q61, mostrando que G12 é o códon mais comumente alterado em *KRAS*, enquanto que Q61 ocorre mais comumente em *NRAS*. *HRAS* apresenta uma distribuição de mutações aparentemente uniforme entre os códons geralmente mutados. **(B)** Frequência das mutações de *KRAS* em três tipos de tumores humanos distintos, adenocarcinoma de ducto pancreático (ACDP), carcinoma coloretal (CCR) e adenocarcinoma pulmonar (ACP), mostrando que G12 é o principal códon mutado em *KRAS* em todos os casos. **(C)** Frequência das principais mutações de ponto associadas ao códon G12 em *KRAS*, nos mesmos três tumores. As alterações G12D e G12V são as mais largamente encontradas em *KRAS* em ACDP e CCR. A alteração G12C é a mais frequente em ACP. *Modificado de Cox et al, 2014; Varsan et al, 2014.*

Não apenas mutações de ponto em *RAS* estão relacionadas ao desenvolvimento tumoral. Cerca de 40% dos adenocarcinomas de esôfago apresentam amplificação do gene RAS **(Galiana et al, 1995)**, enquanto que a surperexpressão de *KRAS* selvagem pode por si só induzir transformação maligna **(Friday et al, 2005)**.

Independentemente do mecanismo, porém, não existem dúvidas de que alterações da expressão ou atividade de *KRAS* sejam um evento causal no desenvolvimento de tumores humanos. Primeiro, *KRAS* foi inicialmente descrita como o agente transformador do vírus de sarcoma Kirsten, **(Der et al, 1982)**. Segundo, a expressão da forma ativa de *KRAS* é suficiente para induzir transformação maligna e modelos animais desenhados para desenvolverem tumores mediados por *KRAS* tem demonstrado a potente atividade oncogênica de KRAS mutante **(Fisher et al, 2001; Jackson et al, 2001; Braun et al, 2003; Brembeck et al, 2003; Caulin et al, 2004; Chan et al, 2004; Tuveson et al, 2004; Vitale-Cross et al, 2004; Raimond et al, 2006; Bassères et al, 2010)**. Terceiro, consistente com

a necessidade de alterações genéticas adicionais para cooperar com *KRAS* mutante na oncogênese, a perda de função de supressores tumorais, como *TP53*, *LKB1* e *APC*, juntamente com o ganho de função de *KRAS*, aumenta a formação e a progressão tumoral **(Hingorani et al, 2005; Ji et al, 2007; Haigis et al, 2008)**. Quarto, existem consideráveis evidências científicas de que a expressão continuada de *KRAS* mutante é necessária para a manutenção de tumores, uma vez que a supressão de *KRAS* por interferência de RNA reduz o crescimento *in vitro* e *in vivo* de linhagens tumorais positivas para mutações em *KRAS* (**Shirasawa et al, 1993; Bossù et al, 2000; Brummelkamp et al, 2002; Lim et al, 2005; Fleming et al, 2005; Singh et al, 2009; Santos et al, 2016)**. Similarmente, em modelos animais geneticamente modificados para expressar *KRAS* oncogênica induzivelmente, a inibição da expressão de *KRAS* leva à regressão tumoral **(Chin et al, 1999; Fisher et al, 2001; Collins et al, 2012; Kwong et al, 2012; Ying et al, 2012)**. Quinto, a alta frequência de mutações em *KRAS* em um amplo espectro de neoplasias humanas sugere que esta proteína desempenha um papel central na transformação maligna **(Puig et al, 2000; Arvanitakis et al, 2004; Wood et al, 2007, Jones et al, 2008; Ding et al, 2008; Ken et al, 2010; Bass et al, 2011; Biankin et al, 2012; Seshagiri et al, 2012; Imielinski et al, 2012; Hodis et al, 2012; Krauthammer et al, 2012; Agrawal et al, 2012; Peifer et al, 2012; Shah et al, 2012; Banerji et al, 2012; Landau et al, 2013; Kandoth et al, 2013; Bolli et al, 2014; Lohr et al, 2014; Chen et al, 2014; Ramos et al, 2014, Witkowski et al, 2014; Wang et al, 2015).**

1.2.5. KRAS como alvo terapêutico

KRAS regula diversas e complexas vias de sinalização celulares importantes para o crescimento, proliferação, ciclo celular, angiogênese, migração e resistência à apoptose. Alterações da atividade e/ou expressão de KRAS são, portanto, eventos chave da tumorigenicidade e manutenção tumoral. Sendo assim, o bloqueio direto da atividade e/ou expressão de KRAS oncogênica seria, a princípio, uma estratégia racional para o desenvolvimento de terapias alvo-dirigidas. Como explicado adiante, apesar de trinta anos de esforços desde o seu descobrimento, devido à inabilidade de se inibir diretamente KRAS, terapias KRAS-dirigidas fracassaram em estudos clínicos. Outras abordagens, portanto, buscam inibir indiretamente a atividade de KRAS oncogênica. Essas estratégias incluem a inibição de modificações pós-traducionais, inibidores de vias de sinalização e inibidores de genes de interação sintética letal **(Adjei, 2008) (Fig. 1.8)**.

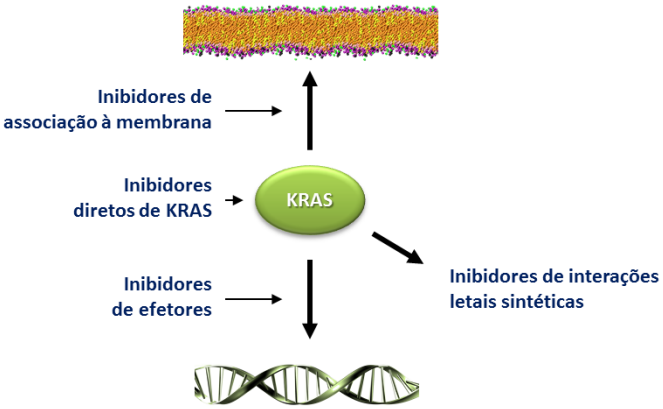


Fig. 1.8. Abordagens no desenvolvimento de inibidores farmacológicos diretos ou indiretos de KRAS oncogênica. As principais estratégias terapêuticas contra tumores mediados por *KRAS* incluem a busca pela inibição direta da proteína mutante e a aplicação de tecnologias de *high-throughput screening* para a identificação de genes com atividade sintética letal, ambas em ensaios pré-clínicos. Outras abordagens incluem a inibição de modificações pós-traducionais de KRAS e inibidores de efetores *downstream* de KRAS, todos já em fase de ensaios clínicos.

1.2.5.1. Inibição direta de KRAS

A inibição direta de KRAS tem sido considerada uma missão quase impossível. Embora algumas abordagens computacionais tenham identificado sítios de ligação em KRAS, eles não parecem conferir estabilidade de ligação a pequenas moléculas candidatas **(Grant et al, 2011; Buhrman et al, 2011; Wang et al, 2012; Chakrabarti et al, 2016)**. A seguir, sumarizamos as principais abordagens de inibição direta de RAS e justificamos os motivos pelos quais fracassaram em estudos pré-clínicos.

1.2.5.1.1. Inibidores competitivos análogos de GDP

Os primeiros inibidores reportados desse tipo, derivados do SCH-53239 (4-(hidroxilamino)-N-{2-[(naftalen-2-il)oxi]etil}benzeno-1-sulfonamida), foram desenhados para competir com GDP pelo sítio de ligação de RAS. Entretanto, as formas solúveis utilizadas em ensaios pré-clínicos ligavam-se ao *Switch* II, em vez do sítio catalítico. Outras alterações moleculares nos mesmos compostos tornou possível o desenvolvimento de inibidores capazes de se ligar ao sítio ativo, competindo com GDP e inibindo o crescimento celular dependente de RAS. Entretanto, todos os compostos dessa família eram derivados de hidroxilamina, crítica para sua atividade antitumoral, e, entretanto, extremamente tóxica e metabolicamente instável **(Taveras et al, 1997; Peri et al, 2005)**.

1.2.5.1.2. Inibidores de GEFs

GEFs regulam positivamente o ciclo RAS-GDP/RAS-GTP, facilitando a dissociação do complexo inativo RAS/GDP **(Schlessinger, 2000; Ahmed et al, 2015)**. Uma vez que essa regulação é dependente da interação das GEFs com o motivo regulatório *Switch* II/G3, o primeiro inibidor de GEF foi um peptídeo projetado para ligar-se a esta região no complexo RAS/GDP **(Patgiri et al, 2011)**. Embora este peptídeo fosse, de fato, capaz de impedir a ativação de RAS e bloquear a sinalização da via ERK/MAPK, sua baixa potência parece inviabilizar a continuidade dos estudos pré-clínicos **(Bearz et al, 2011; Chang et al, 2013; Cox et al, 2014)**. Vários outros inibidores da associação entre RAS e GEFs, como DCAI (1-(4,6-dicloro-2-metil-2,3-dihidro-1H-indol-3-il)metanamina) e seus análogos foram desenhados para impedir a ligação entre RAS e SOS **(Maurer et al, 2012; Sun et al, 2012)**. Entretanto, todos esses compostos ligam-se fracamente a RAS, com um IC_{50} = 340 µM, o que é um obstáculo muito grande para o uso de tais compostos em estudos clínicos.

1.2.5.1.3. Inibidores da formação dos complexos RAS/RAF e RAS/PI3K

Peptídeos cíclicos têm sido largamente estudados por seu grande potencial como agentes terapêuticos. Embora as membranas celulares sejam geralmente impermeáveis a esses compostos, estudos recentes demonstraram que o peptídeo cíclico FΦRRRRQ (onde Φ representa L-2-naftilalanina) é capaz de permear facilmente a membrana por interação direta e internalização lipídica **(Qian et al, 2013; Qian et al, 2014)**. Mais importante, demonstrou-se que esse peptídeo é capaz de ligar-se a domínios efetores de KRAS, impedindo a ligação de RAF e PI3K e, consequentemente, inibindo a fosforilação de AKT e MEK **(Trinh et al, 2016)**. Entretanto, esses estudos são muito recentes e pouco se sabe sobre a atividade *in vitro* e *in vivo* destes compostos.

Outros compostos, como Kobe 0065 (N-(3-cloro-4-metilfenil)-2-[2,6-dinitro-4-(trifluorometil)fenil]hidrazina-1-carbotioamida) e seus derivados, mostraram-se eficientes na redução da fosforilação de efetores da via RAF, como MEK, ERK e AKT, por bloqueio da interação RAS/RAF. Estudos *in vitro* mostraram que esses compostos eram capazes de inibir a formação de colônias e o crescimento independente de ancoragem em fibroblastos de *Mus musculus* geneticamente modificados para a expressão de $KRAS^{G12V}$ oncogênica. Por outro lado, a presença de um substituinte carbotioamídico, altamente citotóxico, não permitiu a continuidade dos estudos com esses compostos **(Shima et al, 2013)**. Todavia, esses compostos podem servir de base para o desenvolvimento de análogos moleculares menos tóxicos, capazes de inibir a oncogenicidade mediada por *KRAS*.

Por fim, outros compostos desenhados para inibir a ligação de RAS a efetores, como os derivados do sulindac (ácido {(1Z)-5-fluor-2-metil-1-[4-(metilsulfinil)benzilideno]-1H-indeno-3-il} acético), mostraram-se eficientes na inibição do complexo RAS/RAF e redução da fosforilação de ERK **(Herrmann et al, 1998; Li et al, 2013)**. Apesar desses compostos inibirem a proliferação e invasão de células transformadas por *KRAS* **(Karaguni et al, 2002)**, acredita-se que o fracasso desses inibidores seja devido a efeitos *off-target* ainda desconhecidos **(Cox et al, 2014)**.

1.2.5.1.4. Inibidores específicos de KRAS oncogênica.

A busca por inibidores específicos de KRAS mutante é uma estratégia terapêutica muito interessante, uma vez que minimiza os efeitos tóxicos desses inibidores em células não tumorais. Recentemente foi descrito um grupo de moléculas capazes de se ligar especificamente a RAS^{G12C}, uma forma mutada de RAS comumente encontrada em NSCLC **(Cox et al, 2014; Wang et al, 2015)**, e impedir a formação do complexo RAS/SOS e a ativação de BRAF e CRAF **(Ostrem et al, 2013)**. Outros trabalhos mostram que SML8731, um análogo de GDP, é também capaz de ligar-se especificamente a $KRAS^{G12C}$ no sítio de ligação do nucleotídeo de guanina. Embora a afinidade de GTP ou GDP pelo sítio ativo de KRAS seja de ordem picomolar, SML8731 liga-se covalentemente nesta região, impedindo a ativação de KRAS **(Burns et al, 2014)**. Embora promissores, inibidores específicos para $KRAS^{G12C}$ beneficiariam apenas uma parcela de pacientes portadores de câncer de pulmão mediado por *KRAS*. Além disso, tais estudos são muito recentes e nada se sabe sobre os efeitos clínicos desses inibidores.

A inibição específica de KRAS também foi estudada por meio do seu silenciamento com siRNAs específicos. **Brummelkamp et al (2002)** desenvolveram um vetor que mediava a supressão de KRAS por meio interferência de RNA. Usando modelos celulares expressando estável e especificamente $KRAS^{G12V}$, observou-se que a perda de função específica de $KRAS^{G12V}$ levava ao menor crescimento independente de ancoragem e tumorigenicidade, indicando que o *delivery* viral de siRNAs poderia ser utilizado como terapia alvo-específica para reverter o fenótipo oncogênico de células tumorais**.** Entretanto, um desafio grande a ser alcançado é garantir o endereçamento correto do siRNA às células tumorais *in vivo*. Infelizmente, até hoje não existem drogas baseadas em siRNAs alvo-específicos em pesquisa clínica.

1.2.5.2. Inibidores de modificações pós-traducionais de RAS

A função de KRAS é totalmente dependente de sua localização celular junto à membrana plasmática **(Friday et al, 2005)**. Uma vez que todas as proteínas RAS sofrem modificação pós-traducional de múltiplas etapas, envolvendo diversas transferases e proteases **(Schaber et al, 1990; Moores et al, 1991; Clarke et al, 1992; Jackson et al, 1994; Whyte et al, 1997; Trueblood et al, 2000; Resh et al, 2004)**, várias foram as abordagens para impedir a atividade de KRAS por meio da inibição da sua ancoragem à membrana.

1.2.5.2.1. Inibidores da farnesiltransferase e geranilgeraniltransferase

A farnesilação é a primeira etapa do processamento pós-traducional de KRAS. Vários estudos já demonstraram o uso eficiente de inibidores da farnesiltransferase em modelos celulares induzidos por RAS **(Norman, 2002; Haluska et al, 2002; Adjei, 2003; Sebti, 2003; Johnson et al, 2004; Le Moulec et al, 2009; Chen et al, 2013; Cox et al, 2015)**. R115777 **(Gunning et al, 2003)** e tipifarnibe **(End et al, 2001)** mostraram-se eficientes na redução de tumores *in vivo*. Por outro lado, FTI-276, um peptidomimético do domínio C-terminal de KRAS4B, reduziu o crescimento de fibroblastos de *Mus musculus*, geneticamente modificados para o ganho de função de *KRAS* oncogênica, além de reduzir a formação de tumores *in vivo* **(Sun et al, 1995)**. Entretanto, todos esses inibidores falharam em estudos clínicos, mostrando pouca ou nenhuma atividade antitumoral **(Rao et al, 2004; van Cutsem et al, 2004)**. A explicação para o fracasso clínico desses inibidores é que na presença de inibidores da farnesiltransferase, KRAS e NRAS podem ser alternativamente geranilgeraniladas por geranilgeraniltransferases do grupo II (GGT2) **(Moores et al, 1991; Whyte et al, 1997)**.

Para contornar o problema da isoprenilação alternativa de KRAS e NRAS, uma segunda estratégia terapêutica abrangeu o uso combinado de inibidores da farnesiltransferase e geranilgeranilases. De fato, o uso combinado dessas drogas reduziu a atividade antitumoral de RAS *in vitro* **(Lobell et al, 2002)** e obteve sucesso em ensaios pré-clínicos **(Sun et al, 1998)**. Entretanto, durante os ensaios clínicos observou-se que o uso combinado desses inibidores induzia graves efeitos sistêmicos e cardiotóxicos. Isso é grandemente explicado pelo fato de que farnesiltransferases e geranilgeranilases possuem cerca de 300 substratos distintos já identificados **(BRENDA Database)** e a inibição conjunta do processamento pós-traducional de diversas outras proteínas, que dependem destas

enzimas para associarem-se à membrana, é extremamente deletério **(Britten et al, 2001; Berndt et al, 2011)**.

Apesar do fracasso com o uso de inibidores do processamento pós-traducional de KRAS, outros estudos mostraram que salirasibe, um análogo molecular de S-farnesilcisteína do domínio C-terminal de KRAS, apresentou resultados positivos em ensaios pré-clínicos, reduzindo a associação de KRAS à membrana e diminuindo a sinalização de efetores *in vitro* **(Gana-Weisz et al, 1997)** e, mais importante, reduzindo o desenvolvimento tumoral *in vivo* **(Haklai et al, 2007)**. Recentemente, o uso combinado de salirasibe e gencitabina foi submetido a estudos clínicos para o tratamento de pacientes com adenocarcinoma pancreático **(Laheru et al, 2012)**. Entretanto, o pequeno número de pacientes submetidos ao estudo, associado à falta de outros ensaios clínicos, não nos permite ainda determinar a eficácia de salirasibe no tratamento de tumores mediados por KRAS oncogênica.

1.2.5.2.2. Inibidores de RCE1 e ICMT

A segunda etapa do processamento pós-traducional de KRAS é a clivagem proteolítica do tripeptídeo AAX e a metilação da cisteína C-terminal pelas enzimas RCE1 e ICMT **(Trueblood et al, 2000)**. Wahlstrom e colaboradores demonstraram que, em modelos de células hematopoiéticas de camundongo, a expressão de $KRAS^{G12D}$ associada à inibição de ICMT reduz a transformação mediada por *KRAS* **(Wahlstrom et al, 2008)**; por outro lado, a inibição de RCE1, nos mesmos modelos experimentais, piora o distúrbio mieloproliferativo **(Wahlstrom et al, 2007)**. Essas enzimas, entretanto, possuem dezenas de substratos descritos **(BRENDA Database)** e sua inibição afeta inúmeras vias particulares, que culminam com respostas celulares distintas. Outros inibidores de RCE1 **(Manandhar et al, 2007; Mohammed et al, 2016)** e ICMT **(Majmudar et al, 2012; Lau et al, 2014)** já foram descritos, mas a falta de estudos clínicos não nos permite ainda determinar a eficácia de tais abordagens terapêuticas.

1.2.5.2.3. Inibidores da palmitoiltransferase

A palmitoilação é a última etapa do processamento pós-traducional de HRAS, NRAS e KRAS4A **(Resh et al, 2004)**, mas não KRAS4B **(Jackson et al, 1994).** Vários estudos mostram que a palmitoilação de RAS é essencial para o seu pontencial oncogênico **(Chiu et al, 2002; Cuiffo et al, 2010; Brock et al, 2015; Zhao et al, 2015)**. De fato, estudes recentes mostram que a inibição do ciclo palmitoilacao/depalmitoilação seletivamente reduz o crescimento de células hematopoiéticas expressando *NRAS* oncogênica **(Xu et al, 2012)**. De qualquer forma, como a quase totalidade dos tumores humanos mediados por *RAS* são causados por mutações em *KRAS4B* **(Cox et al, 2014),** essas abordagens terapêuticas beneficiariam apenas uma pequena parcela dos pacientes portadores de tumores mediados por *RAS*.

1.2.5.3. Inibidores de efetores de sinalização

Todas as tentativas de inibição direta da atividade oncogênica ou expressão de KRAS falharam clinicamente, e esta proteína tem sido considerada como um alvo *undruggable* **(Cox et al, 2012)**. Por esse motivo, uma abordagem alternativa, por meio da identificação de alvos *downstream* de KRAS cuja inibição seja capaz de reverter a oncogenicidade mediada por *KRAS*, tem sido largamente investigada **(Friday et al, 2005; Alvarado et al, 2007; Baines et al, 2011).** O entendimento mais amplo e detalhado das vias ativadas por *KRAS* poderia servir de fundamentação teórica para o desenvolvimento de novas terapias-alvo, mais seguras e eficientes na oncologia clínica. De fato, inúmeros efetores já foram identificados **(Vigil et al, 2010)**. Os efetores mais bem estudados e explorados como alvos terapêuticos indiretos de KRAS incluem as serina-treonina quinases ARAF, BRAF e CRAF, cuja via culmina com a ativação de ERK **(Friday et al, 2005)**, proteínas da via de p110 PI3K, incluindo AKT e mTOR **(Gupta et al, 2007; Castellano et al, 2013)**, e RalGEFs **(Bodemann et al, 2008; Neel et al, 2011)**. A **Fig. 1.9** mostra duas vias canônicas de RAS, RAS/RAF/MEK/ERK e RAS/PI3K/AKT/MTOR/S6K, e as principais terapias alvo-dirigidas contra essas vias, atualmente em estudos clínicos.

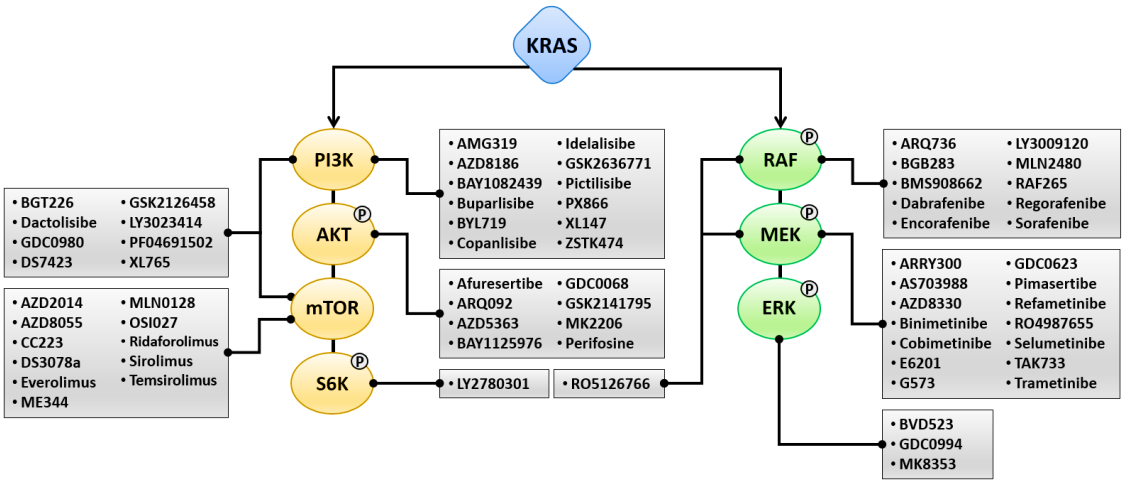


Fig. 1.9. Inibidores de efetores de RAS em estudos clínicos. Os efetores mais bem estudados e caracterizados de KRAS incluem as proteínas das vias PI3K/AKT/mTOR/S6K, RAF/MEK/ERK e RalGEFs. Atualmente, inúmeros inibidores das quinases da via PI3K e RAF estão sendo submetidos a ensaios clínicos. *Modificado de Cox et al, 2014.*

Os inibidores diretos de RAF incluem sorafenibe, vemurafenib e dabrafenibe. Sorafenibe, embora tenha sido inicialmente desenvolvido para bloquear da atividade de RAF, bloqueia também tirosina-quinases envolvidas na angiogênese, sendo sua atividade antitumoral devida, sobretudo, a este bloqueio **(Wilhelm et al, 2004; Erdem et al, 2012)**. Vemurafenibe e dabrafenibe induzem menor fosforilação de proteínas *downstream* de RAF, como ERK e MEK, e são atualmente utilizados no tratamento de pacientes portadores de melanoma metastático induzido por *BRAF* **(Litio et al, 2013; Shelledy et al, 2015; Tran et al, 2015; Vennepureddy et al, 2016)**. Entrentanto, em tumores induzidos por *RAS*, o efeito é contrário, e a maior fosforilação de ERK e MEK é observada **(Hatzivassiliou et al, 2010; Heidon et al, 2010; Poulikakos et al, 2010; Roskoski, 2015)**, o que é devido ao fato de que, dependendo do contexto tumoral, esses compostos induzem dimerização de RAF, ativando-o **(Oberholzer et al, 2012; Su et al, 2012)**.

Trametinibe é um inibidor não ATP-competitivo, direto e altamente seletivo de MEK1 e MEK2, aprovado para uso clínico em pacientes com melanoma metastático induzido por *BRAF* **(Atkinson, 2015; Schick et al, 2015)**. Entretanto, o uso de trametinibe em modelos celulares transformados por *KRAS* produz apenas efeitos parciais na redução de tumores xenográficos **(Engelman et al, 2008; Stinchcombe et al, 2014)**. Isso ocorre porque, mesmo na presença de inibidores farmacológicos, um mecanismo de feedback de MEK induz sua fosforilação por RAF, ativando-o **(Hatzivassiliou et al, 2013)**. Cobimetinibe e seus análogos farmacológicos, por outro lado, bloqueiam este mecanismo de *feedback* e são mais eficientes na redução de tumores mediados por

KRAS **(Ishii et al, 2013)**. Entretanto, todos esses inibidores ainda não foram aprovados para uso clínico em pacientes portadores de câncer de pulmão induzido por *KRAS*.

Tumores ativados por *KRAS* mostram frequentemente uma correlação com baixos níveis de expressão de PTEN, um supressor de tumor da via da PI3K, que é regulada por KRAS. Ademais, estudos recentes mostram a importância desta via na oncogenicidade mediada por *KRAS* **(Lim et al, 2005; Cooper et al, 2013)**. Por este motivo, esta via tem sido largamente estudada na busca de efetores cuja inibição reduza a oncogenicidade mediada por *KRAS*. Atualmente, existem mais de 50 inibidores descritos diretos e indiretos de PI3K **(Massacesi et al, 2016)**. Buparlisibe é um inibidor de pan-PI3K que tem se mostrado muito seguro e eficaz na redução de tumores de mama em ensaios pré-clínicos **(Geuna et al, 2015)**. Por outro lado, idelalisibe é um inibidor seletivo de PI3Kδ altamente eficaz no tratamento da leucemia linfocítica crônica (LLC) **(Shah et al, 2015)**. Entretanto, como monoterapia, esses inibidores fracassaram na redução da formação de tumores mediados por *KRAS* **(Cox et al, 2014)**. Estudos em modelos animais mostram que o uso combinado de inibidores de PI3K e ERK-MAPK são mais promissores (**Engelman et al, 2008**). Consequentemente, inúmeros ensaios clínicos de inibição combinada das vias PI3K e RAF estão em andamento **(Britten et al, 2013)**.

O terceiro grupo de efetores de RAS mais bem caracterizados são as RalGEFs. Essas proteínas já foram demonstradas como importantes efetores de KRAS, necessárias ao crescimento e metástase tumorais **(Kashatus, 2013; Györffy et al, 2015; Shirakawa et al, 2015).** De fato, a supressão da expressão de RGL2 reduz o crescimento celular *in vitro* **(Vigil et al, 2012)** e camundongos transgênicos deficientes em RalGDS apresentam menor formação de tumores induzidos por *HRAS* **(González-Garcia et al, 2005)**. Além disso, a inibição dual de RALA e RALB reduz a formação de tumores induzidos por *RAS* **(Peschard et al, 2012)**. Recentemente, pela primeira vez foi descrita uma série de inibidores não competitivos altamente seletivos de RAL e capazes de bloquear a atividade tumoral de *KRAS* em células pulmonares **(Yan et al, 2015)**. Embora promissores, até hoje não existem inibidores de RalGEFs em estudos clínicos e pouco se sabe sobre a segurança e eficácia de tais abordagens terapêuticas.

1.2.5.4. Inibidores de genes de interação letal sintética

Letalidade sintética é o fenômeno através do qual a alteração da expressão ou atividade em um de dois diferentes genes não causa morte celular, mas a alteração em ambos, sim **(Brough et al, 2011; Liu, 2013)**. Em tumores, a primeira alteração é essencialmente a mutação-chave do processo oncogênico. A segunda alteração é uma perturbação celular induzida por um ou mais inibidores combinados capazes de induzir morte apenas nestas células tumorais, não havendo nenhum efeito sobre células não tumorais **(Paul et al, 2014)**. Um exemplo muito bem-sucedido dessa estratégia terapêutica é o uso combinado de inibidores de mTOR e VEGF que afetam vias de sinalização de *HIF1α* em carcinomas renais **(Patel, 2006)**. Essa estratégia é relevante, sobretudo, no caso de oncogenes considerados *undruggable*, como *KRAS* **(Vasan et al, 2014)**. Técnicas de triagem em larga escala por interferência de RNA (*high-throughput RNAi screening*) tem facilitado a busca de novos alvos que, quando deletados, são sinteticamente letais com *KRAS* oncogênica **(Fig. 1.10)**. Isso tornou possível a identificação de inúmeros potenciais alvos terapêuticos indiretos da KRAS oncogênica. Em geral, os genes de interação sintética letal regulam vias que cooperam com RAS na transformação maligna, como TAK1 e TBK1, que medeiam sinais se sobrevida induzidos por citocinas **(Barbie et al, 2009; Kim et al, 2013; Morioka et al, 2014)**, GATA2 e SNAIL2, que regulam a transição epitelial-mesenquimal **(Kanki et al, 2011; Casas et al, 2011)**, survivina, PLK1 e APC/C, relacionados à estabilidade cromossômica durante a mitose **(Giubettini et al, 2011; Zhang et al, 2014; Mobahat et al, 2014)**, e WT1 e BCLXL, que regulam processos relacionados à senescência e apoptose **(Vicent et al, 2010; Corcoran et al, 2013).**

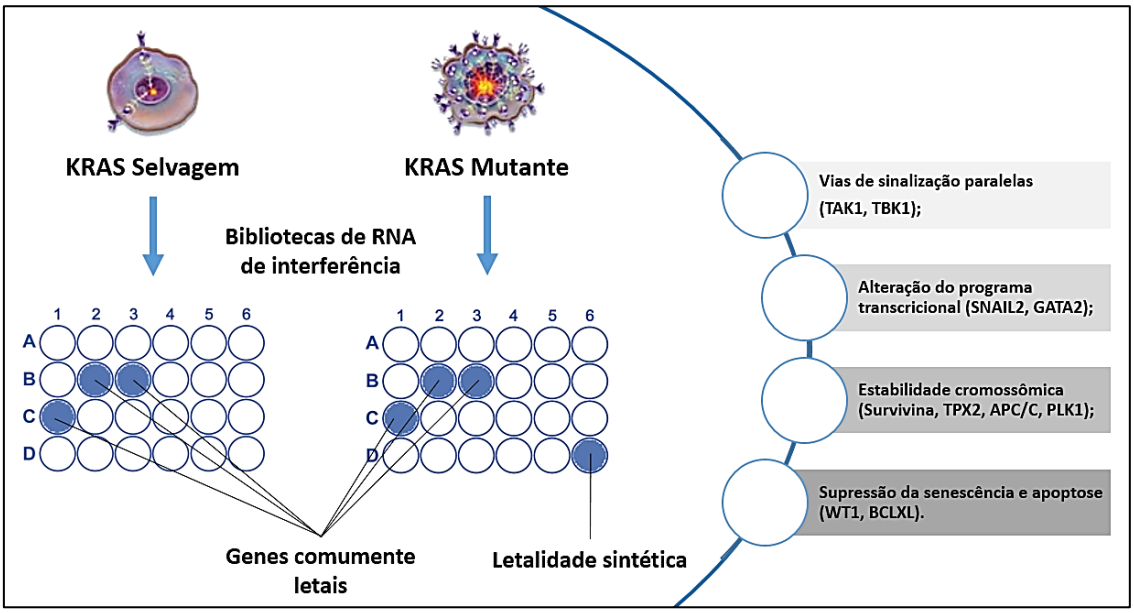


Fig. 1.10. Triagem em larga escala por RNAi aplicado à descoberta de genes de letalidade sintética em tumores mediados por *KRAS*. As triagens funcionais para genes de interação sintética letal usam bibliotecas de siRNA ou shRNA para identificar genes cujas perdas de funções levam à morte seletiva de células mutantes para *KRAS*. Essas bibliotecas podem conter sequências de todo o genoma humano ou de apenas um grupo de genes selecionados. Genes de interação sintética letal podem funcionar em diferentes vias de sinalização importantes para a oncogenicidade mediada por *KRAS*. Essas incluem vias que culminam com a maior proliferação celular (*TAK1* e *TBK1*), alteração do programa transcricional e transição epiletial-mesenquimal (*GATA2* e *SNAIL2*), alteração da estabilidade cromossômica (surviviva, *PLK1* e *APC*/C) ou ainda supressão da senescência e apoptose (*WT1* e *BCLXL*).

Consequentemente, tornou-se possível o desenvolvimento de inibidores alvo-dirigidos específicos para proteínas de vias reguladas por KRAS, capazes de induzir morte apenas em células tumorais. De fato, inibidores de TBK1 derivados de aminopirazolopirimidina **(Chien et al, 2006; Barbie et al, 2009; Ou, 2011)**, palbociclibe (inibidor dual de CDK4 e CDK6) **(Oji et al, 2012; Vicent et al, 2010)**, inibidores de vias reguladas por *GATA2* (bortezomibe - inibidor do proteassomo - associado a fasudilne - inibidor de ROCK) **(Puyol et al, 2010; Steckel et al, 2012)**, e navitoclax, inibidor de panBCL que atua sobre *BCLXL*, **(Corcoran et al, 2013)** são exemplos de inibidores de genes sinteticamente letais para *KRAS* oncogênica em atual fase de ensaios pré-clínicos.

Todos estes esforços, embora promissores, ainda não resultaram em um inibidor seguro e eficaz direto ou indireto de KRAS. Devido à complexa rede de vias reguladas por KRAS, a estratégia indireta para encontrar o “calcanhar de Aquiles” de KRAS provavelmente envolverá a inibição combinada de alvos críticos.

Dentro deste contexto, a identificação de novos alvos de KRAS, potencialmente exploráveis como alvos terapêuticos indiretos, poderia contribuir muito para o desenvolvimento de terapias KRAS-dirigidas, que ainda não existem para pacientes portadores de câncer de pulmão ou outras neoplasias

induzidas por *KRAS*. Nesse sentido, nós propomos neste trabalho que Aurora A e Aurora B, os membros mais bem caracterizados de uma família de serina-treonina quinases, poderiam ser promissores alvos terapêuticos no tratamento de tumores mediados por *KRAS* oncogênica.

A seguir, descreveremos quem são as quinases Aurora e as razões que fundamentaram nossa hipótese de que as quinases Aurora A e Aurora B são potenciais alvos terapêuticos para o câncer de pulmão induzido por *KRAS*.

1.3. As quinases Aurora

As quinases Aurora pertencem a uma família de serina-treonina quinases essesciais para a mitose. A quinase Aurora A (AURKA) e Aurora B (AURKB) são ubiquamente expressas em humanos, ao passo que a quinase Aurora C (AURKC) é expressa apenas em testículos, durante a espermogênese **(Jingyan et al, 2007; Kollareddya et al, 2008)**. Neste trabalho, portanto, concentrar-nos-emos preferencialmente em descrever a AURKA e AURKB, suas funções, regulação e envolvimento na tumorigenicidade mediada por *KRAS*.

1.3.1. Estrutura e localização

A AURKA, AURKB e AURKC estão mapeadas nos cromossomos 20q13.2, 17p13.1 e 10q13, respectivamente **(Bischoff et al, 1998; Kimura et al, 1998; Bernard et al, 1998)**. Possuem de 309 a 403 resíduos de aminoácidos e compartilham de 57 a 75% de homologia estrutural entre si **(Bolanos-Garcia, 2004)**. Apresentam um domínio aminoterminal, mais relacionado à regulação da expressão das proteínas, e um domínio carboxiterminal cataliticamente ativo. Tanto o domínio aminoterminal quanto o carboxiterminal apresentam sítios de reconhecimento de proteínas relacionadas à degradação das quinases Aurora, denominados A-box e D-box, respectivamente. Particularmente, o D-box está contido dentro de uma sequência consenso denominada RxxLxG, onde x representa qualquer resíduo de aminoácido. O domínio de quinase dessas proteínas apresenta um *T-loop* que contém uma sequência consenso RxTxCGTx, onde x representa qualquer resíduo de aminoácido. A fosforilação do primeiro resíduo de treonina desta sequência é essencial para a atividade catalítica das quinases Aurora **(Castro et al, 2002; Crane et al, 2004; Nguyeh et al, 2005) (Fig. 1.11).**

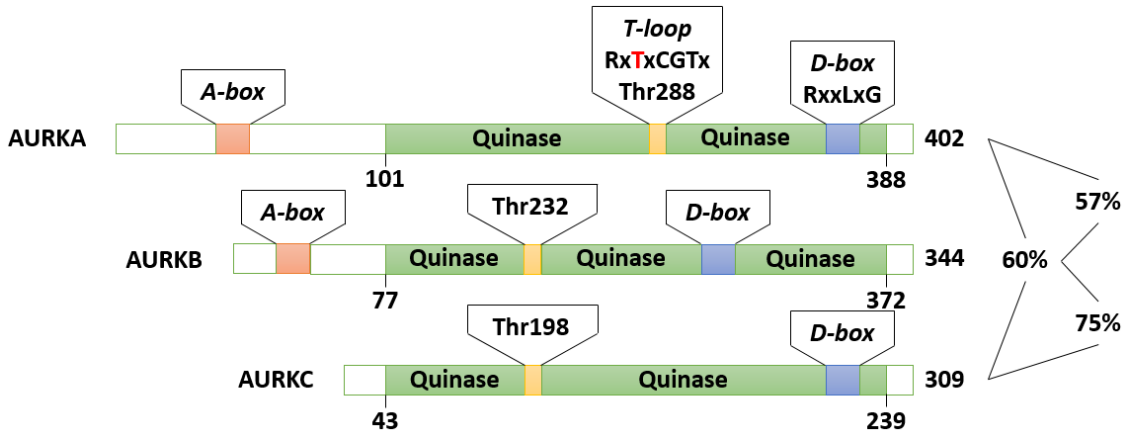


Fig. 1.11. Estrutura comparativa das quinases Aurora A, Aurora B e Aurora C. As quinases Aurora, embora funcionalmente distintas, compartilham de 57 a 75% de homologia entre si, apresentando sequências consenso fundamentais para sua regulação e atividade, que incluem A-box e D-box, regiões essenciais para o reconhecimento por ACP/C^{Cdh1} e consequente degradação das quinases Aurora no final da mitose, e um *T-loop* contendo uma sequência consenso RxTxCGTx que, ao ser fosforilada, induz ativação das quinases Aurora.

O domínio catalítico contém, ainda, um lobo N responsável por posicionar o ATP no sítio catalítico das Auroras, e um lobo C responsável por ligar-se a substratos específicos. Somente após o correto posicionamento desses lobos, as quinases Aurora podem usar o ATP como fonte de energia e doador de grupos fostato para as reações de fosforilação **(Cheetham et al, 2002; Nowakovski et al, 2002; Bayliss et al, 2003; Sessa et al, 2005)**.

A conservação desses sítios é extremamente importante para a especificidade de interação com substratos distintos. A análise comparativa da sequência de resíduos de aminoácidos entre AURKA, AURKB e AURKC em vertebrados mostra uma proporção de 0,84±0,5 de identidade. Esse número é significativamente maior em comparação à análise comparativa da sequência de resíduos de aminoácidos de AURKA ou AURKB entre diferentes espécies de vertebrados e invertebrados, que possui apenas 0,69±0,3 de identidade, sugerindo um ramo evolutivo da família de quinases Aurora dentro dos vertebrados **(Brown et al, 2004)**. Ademais, a análise estrutural das quinases Aurora sugere uma divergência evolutiva bastante recente entre AURKA, AURKB e AURKC **(Cheetam et al, 2000)**.

Apesar das grandes similaridades estruturais, as quinases Aurora são consideravelmente diferentes em relação à sua distribuição subcelular **(Fig. 1.12)**. Todas são proteínas nucleares altamente expressas durante a mitose e pouco detectáveis durante a interfase. Na interfase, a AURKA se localiza no material pericentriolar do final da fase S até o início da fase G2, enquanto que AURKB se encontra difusa no núcleo até o início da mitose. Já na mitose, na prófase, a AURKA se localiza junto aos

centrossomos. Da prometáfase até a metáfase, a AURKA apresenta um pico de expressão e localiza-se nos pólos do fuso mitótico. Já no final da anáfase e em toda a telófase, a AURKA está predominantemente junto ao fuso, quando passa a sofrer regulação negativa. Por outro lado, a AURKB é proteína pertencente ao complexo de passagem cromossômica e se localiza nos cinetócoros da prófase até a metáfase, no *midzone* durante a anáfase e no *midbody* celular durante a telófase e citocinese **(Carmena et al, 2003).**

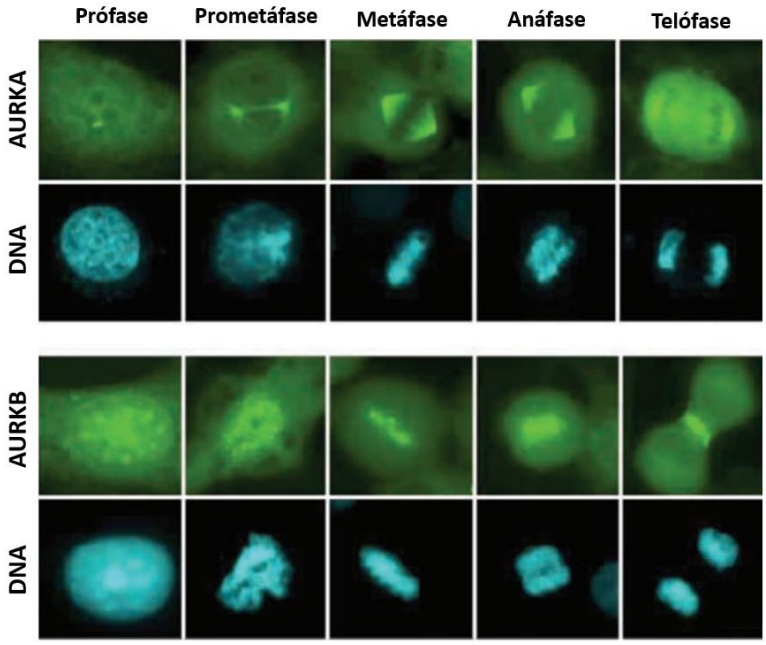


Fig. 1.12. Microscopia de fluorescência para as quinases AURKA e AURKB durante as várias fases da mitose. O DNA total está representado em azul e as quinases AURKA e AURKB, em verde. A prófase é um evento marcado pela maturação e separação dos centrossomos além da permissibilidade da entrada em mitose, eventos mediados pela AURKA, que se localiza junto aos centríolos. Nesse mesmo momento, a AURKB se encontra no núcleo participando da remodelação da cromatina e fosforilação de histonas. Durante a prometáfase e metáfase a AURKA migra para polos opostos da célula participando da formação do fuso mitótico, enquanto que a AURKB permanece junto aos centrômeros, promovendo a correção dos erros de ligação dos microtúbulos. A entrada em anáfase é precedida do *checkpoint* do fuso, evento no qual a quinase AURKB tem fundamental importância, verificando a existência de cinetócoros não ligados aos microtúbulos e regulação da atividade de proteínas de checagem. No início da citocinese, a AURKA começa a sofrer regulação negativa, por meio de sua degradação por APC/C^{Cdh1}. A quinase AURKB, entretanto, ainda atua neste momento promovendo a correta fragmentação do citoplasma e desfazendo o fuso mitótico. Somente no final da citocinese as APC/C^{Cdh1} começam a degradar a AURKB. *Modificado de:* Jingyan F et al, 2013.

1.3.2. Função e regulação

Não somente por sua localização subcelular, as quinases AURKA e AURKB são distintas em relação às suas funções na mitose **(Fig. 1.13)**. As principais funções da quinase AURKA incluem maturação dos centrossomos, controle da entrada em mitose, separação dos centrossomos, formação do fuso bipolar, correto alinhamento dos cromossomos na placa metafásica, citocinese e saída da mitose **(Berdnik et al, 2002; Kufer et al, 2002; Hirota et al, 2003; Marumoto et al, 2003; Eyers et al, 2003;**

Kunitoku et al, 2003; Dutertre et al, 2004; Fu et al, 2007). Já a AURKB está relacionada à segregação cromossômica, citocinese, correta ligação dos microtúbulos aos cinetócoros e regulação do *checkpoint* do fuso mitótico **(Giet et al, 2001; Murata-Hori et al, 2002; Ditchfield et al, 2003; Hauf et al, 2003; Goto et al, 2003)**. A seguir descreveremos mais detalhadamente algumas destas funções e seus mecanismos regulatórios associados.

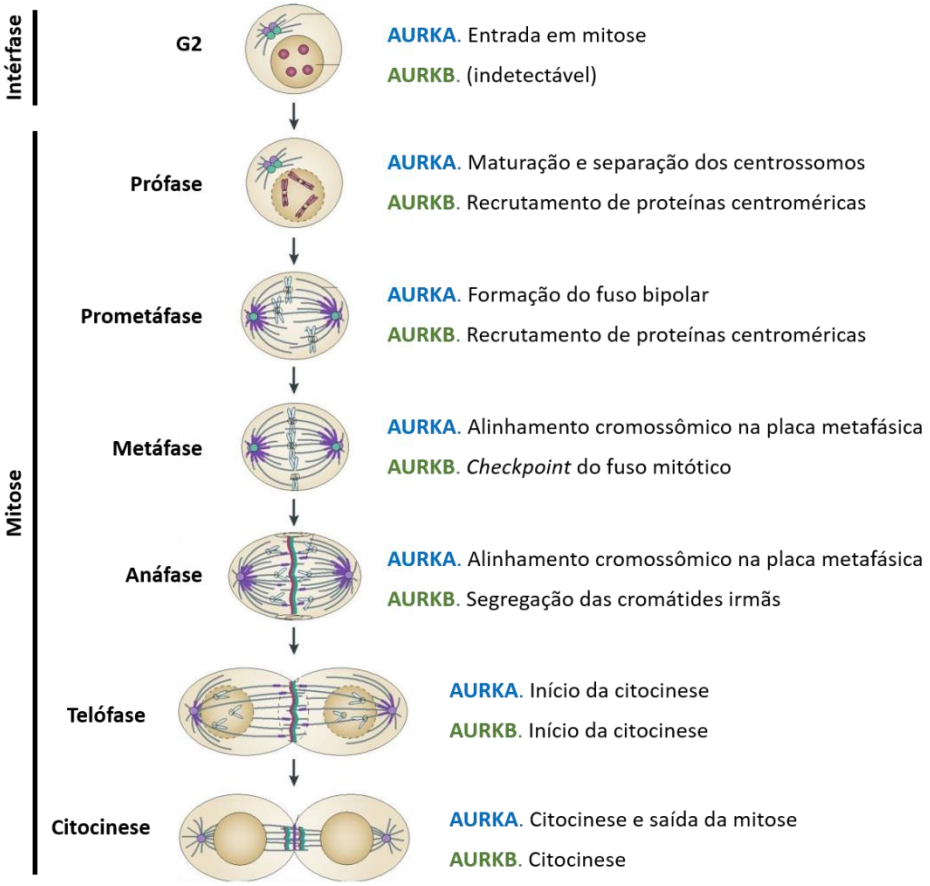


Fig. 1.13. Funções das quinases AURKA e AURKB na mitose. AURKA e AURKB apresentam funções distintas na regulação das diversas fases da divisão celular. As principais funções da AURKA incluem maturação dos centrossomos, controle da entrada em mitose, separação dos centrossomos, formação do fuso bipolar, correto alinhamento dos cromossomos na placa metafásica, citocinese e saída da mitose. Já a AURKB está relacionada à segregação cromossômica, citocinese, correta ligação dos microtúbulos aos cinetócoros e regulação do *checkpoint* do fuso mitótico. *Modificado de* **Bolanos Garcia, 2005**.

Os níveis proteicos da quinase AURKA e sua atividade enzimática aumentam do final da fase G2 até a prometafase, quando a expressão de AURKA atinge seu máximo **(Carvajal et al, 2006)**. Tanto a AURKA, como a AURKB são ativadas por autofosforilação de uma treonina da sequência

consenso RxTxCGTx dentro do *loop* de ativação do domínio carboxiterminal **(Cheetham et al, 2002)**. A ativação de AURKA requer, ainda, a presença de um de vários ativadores de sua atividade de autocatálise, tais como AJUBA, PPI2, HEF1 e BORA **(Katayama et al, 2001; Hirota et al, 2003; Satinover et al, 2004; Pugacheva et al, 2005; Hutterer et al, 2006)**. A ativação adicional de AURKA requer TPX2, o mais conhecido e caracterizado substrato e ativador da autofosforilação de AURKA **(Kufer et al, 2002; Tsai et al, 2003, Eyers et al, 2003).** TPX2 ainda protege AURKA contra a desfosforilação mediada por PP1 no final da mitose, uma vez que a formação do complexo AURKA/TPX2 induz uma alteração conformacional que enterra o sítio de ativação de AURKA em um bolsão, tornando-o inacessível à PP1 **(Katayama et al, 2001; Crane et al, 2004)**. No final da fase G2 e início da mitose, a AURKA se localiza predominantemente junto ao material pericentriolar e atua na maturação e duplicação do centrossomo, num processo dependente de AJUBA **(Hirota et al, 2003)**. Uma vez que a maturação do centrossomo requer a presença de vários componentes de material pericentriolar, a inibição de AURKA reduz a presença de TUBG. Em Drosophila, AURKA é requerida para a correta localização de CDK5RAP2 no centrossomo, o que é necessário para a ligação de TUBG no material pericentriolar **(Berdnik et al, 2002; Terada et al, 2003)**. Além disso, AURKA recruta e fosforila D-TACC, induzindo a formação do complexo D-TACC/MSPS/XMAP215, que impede a atividade de despolimerização de MCAK e estabiliza os microtúbulos ao redor do centrossomo **(Le et al, 2001; Giet et al, 2002; Kinoshita et al, 2005; Barros et al, 2005).** Outra função importante de AURKA na formação do fuso mitótico é orientada de acordo com o gradiante da GTPase RAN. Durante a formação do fuso mitótico, a elevada expressão de RCC1 próximo aos cromossomos ativa a GTPase RAN, que leva à maior concentração de fatores de formação do fuso mitótico, TPX2 e NUMA **(Clarke et al, 2001)**. Na transição G2/M, as estruturas que formam os centrossomos migram para polos opostos da célula formando um fuso bipolar.

De fato, vários estudos mostram que a deleção ou inibição da atividade de AURKA induz a formação de fusos monopolares **(Roghi et al, 1998; Giet et al, 1999; Hannak et al, 2001; Dutertre et al, 2002; Marumoto et al, 2003).** Isso sugere que AURKA é fundamental para a correta maturação e separação dos centrossomos. Por fim, vários estudos mostram que a inibição de AURKA é capaz de bloquar a transição G2/M **(Du et al, 2004; Cazales et al, 2005, dos Santos EO et al, 2013)** e que a superexpressão de AURKA pode suprimir o *checkpoint* induzido por lesões no DNA **(Cazales et al, 2005)**, sugerindo que AURKA regula a transição G2/M. De fato, nos centrossomos, a AURKA fosforila CDC25B, induzindo o recrutamento da ciclina B1 para o núcleo e ativação de CDK1, que são

importantes eventos para a entrada em mitose **(Carvajal et al, 2006)**. Já no final da mitose, a AURKA é degradada e o mecanismo de destruição da proteína envolve o reconhecimento das sequências bem conservadas D-box e A-box por ACP/C^{Cdh1} e posterior ubiquitinação e degradação proteassômica **(Honda et al, 2000; Castro et al, 2002)**.

A AURKB pertence ao complexo de passagem cromossômico e é regulada, sobretudo, por outros membros do mesmo complexo. INCENP é o ativador mais bem caracterizado de AURKB **(Bolton et al, 2002)**. Análises cristalográficas mostram que INCENP forma um complexo com AURKB, que induz alostericamente a conformação ativa do *T-loop* **(Honda et al, 2003)**. Por outro lado, o papel da survivina, terceiro mais bem caracterizado membro do complexo de passagem cromossômico, no contexto regulatório de AURKB ainda não foi completamente estabelecido **(Carmena et al, 2009)**. Durante a prófase, a AURKB se encontra dispersa no material nuclear, onde participa do remodelamento da cromatina por meio da fosforilação de histona H3 (Ser^{10} e Ser^{28}) e CENP-A (Ser^{7}), que são eventos necessários para a condensação cromossômica **(Wei et al, 1998; Wei et al, 1999; Hsu et al, 2000; Zeitlin et al, 2001; Goto et al, 2002).** CENP-A é também fosforilado por AURKA e essa fosforilação é fundamental para o recrutamento de AURKB para os centrômeros durante a prometáfase e adequada ligação entre microtúbulos e cinetócoros **(Kunitoku et al, 2003)**, o que sugere um papel cooperativo entre AURKA e AURKB na regulação da mitose. Além disso, a AURKB também participa em dois processos fundamentais para a correta segregação de cromátides irmãs, a correção de erros de ligação e o *checkpoint* do fuso **(Giet et al, 2001; Murata-Hori et al, 2002)**.

De fato, a normoexpressão de AURKB é essencial para a célula entrar em anáfase com cromossomos corretamente alinhados **(Ditchfield et al, 2003; Hauf et al, 2003)**. Isso, em parte, é explicado pelo fato de que AURKB fosforila MCAK, impedindo a despolimerização dos microtúbulos durante a formação do fuso mitótico **(Andrews et al, 2004; Lan et al, 2004; Ohi et al, 2004; Gorbsky et al, 2004)**. A AURKB está também envolvida no recrutamento de proteínas de *checkpoint* para os cinetócoros. Essas proteínas estão localizadas em cinetócoros não ligados e têm por função inibir APC/C, impedindo que a célula entre em anáfase **(Vigneron et al, 2004; Morrow et al, 2005)**. Por fim, a AURKB tem sido implicada na regulação da citocinese. De fato, a inibição de AURKB leva à poliploidia causada por uma falha de citocinese **(Schumacher et al, 1998; Giet et al, 2001)**.

Embora o mecanismo pelo qual a AURKB regula a citocinese não seja muito bem entendido, existem fortes evidências de que isso envolva sua interação a GTPase Rho **(Yokoyama et al, 2005)** e outras diversas proteínas regulatórias da divisão citoplasmática, tais como desmina, vimentina,

ZEN-4/MKLP1, TACC1 e MgcRacGAP **(Severson et al, 2000; Kawajiri et al, 2003; Goto et al, 2003; Minoshima et al, 2003; Delaval et al, 2004; Guse et al, 2005)**. Assim como a AURKA, a AURKB é praticamente indetectável no final da mitose e sua destruição envolve o reconhecimento de A-box e D-box por ACP/C^{Cdh1}. **(Castro et al, 2002; Crane et al, 2004).** Entretanto, diferentemente da AURKA, a degradação da AURKB requer ainda o reconhecimento de uma sequência consenso denominada KEN-box **(Nguyen et al, 2005)**, o que explica em parte a regulação temporal distinta entre ambas proteínas.

1.3.3. Quinases Aurora e câncer.

Uma vez que as quinases AURKA e AURKB possuem funções importantes no controle do ciclo celular **(Katayama et al, 2003; Crane et al, 2004; Kiruma et al, 2005; Fu et al, 2007)**, não é inesperado que quaisquer alterações de função ou atividade dessas quinases estejam relacionadas ao desenvolvimento de tumores.

A AURKA foi inicialmente descrita como BTAK (*breast tumor activated kinase*, ou quinase ativada do tumor de mama), uma vez que sua superexpressão promove a transformação maligna de células mamárias **(Sen et al, 1997)**. Tanto a superexpressão de AURKA ou AURKB, como sua amplificação, já foram implicadas na tumorigênese **(Carvajal et al, 2006)**. De fato, diversos estudos têm associado alterações no gene *AURKA* com o desenvolvimento de tumores **(Li et al, 2003; Reichardt et al, 2003; Buschhorn et al, 2005; Landen et al, 2007; Zeng et al, 2007)**, incluindo tumores pulmonares **(Smith et al, 2005; Vischioni et al, 2006; Xu et al, 2006; Gu et al, 2007)**.

Um dos mecanismos através dos quais a AURKA contribui para a transformação maligna é através da indução de instabilidade genética. Em células nas quais AURKA é superexpressa, a mitose é caracterizada pela presença de centrossomos múltiplos e fuso mitótico multipolar, que resultam em ligações anormais entre microtúbulos e cinetócoros **(Bischoff et al, 1998; Zhou et al, 1998)**. Apesar disso, o ciclo celular progride até a anáfase, resultando em numerosos erros de separação das cromátides irmãs **(Meraldi et al, 2002)**. Efeitos adicionais incluem ainda falha de citocinese, que gera poliploidia e progressiva instabilidade genética **(Anand et al, 2003)**.

Consistentemente, quando modelos celulares são manipulados para a superexpressar AURKA ocorre indução de oncogênese. De fato, ensaios *in vitro* mostram que AURKA pode transformar células NIH 3T3 e fibroblastos Rat1 **(Zhou et al, 1998; Bischoff et al, 1998; Littlepage et al, 2002)** e quando essas células são inoculadas *in vivo*, elas promovem o crescimento de tumores **(Zhang et al,**

2004). Similarmente, nós demonstramos que a inibição de AURKA em modelos *in vivo* reduz a formação de tumores **(dos Santos et al, 2016)**.

Alterações da expressão e/ou atividade da quinase Aurora B também estão associadas ao desenvolvimento de tumores. De fato, a superexpressão de AURKB já foi reportada em diversos tumores **(Katayama et al, 1999; Sorrentino et al, 2004; Guangying et al, 2007; Tchatchou et al, 2007)**, incluindo NSCLC **(Smith et al, 2005)**. Os mecanismos pelos quais a alteração da expressão ou atividade de AURKB leva à oncogênese também são variados. Tanto a superexpressão quanto a depleção gênica de Aurora B resultam em multinucleação e poliploidia **(Tatsuka et al, 1998; Araki et al, 2004)**, levam à amplificação dos centrossomos e promovem erros na segregação dos cromossomos e citocinese, contribuindo para a progressiva instabilidade genética e transformação maligna **(Meraldi et al, 2002)**.

1.3.3. Quinases Aurora e KRAS

As quinases Aurora vêm sendo recentemente reportadas como proteínas importantes na gênese e manutenção do câncer mediado por *KRAS*. De fato, a superexpressão de AURKA não somente aumenta a malignidade de células tumorais do ducto pancreático **(Furukawa et al, 2006)**, como também aumenta a capacidade de RAS de transformar fibroblastos murinos **(Bossù et al, 2000)**. Além disso, estudos mostram que RAS promove tumorigenicidade através da expressão desbalanceada entre AURKA e BRCA2 **(Wang et al, 2013)**, sugerindo um papel oncogenico para AURKA no contexto da via de sinalização de KRAS. De fato, estudos já identificaram AURKA como um potencial alvo terapêutico em tumores da bainha do nervo periférico mediado por *HRAS* **(Patel et al, 2012)** e que sua inibição combinada com efetores das vias de sinalização de KRAS reduz a formação de tumores em modelos de câncer colorretal **(Davis et al, 2015)**. Do mesmo modo, outros estudos mostram que FADD se associa a diversas proteínas, incluindo AURKA, no controle da transição G2/M e que sua ativação é requerida para a tumorigênese mediada por $KRAS^{G12V}$ **(Bowman et al, 2015)**. Por fim, estudos demostram que AURKA ativa o fator de transcrição NF-κB, por meio da fosforilação de de IκBα, **(Briassouli et al, 2007)**, e que NF-κB é requerido para a transformação maligna mediada por *KRAS* em células pulmonares **(Bassères et al, 2010)**. Do mesmo modo AURKA fosforila, relocaliza e ativa RALA, um efetor da via de sinalização de RALGEF, fundamental para a oncogenicidade mediada por *KRAS* **(Tatsuka et al, 2005; Guin et al, 2013; Wang et al, 2013)**.

No caso da quinase Aurora B, estudos mostram que esta quinase é capaz de potencializar a transformação celular mediada por *KRAS*, além de induzir instabilidade genética **(Kanda et al, 2005; Kosik et al, 2009)**. Outros estudos estabelecem, ainda, uma correlação entre a via KRAS/RAF/MEK/ERK e AURKB, cuja inibição simultânea possui efeitos antitumorais **(Marampon et al, 2014)**. Além disso, a AURKB é requerida para a tumorigenicidade mediada por *RAS* em tumores de cólon **(Hadj-Slimane et al, 2010)**. Por fim, um recente estudo demonstrou que GSK-1070916, um potente inibidor de AURKB e AURKC, inibe prefencialmente células com MYC superexpresso **(Uitdehaag et al, 2015)**, um fator de transcrição ativado por *KRAS* **(Bachireddy et al, 2005)** e que regula a expressão das quinases Aurora **(Den Hollander et al, 2010)**.

Nesse sentido, a hipótese que fundamenta este trabalho é que KRAS regula as quinases Aurora A e Aurora B e que AURKA e AURKB são importantes mediadores da atividade oncogênica de *KRAS*, sendo, portanto, potenciais alvos terapêuticos no câncer de pulmão induzido por *KRAS*.

Parte desta hipótese já foi testada pelo aluno durante o seu mestrado e os resultados estão descritos em: *dos Santos EO. Investigação das Quinases Aurora A e Aurora B como Potenciais Alvos Terapêuticos no Câncer de Pulmão Induzido pelo Oncogene* KRAS*. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.*

Resumidamente, nós investigamos (1) se AURKA ou AURKB eram reguladas por KRAS em células pulmonares, e (2) se a inibição de AURKA e/ou AURKB poderia inibir a oncogênese mediada por *KRAS in vitro*. Nós confirmamos que ambas as quinases Aurora A e Aurora B são reguladas por KRAS, usando três diferentes modelos celulares: (1) uma cultura celular epitelial primária imortalizada e sua respectiva forma transformada por *KRAS* **(Lundberg et al, 2002)**; (2) células tumorais pulmonares H1703 sem mutações em *KRAS*, geneticamente modificadas para expressar induzivelmente a forma oncogênica de *KRAS* (modelo de ganho de função); e (3) células tumorais pulmonares H358 e A549 possuindo mutações em *KRAS*, geneticamente modificadas para expressar induzivelmente shRNAs contra *KRAS* (modelo de perda de função). Em todos os casos, a expressão de KRAS apresentou uma correlação positiva com a expressão de AURKA e AURKB, e, portanto, ambas as quinases Aurora A e Aurora B são alvos de KRAS.

Nós também utilizamos abordagens genéticas e farmacológicas nos modelos celulares supramencionados para inativar AURKA e/ou AURKB e avaliar como esta inibição afeta a oncogenicidade celular. O *knockdown* induzível de AURKA ou AURKB mediado por shRNA, assim como

o tratamento farmacológico com um inibidor dual das quinases Aurora A e Aurora B, promoveu um decréscimo no crescimento, clonogenicidade e capacidade de crescimento na ausência de ancoragem de células A549 e H358 positivas para mutações em *KRAS*. Interessantemente, efeitos muito similares foram observados também em células H1703 e em um modelo celular primário somente na presença de KRAS oncogênica. A inibição de AURKA e/ou AURKB não foi capaz de induzir nenhum efeito significativo sobre células tumorais que expressam somente KRAS selvagem.

Portanto, nossos resultados apoiam nossa hipótese de que AURKA e AURKB são alvos importantes de KRAS no câncer de pulmão e sugerem a inibição da expressão e/ou atividade de AURKA e/ou AURKB como uma nova abordagem para o desenvolvimento de terapias alvo dirigidas para o câncer de pulmão induzido por KRAS.

Entretanto, para que as quinases Aurora A e Aurora B sejam caracterizadas como alvos terapêuticos potenciais no câncer de pulmão induzido por mutações em *KRAS*, outros estudos são necessários. Uma vez observado que as quinases Aurora A e Aurora B são importantes para a viabilidade de células possuindo KRAS oncogênica, é necessário determinar o mecanismo de perda de viabilidade dessas células, o que pode ocorrer tanto por uma menor proliferação, quanto por maior morte celular por apoptose. Além disso, uma vez observada a importância de AURKA e AURKB para a manutenção do fenótipo maligno dos modelos estudados, e dado que tumores mediados por mutações em *KRAS* são altamente invasivos, será importante determinar se a inibição de ambas as quinases Aurora teria o mesmo efeito sobre a migração e invasão celulares, de modo dependente da presença de KRAS. Finalmente, uma vez observado que AURKA e AURKB são requeridas para a oncogenicidade observada *in vitro*, será importante determinar o papel de ambas as quinases na tumorigenicidade *in vivo* de células portadoras de KRAS mutada, por meio de ensaios xenográficos.

A importância do estudo proposto está na busca de um entendimento mais amplo de como as vias de sinalização relacionadas à KRAS oncogênica desencadeiam a transformação maligna, podendo, assim, ser abordadas para o tratamento do câncer. Além disso, tendo em vista a falta de opções terapêuticas efetivas para os pacientes com câncer de pulmão mediado pelo oncogene *KRAS*, este projeto busca a obtenção do conhecimento necessário para o desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas, com o objetivo de melhorar o prognóstico destes pacientes. Finalmente, espera-se que o alcance das estratégias necessárias para o desenvolvimento de novas terapias oncológicas beneficie não somente pacientes com câncer de pulmão, mas também pacientes com outras neoplasias associadas à *KRAS* oncogênica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar o papel das quinases AURKA e AURKB na tumorigenicidade mediada pelo oncogene *KRAS*, provendo embasamento científico para o desenvolvimento de novas terapias alvo-dirigidas para o câncer de pulmão induzido por *KRAS*.

2.2. Objetivos específicos

1. Determinar o mecanismo de perda de viabilidade celular mediante a inibição da expressão e/ou atividade de AURKA e AURKB em células portadoras de mutações em *KRAS*.

2. Determinar como a inibição da expressão e/ou atividade de AURKA e AURKB afeta a migração e invasão de células portadoras de mutações em *KRAS*.

3. Determinar como a inibição da expressão e/ou atividade de AURKA e AURKB afeta a tumorigenicidade *in vivo* de células portadoras de mutações em *KRAS*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens celulares

Foram utilizadas as seguintes linhagens celulares e condições de cultivo:

a) linhagem celular de adenocarcinoma pulmonar humano portadora de mutação oncogênica $KRAS^{G12C}$, designada A549 (ATCC CCL-185), manipulada ou não para inibição de genes de interesse; e linhagem celular de carcinoma bronquioalveolar pulmonar humano portadora de mutação oncogênica $KRAS^{G12S}$, designada H358 (ATCC CRL-5807), manipulada ou não para inibição de genes de interesse. O cultivo celular foi feito em meio RPMI-1640 (ATCC 30-2001) suplementado com 10% (vol/vol) FBS (soro fetal bovino), sem antibióticos. Com o objetivo de promover o silenciamento dos mRNAs de interesse (*KRAS*, *AURKA*, *AURKB*) nas linhagens mencionadas acima, foram feitas duas preparações lentivirais contendo sequências distintas de short hairpin RNAs (shRNAs) para cada mRNA alvo. As preparações lentivirais foram assim denominadas: shKRAS#1, shKRAS#2, shAURKA#1, shAURKA#2, shAURKB#1, shAURKB#2. Para obtenção de controles experimentais posteriores, foi gerada outra preparação lentiviral contendo um shRNA sem homologia a mRNAs humanos, denominada shNTCtrl. Os vetores lentivirais já contendo as sequências de expressão dos shRNAs de interesse foram obtidos da *OpenByosystems*. O vetor utilizado em todas as construções é denominado pTRIPz, que, além da sequência codificadora do *hairpin* de interesse, possui um gene para expressão de proteína fluorescente vermelha, turbo-RFP (*red fluorescent protein*), sendo que ambos estão sob o controle de um promotor regulado por doxiciclina (TRE). Na ausência de doxiciclina a expressão do *hairpin* e da RFP não ocorre, pois esta depende da interação da proteína regulatória *reverse tetracycline transactivator* 3 (rtTA3, expressa no mesmo vetor a partir de um promotor constitutivo – UBC) com o promotor TRE, o que só ocorre na presença de doxiciclina. O cultivo celular foi feito em meio RMPI-1640 suplementado com 10% (vol/vol) FBS e 2 µg/mL de puromicina. Doxiciclina somente foi adicionada no momento do experimento para indução da expressão dos respectivos shRNAs.

b) linhagem celular de adenocarcinoma pulmonar humano, designada H1703 (ATCC CRL-5889), que não é portadora de mutações oncogênicas em *KRAS*, manipuladas ou não para expressar induzivelmente a KRAS oncogênica. A expressão induzível da KRAS oncogênica em células H1703 (que não possuem o gene *KRAS* mutado) foi obtida por meio do sistema induzível de expressão T-RExTM

System (*Invitrogen*®). Células H1703 duplamente estáveis foram geradas através de transfecções com dois vetores: o vetor regulatório pcDNA6/TR que expressa altos níveis do repressor TetR sob o controle do promotor CMV e o vetor pcDNATM/4/TO/myc-His contendo o gene de interesse, no caso a forma oncogênica G12V da *KRAS* fusionada a um *tag* HA. A expressão, neste caso, é controlada por uma versão modificada do promotor CMV, na qual duas cópias do operador tet (TetO2) foram inseridas *in tandem*. Portanto, na ausência de tetraciclina ou doxiciclina, o repressor TetR está ligado aos operadores *tet* e a expressão da KRAS oncogênica é inibida. Na presença de tetraciclina ou doxiciclina o repressor TetR se desliga dos operadores e a expressão da *KRAS* oncogênica é induzida. Células H1703 transfectadas com a forma oncogênica da *KRAS* G12V foram posteriormente denominadas H1703 G12V. Como controle negativo, foram geradas células H1703 duplamente estáveis para os vetores pcDNA6/TR e pcDNATM/4/TO/myc-His vazio. Essas células foram posteriormente denominadas H1703 T-RexB **(Bassères et al, 2014)**. O cultivo celular foi feito em meio RPMI-1640 suplementado com 10% (vol/vol) FBS, 10 µg/mL de blasticidina e 3 µg/mL de zeocina. Do mesmo modo, doxiciclina somente foi adicionada ao meio de cultivo no momento do experimento para indução da expressão de $KRAS^{G12V}$.

3.2. *Western Blot*

$1x10^6$ células foram plaqueadas em placas P100 em meio de cultivo apropriado contendo soro fetal bovino 10% e tratadas pelos tempos indicados em cada caso. Após a remoção do meio, as células foram lavadas duas vezes com solução PBS (não contendo íons Mg2+ ou Ca2+) e lisadas com 800 µl de tampão RIPA suplementado com inibidores de proteases e fosfatases. As proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford. Alíquotas de 20 a 100 µg de proteína foram submetidas a fracionamento vertical em gel de poliacrilamida-SDS 8 a 12% (SDS-PAGE). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF e a mesma foi bloqueada *overnight* em solução contendo 5% de leite desnatado ou albumina bovina em PBS-Tween 0,1%. Anticorpos primários e secundários foram utilizados de acordo com as indicações individuais de cada fabricante. A detecção ou revelação das bandas marcadas pelos anticorpos foi realizada por meio do software *Odyssey* (Licor) (no caso de anticorpos secundários conjugados a fluorocromos) ou por meio da exposição fotográfica, seguida por quantificação com o software *Image*J (NCBI) (no caso de anticorpos secundários conjudgados à peroxidase). Utilizamos os seguintes anticorpos primários: anti-AURKA (#4718, *Cell Signaling Technology*), anti-pAURKA (#3079, *Cell Signaling* Technology), anti-AURKB (#3094, *Cell Signaling Technology*), anti-AURKA (Thr288) / AURKB (Thr232) / AURKC (Thr198) (#2914, *Cell*

Signaling Technology), anti-GAPDH (#25778, *Santa Cruz Biotechnology*), anti-CASP3 clivada (#9661, *Cell Signalling*), anti-CASP3 total (#9660, *Cell Signalling*), anti-ACTB (#7210, *Santa Cruz Biotechnology*), anti-MMP2 (#4022, *Cell Signalling*) e anti-MMP9 (#3852, *Cell Signalling*). Foram utilizados os seguintes anticorpos secundários conjugados a fluorocromos: anti-coelho Alexa Fluor® 680 (#A-21109 *Life Technologies*); anti-camundongo Alexa Fluor® 680 (#A-21058 *Life Technologies*); anti-coelho IRDye® 800CW (#926-32211, *LiCor*); e anti-camundongo IRDye® 800CW (#926-32210, *Li-Cor*). Foram utilizados os seguintes anticorpos secundários conjugados a HRP: anti-cabra IgG HRP (#2020, *Santa Cruz Biotechnology*); anti-camundongo IgG HRP (#2005, *Santa Cruz Biotechnology*); e anti-coelho IgG HRP (#2004, *Cell Signaling Technology*).

3.3. Zimografia.

Para a detecção da atividade enzimática das metaloproteinases de matriz 2 (MMP2) e 9 (MMP9), as células foram previamente tratadas com inibidores ou antibióticos, conforme cada caso. Após 24 h de carenciamento com meio contendo 0% de soro fetal bovino, o meio condicionado foi recolhido, centrifugado para a remoção de detritos celulares e submetido a eletroforese vertical em gel contendo 10% de poliacrilamida, sem beta-mercaptoetanol ou quaisquer outros agentes redutores, e contendo, ainda, 0,1% de gelatina. Após eletroforese, o gel foi incubado em solução de renaturação contendo 2,5% Tween, por 1h em temperatura ambiente. Posteriormente, o gel foi incubado em solução tampão, contendo 500 mM Tris-HCl, pH 7,8; 2 M NaCl, 50 mM CaCl2 e 0,2% Brij 35, por 24h, à temperatura de 37ºC. Por fim, o gel foi corado em solução 0,5% *Coomassie blue* R-250, 5% metanol e 10% ácido acético em água. A descoloração foi realizada em solução contendo 10% metanol e 5% ácido acético em água. A detecção foi feita em equipamento Odyssey (Licor®), e as bandas quantificadas densitometricamente por meio do *software* Odyssey (Licor®). Os dados foram submetidos à análise estatística por teste t de *Student* e foram consideradas estatisticamente diferentes as amostras com valores $p<0,05$ (*), $p<0.01$ (**) e $p<0.001$ (***).

3.4. Ensaio de ciclo celular baseado na incorporação de PI e detecção por citometria de fluxo.

As células indicadas em cada experimento foram plaqueadas à confluência de $1x10^5$ células em placas de seis poços. Após o tratamento os tratamentos indicados em cada caso, as células foram

tripsinizadas e fixadas em etanol 70%. As células foram tratadas com RNase A 100 µg/ml (#EN0531, *Thermo Fisher Scientific*) por 30 min a 37 ºC e, por fim, ressuspendidas em solução tampão contendo 100 µg/mL de iodeto de propídio (PI, #81845, *Sigma-Aldrich*). As amostras foram submetidas à citometria de fluxo em citômetro BD FACSVerse™ (*BD Biosciences*) e os resultados foram analisados por meio do *software* Kaluza® (*Beckman Coulter*). Os dados foram submetidos à análise estatística por teste t de *Student* e foram consideradas estatisticamente diferentes as amostras com valores $p<0,05$ (*), $p<0.01$ (**) e $p<0.001$ (***).

3.5. Ensaio de proliferação baseado na incorporação de BrdU e/ou PI e detecção por citometria de fluxo.

As células indicadas em cada experimento foram plaqueadas à confluência de $1x10^5$ células em placas de seis poços. Após o tratamento indicado em cada caso, as células foram incubadas com 50 µM de bromodeoxiuridina (BrdU, #19-160, *Merck Millipore*) no escuro por 2 h e fixadas em etanol 70%. As células foram tratadas com RNase A 100 µg/ml (#EN0531, *Thermo Fisher Scientific*) por 30 min a 37 ºC, seguido por HCl 2 M por 20 min à temperatura ambiente. Por fim, as células foram incubadas em 100 µL de anticorpo anti-BrdU conjugado a Alexa Fluor® 488 (#FCMAB101A4, *Merck Millipore*) por 1 h no escuro e ressuspendidas em solução tampão contendo 100 µg/mL de iodeto de propídio (PI, #81845, *Sigma-Aldrich*). As amostras foram submetidas à citometria de fluxo em citômetro BD FACSVerse™ (*BD Biosciences*) e os resultados foram analisados por meio do software Kaluza® (*Beckman Coulter*). Os dados foram submetidos a análise estatística por teste t de *Student* e foram consideradas estatisticamente diferentes as amostras com valores $p<0,05$ (*), $p<0.01$ (**) e $p<0.001$ (***).

3.6. Ensaio de morte celular baseado na marcação com Anexina V e PI e detecção por citometria de fluxo.

As células indicadas em cada experimento foram plaqueadas à confluência de $1x10^5$ células em placas de seis poços. Após os tratamentos indicados, conforme indicação em cada experimento, as células foram incubadas com Anexina V-FITC e solução tampão contendo iodeto de propídio, de acordo com as orientações do fabricante (#130-092-052, *Miltenyi Biotec*). Resumidamente, as células foram ressuspendidas em tampão de ligação, incubadas com Anexina V-FITC por 15 min, seguidas da incubação com tampão de ligação contendo 100 µg/mL de iodeto de propídio. As amostras foram

submetidas à citometria de fluxo em citômetro BD FACSVerse™ (*BD Biosciences*) e os resultados foram analisados por meio do software Kaluza® (*Beckman Coulter*). Os dados foram submetidos à análise estatística por teste t de *Student* e foram consideradas estatisticamente diferentes as amostras com valores $p<0,05$ (*), $p<0.01$ (**) e $p<0.001$ (***).

3.7. Ensaio de adesão celular

As células indicadas em cada caso foram antecipadamente privadas de soro fetal bovino por 8 h e então plaqueadas (na ausência de soro fetal bovino) à confluência de $1x10^5$ células por poço em placas de seis poços previamente tratadas com solução PBS contendo 50 µg/mL de colágeno tipo I. Após 20 min de incubação, cada poço foi lavado com PBS e as células foram novamente incubadas por 8h em meio de cultivo completo, contendo 10% de soro fetal bovino. O meio de cultivo foi, então, removido, os poços lavados com PBS e as células remanescentes coradas com solução de cristal violeta 0,1% em PBS. O registro fotográfico foi feito por meio do software Cell F® (*Olympus Europe*), e a quantificação da área corada foi realizada por meio do software *ImageJ* (NCBI). Paralelamente, um ensaio funcional de adesão foi realizado com células à confluência de $1x10^4$ células por poço em placas de 96 poços previamente tratadas com solução PBS contendo 50 µg/mL de colágeno tipo I. Após 20 min de incubação, cada poço foi lavado com PBS e as células foram novamente incubadas por 8h em meio de cultivo completo, contendo 10% de soro fetal bovino. O meio de cultivo foi, então, removido, os poços lavados com PBS e cada poço foi incubado com solução de brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) 50 µg/mL no escuro por 2h, com o único propósito de corar as células ainda aderidas à placa ao final do experimento. Após o tempo de incubação, o meio de cultivo foi removido e a cada poço adicionado 100 de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilização dos cristais de formazan. A redução do MTT a formazan foi medida através da detecção da absorbância a 540 e 630 nm em espectrofotômetro *Biotek Technologies* e os dados analisados por meio do *software* GraphPad Prism. Os dados foram submetidos à análise estatística por teste t de *Student* e foram consideradas estatisticamente diferentes as amostras com valores $p<0,05$ (*), $p<0.01$ (**) e $p<0.001$ (***).

3.8. Ensaio de migração celular por *wound-healing*

As células foram plaqueadas em placas de cultura de 6 poços à confluência de 100%. O meio de plaqueamento foi constituído de RMPI 10% SFB (com antibióticos, a depender dos modelos

celulares utilizados). Para o estudo da inibição de AURKA e AURKB em células A549 e H358, a indução com doxiciclina foi feita nos cinco dias que antecedem o plaqueamento. No caso da inibição farmacológica de AURKA e AURKB, o tratamento com inibidor foi feito nas 72 h precedentes ao experimento. Em todos os casos, as células foram tratadas com mitomicina 1 µg/ml para inibir a proliferação. Após 24 h, foi desenhado um risco central nas placas, as células foram lavadas por duas vezes com PBS e estas foram fotografadas utilizando-se o *software* CellF®. As células foram novamente incubadas por 24 h e, ao final do tratamento, o meio foi removido, as células foram lavadas duas vezes com PBS e a fenda foi novamente fotografada. A quantificação das áreas iniciais e finais das fendas desenhadas sobre a placa foi feita utilizando-se o *software* CellF®. A área migrada foi calculada subtraindo-se a área final da inicial e a porcentagem de migração foi calculada em relação ao controle, cuja migração foi considerada como 100%. Os dados foram submetidos à análise estatística por teste t de *Student* e foram consideradas estatisticamente diferentes as amostras com valores $p<0,05$ (*), $p<0.01$ (**) e $p<0.001$ (***).

3.9. Ensaio de migração celular por imageamento ao vivo.

Para este ensaio, as células foram cultivadas em baixa densidade em placas de 35mm (*ibiTreat*, # 81156) ou lâminas de 4 poços (*ibiTreat*, # 80826) e foram tratadas com inibidores, de acordo com as condições definidas para cada experimento, e observadas com microscópio invertido Eclipse Ti (*Nikon*), usando-se lente objetiva de 40X (Plan Fluor, 0.60 N.A. DIC). Durante todo o tempo de observação, as células foram mantidas em incubadora (Basic WJ, *Okolab*), à temperatura controlada de 37°C e 5% CO_2. As imagens foram adquiridas a cada 5 minutos ao longo de 24 h de tratamento com auxílio de câmera DS-Qi1Mc software NIS-Elements AR 4.0 (*Nikon*). A análise da migração célula a célula foi feita com auxílio do software *ImageJ* 1.51d (NCBI), por meio da quantificação da distância média acumulada, com iguais tempos de análise para cada célula, e velocidade média de migração ao longo do eixo X/Y. Os dados foram submetidos à análise estatística por teste t de *Student* e foram consideradas estatisticamente diferentes as amostras com valores $p<0,05$ (*), $p<0.01$ (**) e $p<0.001$ (***).

3.10. Ensaios xenográficos.

$2x10^6$ células A549 geneticamente modificadas para a expressão de um shRNA para AURKA (shAURKA) ou de um shRNA sem homologia a genes humanos (shNTCtrl) foram

subcutaneamente inoculadas no flanco de camundongos Balb/C *nude* com idade aproximada de 8 semanas, de acordo com os protocolos aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (CEA-IQ-USP). Os animais foram monitorados em intervalos regulares (3 vezes por semana) até o aparecimento de tumores palpáveis (26 dias depois do inóculo). Após esse período, 1 mg/mL de doxiciclina foi adicionada à água de beber para induzir a expressão do shRNA em cada caso. A cinética de volumes tumorais foi calculada, considerando-se o volume tumoral, o maior e o menor diâmetro do tumor. Ao final do experimento (56 dias após o inóculo), os animais foram submetidos à eutanásia em câmaras de CO_2, de acordo com as instruções do Biotério do Conjunto das Químicas da Universidade de São Paulo, e o peso dos tumores foi determinado. A análise estatística das diferenças observadas de peso e volume dos tumores em cada caso foi determinada por *One way* ANOVA.

3.11. Imunofluorescência

As células foram plaqueadas à confluência de 50% em lamínulas previamente tratadas com poli-L-lisina (#P4832, *Sigma-Aldrich*) e incubadas por 24 h para adesão celular. Posteriormente, o bloqueio do ciclo celular foi induzido com timidina 1 mM e feita uma nova incubação de 24 h. A seguir, as células foram lavadas em meio de cultura completo complementado com deoxicitidna 1 mM para remoção completa da timidina e retorno do ciclo celular. Por fim, após 5 h de incubação, as células foram fixadas, dependendo das proteínas estudadas, em metanol à -20ºC por 6 minutos ou paraformaldeído 3,7% à temperatura ambiente por 10 min. No caso da fixação com paraformaldeído, as células foram posteriormente submetidas à permeabilização com PBS contendo Triton X-100 0,05% por 10 min e tratadas com solução de glicina 1 M por 10 min. O bloqueio das interações inespecíficas dos anticorpos utilizados foi feito, em todos os casos, em PBS contendo BSA 3% por 30 min. Os anticorpos primários e secundários foram utilizados de acordo com as instruções de seus respectivos fabricantes. DAPI 1 µg/µl foi utilizado para marcação do DNA. Por fim, as lâminas foram montadas utilizando-se *VectaShield*, deixadas secar à temperatura ambiente e vedadas. A aquisição de imagens e posterior análise foi realizada utilizando-se o software Elements AR 4.0 (*Nikon*). Foram utilizados os seguintes anticorpos primários: anti-AURKA (#4718, *Cell Signaling Technology*), anti-pAURKA (#3079, *Cell Signaling Technology*), anti-AURKB (#3094, *Cell Signaling Technology*), anti-pAURKB (#2914, *Cell Signaling Technology*), anti-TUBA (#T9026, *Sigma-Aldrich*), anti-PCNT (#84542, *AbCam*), anti-HA (#C29F4, *Cell Signaling*), anti-TPX2 (#NB500-179, *Novus Biologicals*). Foram utilizados os seguintes anticorpos

secundários utilizados: anti-IgG de rato, FITC (#2991, *Santa Cruz Biotechnology*); anti-IgG de cabra, Texas-Red (#2783, *Santa Cruz Biotechnology*); anti-IgG de coelho, FITC (#2090, *Santa Cruz Biotechnology*); anti-igG de camundongo, Texas-Red (#TI2000, *Vector Laboratories*). A aquisição de imagens foi feita com o auxílio do software Nis Elements AR 4.2 (arquivos.nd2), gerando-se, para cada célula, 21 fotos em cortes transversais ao longo de 21 µm sobre o eixo Z. A intensidade de fluorescência em cada caso foi feita com o mesmo software após a projeção da intensidade máxima ao longo do eixo. A construção de imagens representativas foi realizada com *Photoshop* CC e análise da significância estatística, em *Prism* 7.0. Os dados foram submetidos à análise estatística por teste t de *Student* e foram consideradas estatisticamente diferentes as amostras com valores $p<0,05$ (*), $p<0.01$ (**) e $p<0.001$ (***).

3.12. Microscopia de *time-lapse* ao vivo.

Células cultivadas em placas de 35mm (*ibiTreat*, # 81156) ou lâminas de 4 poços (*ibiTreat*, # 80826) foram tratadas com inibidores ou antibióticos, de acordo com as condições definidas para cada experimento, e observadas com microscópio invertido Eclipse Ti (*Nikon*), usando-se lente objetiva de 40X (*Plan Fluor*, 0.60 N.A. DIC). Durante todo o tempo de observação, as células foram mantidas em incubadora (Basic WJ, *Okolab*), à temperatura controlada de 37°C e 5% CO2. Imagens foram adquiridas a cada 5 minutos ao longo de 48 h de tratamento (para estudos de inibição de AURKA por interferência de RNA) ou 96 h de tratamento (para estudos de inibição farmacológica de AURKA e AURKB), com auxílio de uma câmera DS-Qi1Mc, usando-se o *software* NIS-Elements AR 4.0 (*Nikon*). A análise de anomalias e tempos de divisão celular foram realizados manualmente, após processamento do vídeo com o *software Elements* AR 4.2.

3.13. Ensaio de viabilidade baseado na clonogenicidade celular.

Células previamente cultivadas em placas de 6 poços foram submetidas à transfeção com siRNAs para TPX2 (# M-010571-00, *Dharmacon™*) ou sem homologia a genes humanos (# D-001210-02-20, *Dharmacon™*), de acordo com as indicações do fabricante. Após 3 dias, as células foram tripsinizadas, replaqueadas em placas de 60mm à confluência de 500 células/placa e incubadas à temperatura controlada de 37°C e 5% CO2. Após a formação de colônias visíveis a olho nu, as células foram fixadas em metanol 100% à temperatura ambiente por 10 minutos, coradas com solução de cristal violeta e lavadas em PBS. O número e a área das colônias foram quantificados com o auxílio do

programa *ImageJ* (NCBI). Os dados foram submetidos à análise estatística por teste t de *Student* e foram consideradas estatisticamente diferentes as amostras com valores p<0,05 (*), p<0.01 (**) e p<0.001 (***).

3.14. Análise de bioinformática.

Para a análise de bioinformática da expressão de AURKA e TPX2 em amostras de pacientes portadores de NSCLC, nós utilizamos o banco de dados *Lung Meta-base: 6 cohorts 22K genes*, pertencente à plataforma online *SurvExpress – Biomarker validation for cancer gene expression*, disponível em http://bioinformatica.mty.itesm.mx:8080/Biomatec/SurvivaX.jsp, para comparar a expressão de AURKA e TPX2 em amostras de pacientes portadores de NSCLC em função do risco de sobrevida, bem como comparar a sobrevida destes pacientes em função da presença de alta ou baixa expressão de AURKA e TPX2.

3.15. Análise estatística

Para todos os casos, nós realizamos análises estatísticas baseadas no teste Student-t, comparando-se sempre o par controle experimental (DMSO ou Mock, a depender do desenho experimental) e demais condições, uma a uma. Foram considerados estatisticamente significativos os valores a seguir: (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001).

4. RESULTADOS

4.1. A inibição farmacológica das quinases AURKA e AURKB em células portadoras de mutação em *KRAS* promove uma redução da proliferação, induz prolongamento do ciclo celular, instabilidade genética e hiperploidia.

Nós já havíamos demonstrado anteriormente que a inibição farmacológica das quinases Aurora A (AURKA) e Aurora B (AURKB) em células pulmonares portadoras de mutação em *KRAS* reduz o crescimento, viabilidade e crescimento independente de ancoragem **(dos Santos, 2013).** Aqui nós decidimos investigar o mecanismo que leva a esta perda de viabilidade. Para tanto, nós utilizamos um inibidor farmacológico dual ATP-competitivo de AURKA e AURKB, denominado Aurora Inhibitor II (AI II), disponível comercialmente **(Fig. 4.1A)**. Para alguns experimentos, nós usamos também um inibidor seletivo para AURKA denominado MLN8237 (MLN), também disponível comercialmente **(Fig. 4.1B)**.

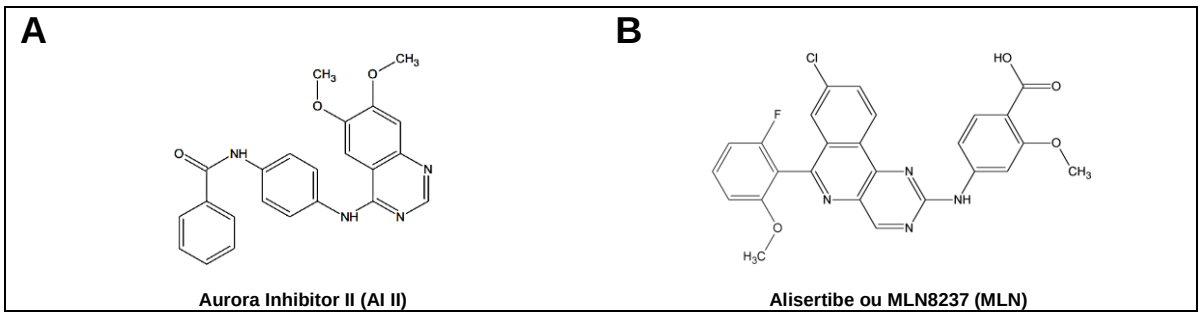


Fig 4.1. Estrutura de Aurora Inhibitor II (AI II) e MLN8237 (MLN). AI II é inibidor dual de AURKA e AURKB, um pouco mais seletivo para esta última (IC_{50} = 310 nM para AURKA e IC_{50} = 240 nM para AURKB). Já MLN inibe preferencialmente AURKA em baixas concentrações, e ambas AURKA e AURKB em concentrações elevadas (IC_{50} = 6,7 nM para AURKA e IC_{50} = 1534 nM para AURKB).

Para validar a inibição de AURKA e AURKB por AI II e MLN nós utilizamos células A549 previamente sincronizadas em mitose e tratadas com AI II, MLN ou DMSO (controle de solvente dos inibidores) e realizamos ensaios de imunofluorescência para verificar a atividade de AURKA ou AURKB em prometáfase e metáfase. Uma vez que AURKA e AURKB são ativadas por autofosforilação de uma treonina no domínio catalítico da proteína, espera-se que a inibição destas quinases pelos inibidores diminua a fosforilação dessas proteínas. Assim, experimentos de imunofluorescência **(Fig. 4.2)** ou de *western blot* **(Fig. 4.3)** mostram que AI II reduz a atividade, tanto de AURKA, quanto de AURKB em

prometáfase e metáfase (fases do ciclo celular de máxima expressão destas proteínas), enquanto que MLN reduz preferencialmente a atividade de AURKA, como esperado.

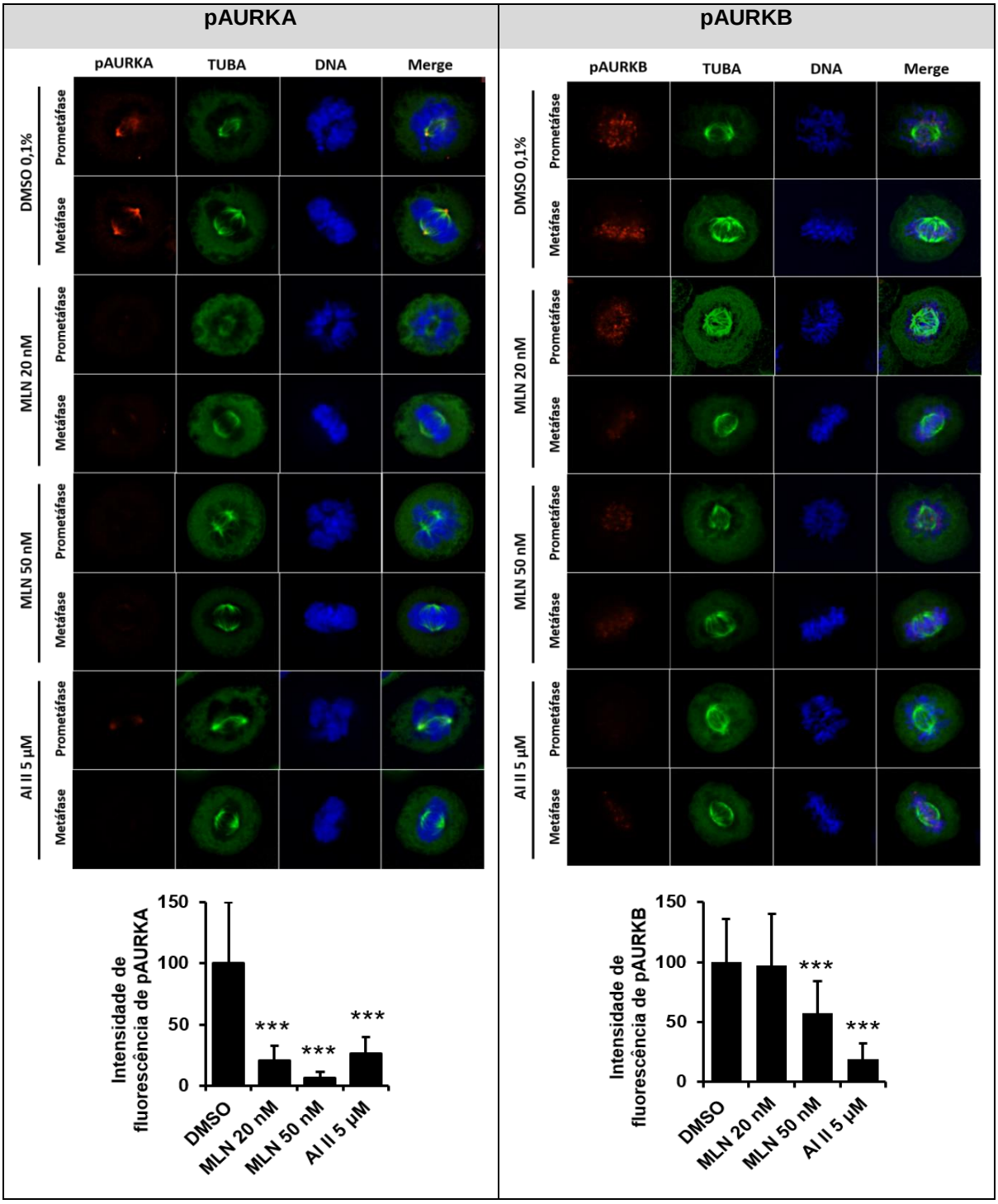


Fig. 4.2. Avaliação da inibição de AURKA e AURKB por MLN e AI II por imunofluorescência. Células A549 foram sincronizadas em fase S com timidina e posteriormente induzidas a ciclar até a fase G2/M na presença de MLN, AI II ou DMSO 0,1% (controle de solvente do inibidor). A análise da expressão de pAURKA e pAURKB mostra que concentrações baixas de MLN inibem a ativação de AURKA, enquanto que concentrações mais altas inibem também AURKB. Já o tratamento com AI II inibe tanto AURKA quanto AURKB em prometáfase e metáfase (fases da mitose de expressão máxima dessas proteíans) ***Acima.*** Imagens representativas de três experimentos independentes. ***Abaixo***. Quantificação da intensidade de fluorescência de pAURKA ou pAURKB em prometáfase e metáfase de no mínimo 30 células mitóticas individuais para cada experimento independente, por meio do software NIS *Elements* (*Nikon*). As barras de erro representam a média ± 1 DP. A significância estatística foi determinada através do teste t de Student (***p<0,001, em relação aos respectivos controles).

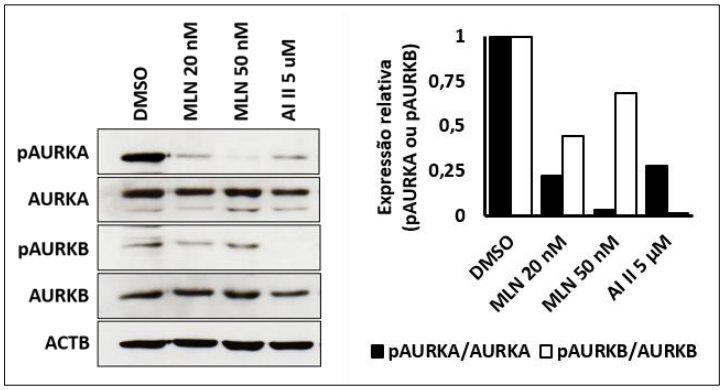


Fig. 4.3. Avaliação da inibição de AURKA e AURKB por *western blot* em extrato mitótico após tratamento com MLN ou AI II. Células A549 foram sincronizadas em fase S com timidina e posteriormente induzidas a ciclar até a fase G2/M na presença de MLN, AI II ou DMSO 0,1% (controle de solvente dos inibidores). A análise da expressão de pAURKA e pAURKB em extrato mitótico mostra que concentrações baixas de MLN inibem a ativação de AURKA, enquanto que concentrações mais altas inibem também AURKB. Já o tratamento com AI II inibe tanto AURKA quanto AURKB durante a mitose ***Esqueda.*** Imagens representativas de três experimentos independentes. ***Direita***. Quantificação densitométrica das bandas mostradas à direita, por meio do software *Image*J. Os resultados são mostrados como razão pAURKA/AURKA ou pAURKB/AURKB.

Posteriormente, para verificar o mecanismo pelo qual a inibição dual de AURKA e AURKB por AI II reduz o crescimento, viabilidade e crescimento independente de ancoragem **(dos Santos, 2013)**, nós utilizamos ensaios de proliferação e morte celular baseados em citometria de fluxo. Assim, a análise da proliferação celular por citometria de fluxo baseada na incorporação de BrdU mostra que o tratamento com AII induz uma parada do ciclo celular em G2/M em células H358 (~ 17% para a maior concentração testada de AI II contra ~ 10% de células em fase G2/M na condição controle), bem como em células A549 (~ 20% para a maior concentração testada de AI II contra ~ 9% de células em fase G2/M na condição controle). Do mesmo modo, o tratamento com AI II induz uma menor fase S em células H358 (~ 37% para a maior concentração testada de AI II contra ~ 42% de células em fase S na condição controle), bem como em células A549 (~ 36% para a maior concentração testada de AI II contra ~ 44% de células em fase S na condição controle) **(Fig. 4.4)**.

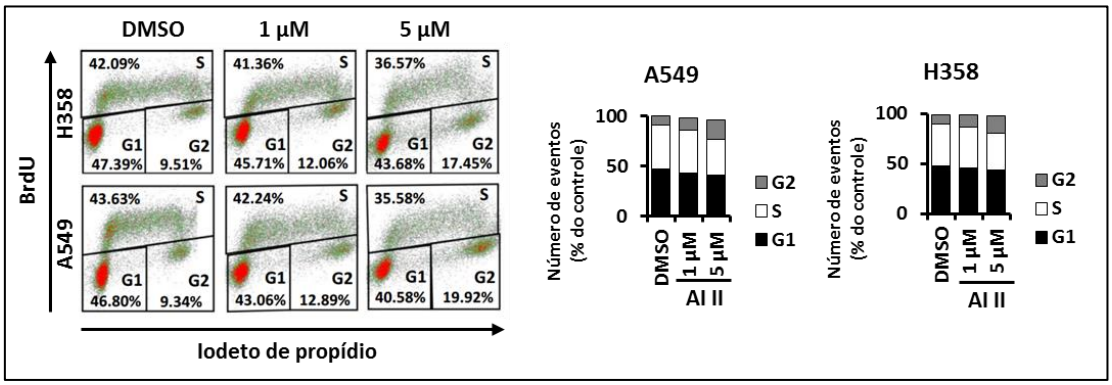


Fig. 4.4. A inibição farmacológica dual das quinases AURKA e AURKB reduz a proliferação de células portadoras de *KRAS* oncogênica. *Esquerda.* Ensaio de proliferação celular por citometria de fluxo baseada na incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU) e iodeto de propídeo (PI). Células A549 e H358 foram tratadas com as concentrações indicadas do inibidor AI II ou com DMSO (controle de veículo) por 72h. A distribuição das populações celulares estão indicadas. ***Direita.*** Representação gráfica da distribuição nas fases do ciclo celular dos eventos mostrados à esquerda.

Uma vez demonstrado que a inibição das quinases Aurora induz menor proliferação *in vitro*, nós decidimos investigar mais profundamente as alterações no ciclo celular associadas à inibição farmacológica destas quinases em células portadoras de mutações em *KRAS*. Para tanto, nós utilizamos células A549 previamente bloqueadas em fase S com timidina e, posteriormente sincronizadas em fase G2/M **(Fig. 4.5)**, e realizamos o tratamento com AI II ou MLN, para inibir farmacologicamente AURKA (MLN 20 nM) ou ambas AURKA e AURKB (MLN 20 nM ou AI II 5 uM). A seguir, essas células foram submetidas a ensaios de imageamento ao vivo por dois tempos distintos: o primeiro, compreendido entre 0 e 48 h a partir do momento do tratamento com inibidores; o segundo, compreendido entre 48 e 96 h a partir do momento do tratamento com inibidores. Nós, então, realizamos a observação direta célula a célula do tempo de ciclo celular, capacidade proliferativa e indução de mitoses anômalas ao longo de três gerações celulares consecutivas em cada vídeo **(Fig. 4.6)**.

Por meio da análise de três gerações celulares subsequentes para cada condição testada, nós observamos que a inibição de AURKA, com MLN 20 nM, ou ambas AURKA e AURKB, com MLN 50 nM, induz um prolongamento do ciclo celular, tanto em interfase (de 14,2 ± 2,5 h no controle DMSO para 23,2 ± 8,0 h na última interfase analisada com MLN 50 nM) **(Fig. 4.7)**, quanto em mitose (de 1,1 ± 0,3 h no controle DMSO para 3,1 ± 1,2 h na última mitose analisada com MLN 50 nM) **(Fig. 4.8)** de modo dose e geração dependente. Quando os tempos de mitose e interfase são combinados, MLN induz um prolongamento do ciclo celular, que também varia de modo dose e geração dependente (de 15,3 ± 2,7 h no controle DMSO para 23,4 ± 7,1 h no último ciclo celular completo analisado com MLN 50 nM) **(Fig. 4.9)**. Por outro lado, a inibição dual de AURKA e AURKB por AI II induz um prolongamento dos tempos médios de interfase (de 14,2 ± 2,5 h no controle DMSO para 32,7 ± 10,8 h na última interfase analisada com AI II 5 µM,), que supera o prolongamento da interfase induzido pela inibição de AURKA e AURKB por MLN 50 nM **(Fig. 4.7)**.

Além disso, nós também observamos prolongamento dos tempos médios da mitose, que parece aumentar com o tempo de tratamento (de 1,7 ± 1,0 h no controle DMSO para 2,5 ± 2,1 h na última mitose analisada no tratamento com AI II 5 µM) **(Fig. 4.8)**. Quando analisadas conjuntamente interfase e mitose, a inibição de AURKA e AURKB por AI II induz um severo prolongamento dos tempos de divisão celular, de modo dose e geração dependente (de 15,7 ± 3,1 h no controle DMSO para 23,5 ± 11,3 h no último ciclo celular completo analisado com AI II 5 µM) **(Fig. 4.9)**.

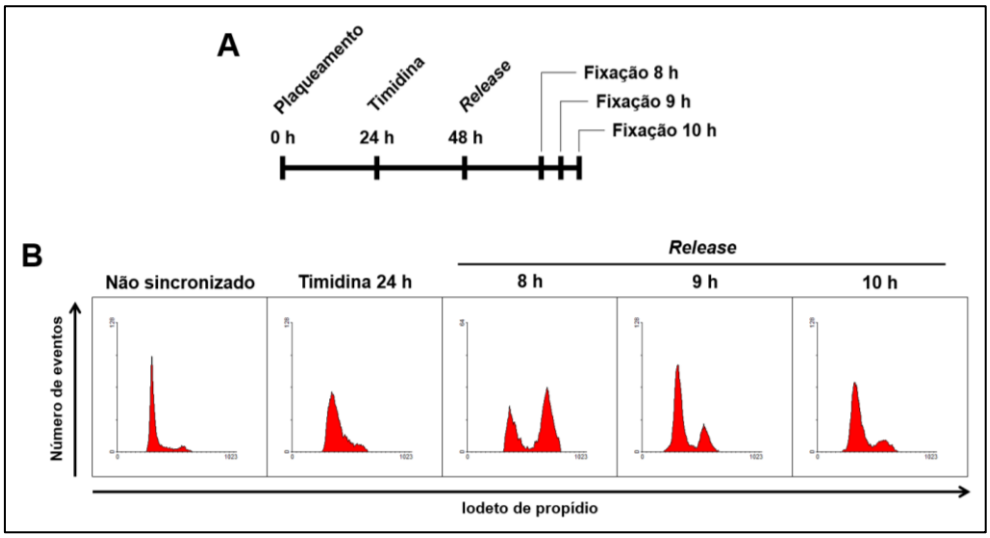


Fig. 4.5. Sincronização com timidina e *time-course* do *release* de células A549. (A) Células A549 foram bloqueadas em fase S com timidina por 24h, seguido do *release* induzido por deoxicitina, e a análise feita após tempos diversos de coleta. **(B)** Células não sincronizadas apresentam uma distriuição populacional normal ao longo do ciclo celular, enquanto que o bloqueio com timidina induz parada do ciclo celular no final da fase S. Após 8 h de *release*, a populacao de células em fase G2/M aumenta grandemente, atingindo a proporção máxima de células em mitose, e novamente diminuindo após 10 h. Esse tempo de bloqueio e *release* (24 h + 8 h) foi, então, estabelecido para os experimentos seguintes nos quais se espera obter um grande número de células em mitose.

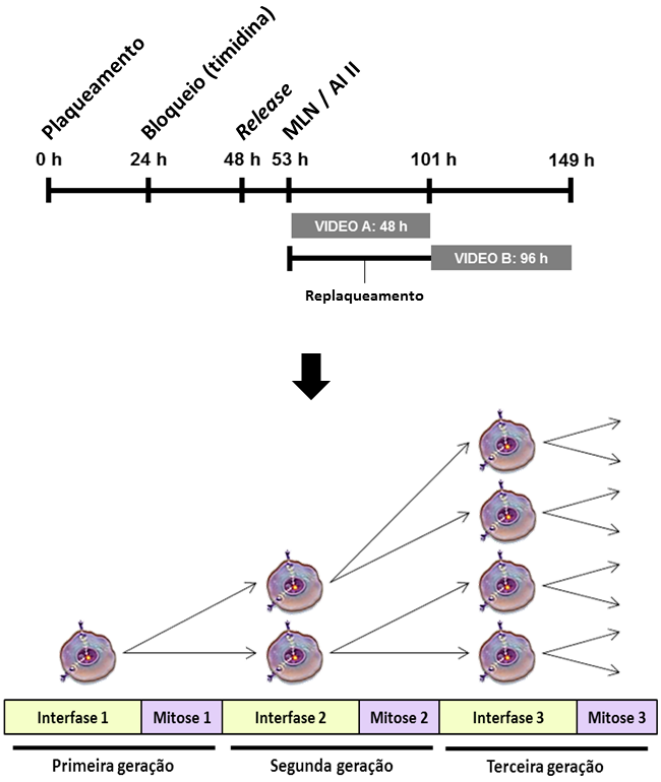
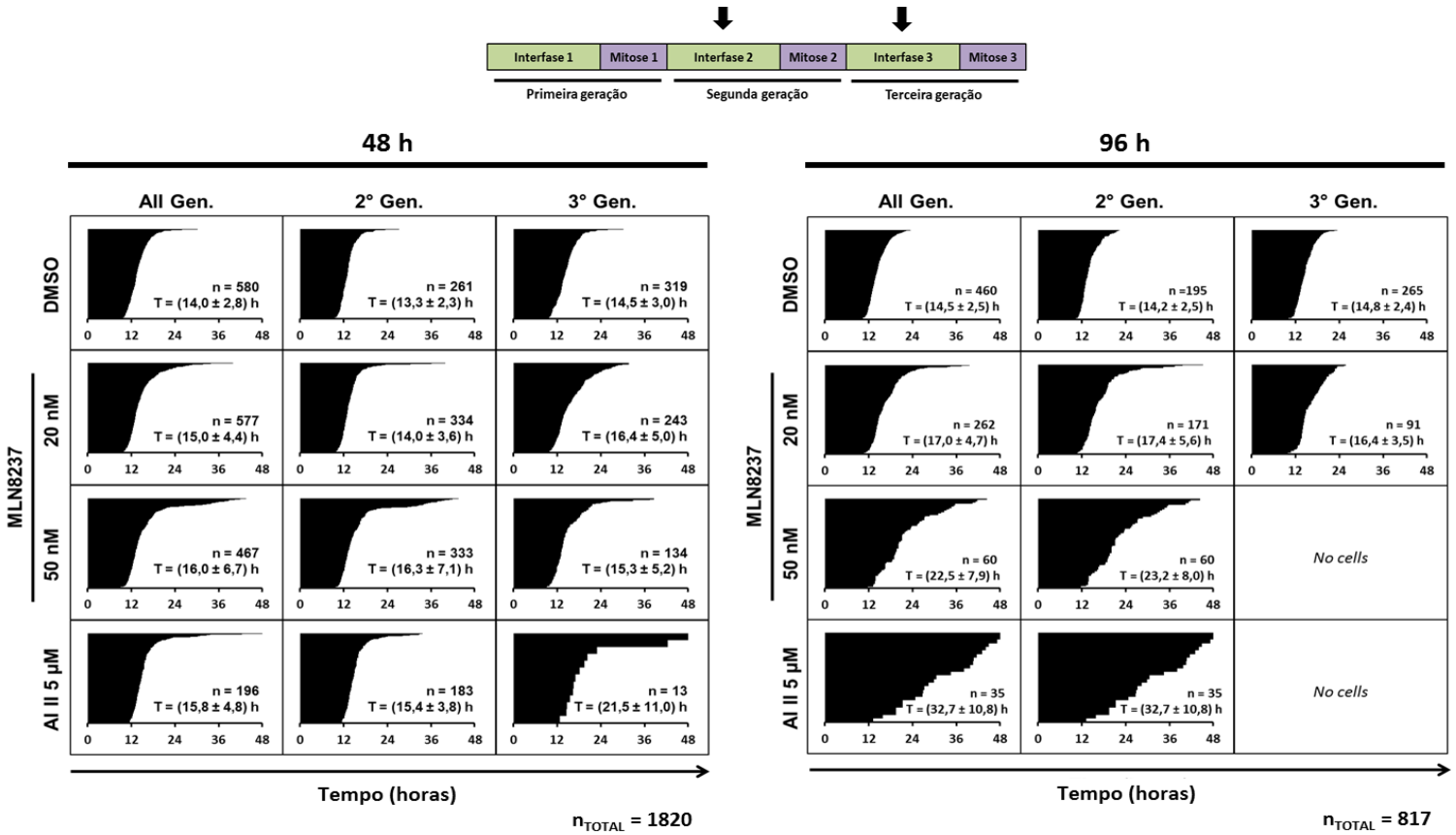


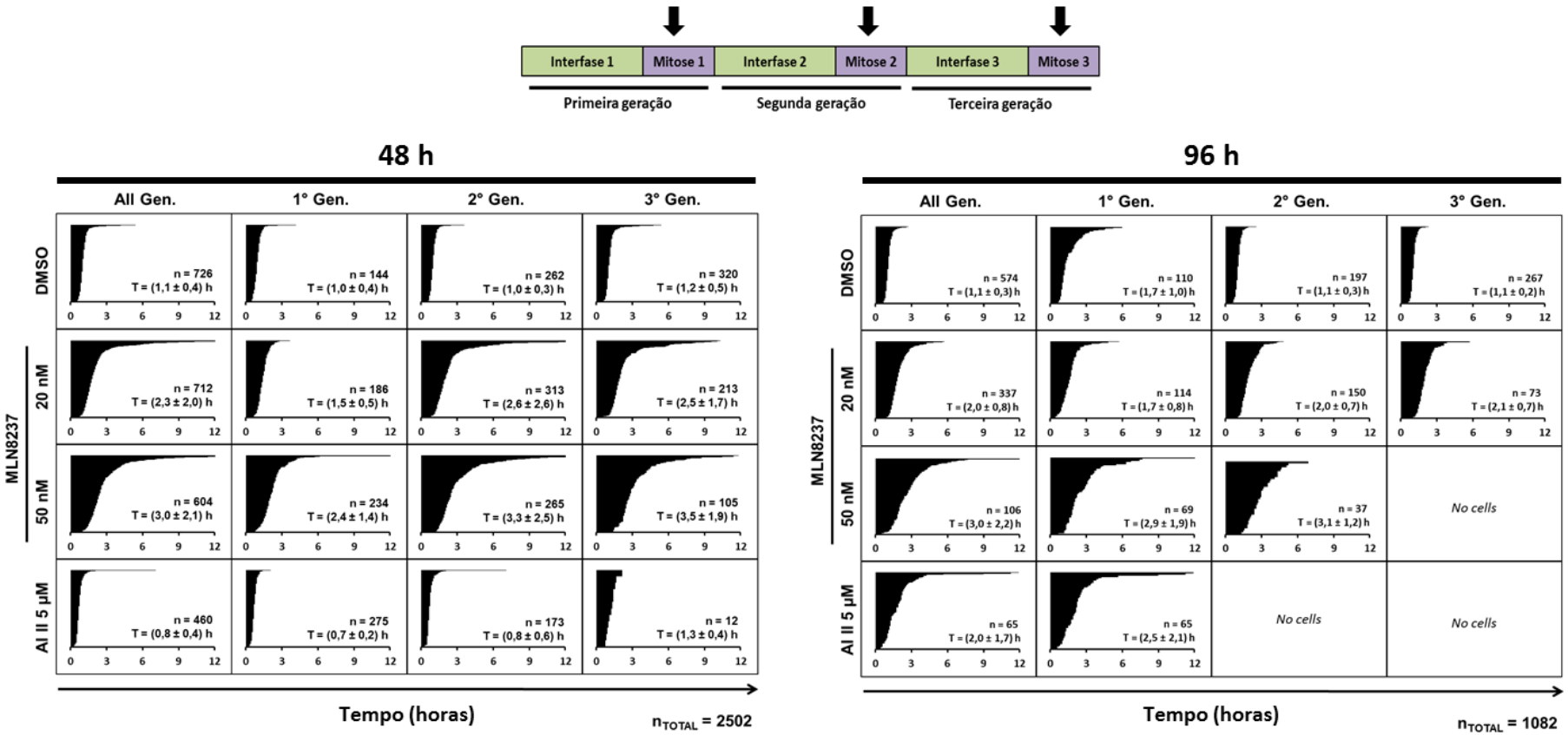
Fig. 4.6. Esquema de análise do ciclo celular por técnicas de *time-lapse* para células A549 tratadas com MLN ou AI II. *Acima*. Células A549 foram plaqueadas e bloqueadas em fase S com timidina por 24 h, seguindo do *release* da timidina com desoxicitidina por 8 h, para que as células fossem sincronizadas em fase G2/M. Dois vídeos independentes foram analisados; o primeiro, do momento do tratamento pelas 48 h seguintes; o segundo, começando 48h após o replaqueamento dessas células, totalizando 96 h de tratamento com inibidores. ***Abaixo.*** Para cada vídeo (0-48 h ou 48-96 h) nós analisamos três gerações celulares independentes; a primeira, compreendida do início da primeira interfase até o final da mitose seguinte; a segunda, do início da segunda interfase até o final da mitose conseguinte; e a terceira, do início da terceira interfase até o final da mitose conseguinte.



	DMSO	MLN8237 20 nM	MLN8237 50 nM	AI II
2° Gen.	*Ref.*	*Ref.*	*Ref.*	*Ref.*
3° Gen.	****	****	*n.s.*	*n.s.*

	DMSO	MLN8237 20 nM	MLN8237 50 nM	AI II
2° Gen.	*Ref.*	*Ref.*	*Ref.*	*Ref.*
3° Gen.	*n.s.*	n.s.	-	-

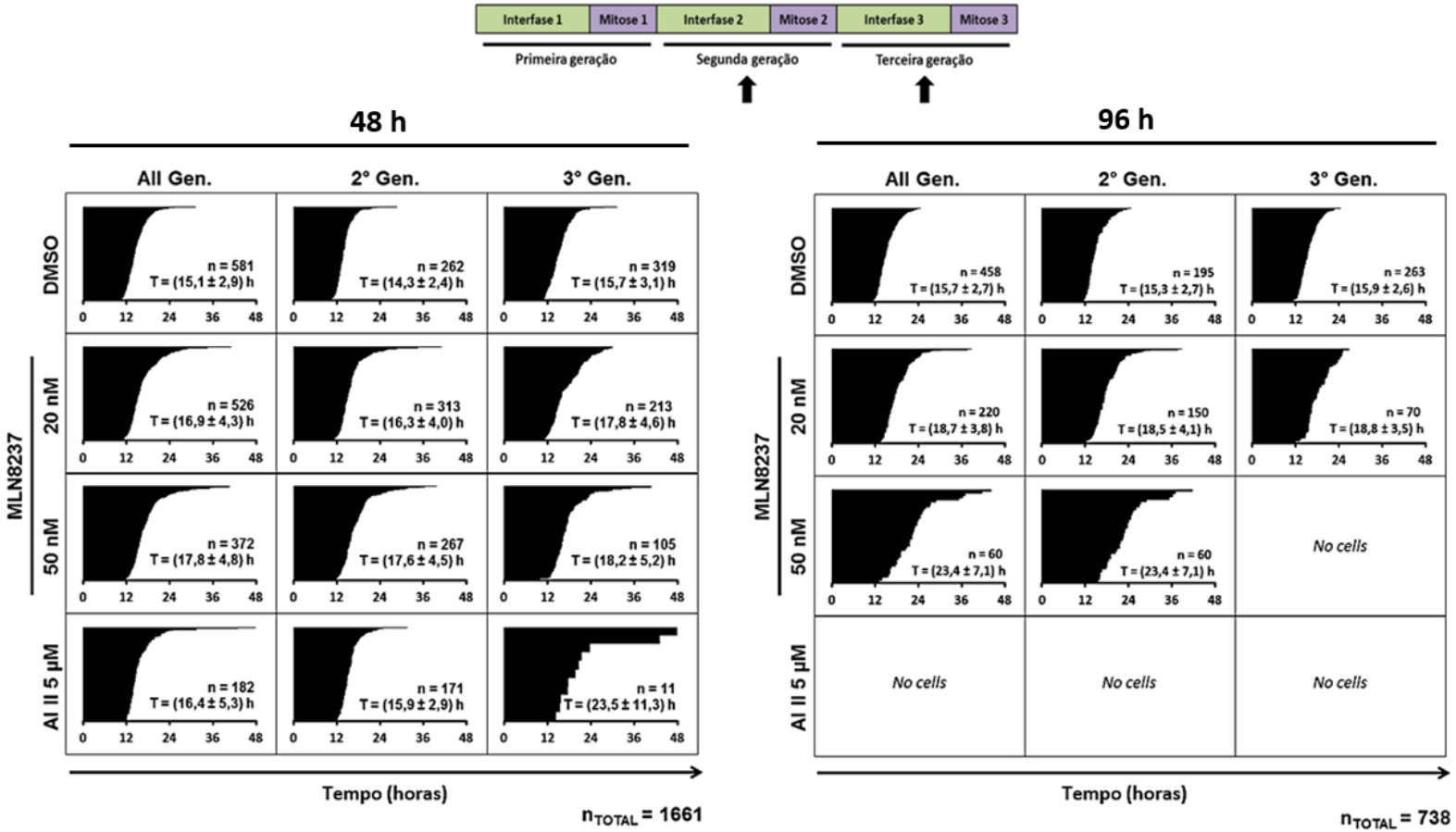
Fig. 4.7. A inibição de AURKA e/ou AURKB em células portadoras de mutação em *KRAS* altera os tempos de interfase de modo dose e geração dependente. Células A549 foram tratadas com as concentrações indicadas de DMSO, MLN ou AI II e submetidas à análise da divisão celular por imageamento em tempo real ao longo de três divisões celulares sucessivas (1° Gen., 2° Gen. e 3° Gen) ou considerando todas as gerações celulares conjuntamente (All Gen.). A inibição de AURKA por MLN ou AURKA e AURKB por MLN ou AI II induz um prolongamento do tempo de interfase, sobretudo em gerações celulares mais avançadas. ***Acima.*** Representação gráfica dos tempos de interfase analisados ao longo de três gerações celulares consecutivas. Os tempos de primeira interfase não podem ser analisados porque coincidem com o início do cada vídeo. ***Abaixo.*** Análise estatística realizada por meio do teste t de *Student* para terceira interfase em referência à segunda interfase (*Ref*), considerando-se as amostras estatisticamente significativas como a seguir: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001; n.s.: estatisticamente não significativo.



	DMSO	MLN8237 20 nM	MLN8237 50 nM	AI II
1° Gen.	*Ref.*	*Ref.*	*Ref.*	*Ref.*
2° Gen.	*n.s.*	****	****	*n.s.*
3° Gen.	***	****	****	***

	DMSO	MLN8237 20 nM	MLN8237 50 nM	AI II
1° Gen.	*Ref.*	*Ref.*	*Ref.*	*Ref.*
2° Gen.	****	***	*n.s.*	-
3° Gen.	****	***	-	-

Fig. 4.8. A inibição de AURKA e/ou AURKB em células portadoras de mutação em *KRAS* altera os tempos de mitose de modo dose e geração dependente. Células A549 foram tratadas com as concentrações indicadas de DMSO, MLN ou AI II e submetidas à análise da divisão celular por imageamento em tempo real ao longo de três divisões celulares sucessivas (1° Gen., 2° Gen. e 3° Gen) ou considerando todas as gerações celulares conjuntamente (All Gen.). A inibição de AURKA por MLN ou AURKA e AURKB por MLN ou AI II induz um prolongamento do tempo de mitose, sobretudo em gerações celulares mais avançadas. ***Acima.*** Representação gráfica dos tempos de mitose analisados ao longo de três gerações celulares consecutivas. ***Abaixo.*** Análise estatística realizada por meio do teste t de *Student* para a segunda e terceira mitoses em referência à primeira mitose em cada vídeo (*Ref*), considerando-se as amostras estatisticamente significativas como a seguir: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001; n.s.: estatisticamente não significativo.



	DMSO	MLN8237 20 nM	MLN8237 50 nM	Al II
2° Gen.	*Ref.*	*Ref.*	*Ref.*	*Ref.*
3° Gen.	****	***	*n.s.*	*n.s.*

	DMSO	MLN8237 20 nM	MLN8237 50 nM	Al II
2° Gen.	*Ref.*	*Ref.*	*Ref.*	*Ref.*
3° Gen.	*n.s.*	n.s.	-	-

Fig. 4.9. A inibição de AURKA e/ou AURKB em células portadoras de mutação em KRAS altera os tempos de ciclo celular de modo dose e geração dependente. Células A549 foram tratadas com as concentrações indicadas de DMSO, MLN ou Al II e submetidas à análise da divisão celular por imageamento em tempo real ao longo de três divisões celulares sucessivas (1° Gen., 2° Gen. e 3° Gen) ou considerando todas as gerações celulares conjuntamente (All Gen.). A inibição de AURKA por MLN ou AURKA e AURKB por MLN ou Al II induz um prolongamento dos tempos de ciclo celular. ***Acima.*** Representação gráfica dos tempos de ciclo celular analisados ao longo de três ciclos celulares completos consecutivos. Os tempos de primeira interfase, e consequentemente do primeiro ciclo celular completo, não podem ser analisados porque coincidem com o início do cada vídeo. ***Abaixo.*** Análise estatística realizada por meio do teste t de *Student* para o terceiro ciclo celular completo em referência ao anterior (*Ref*), considerando-se as amostras estatisticamente significativas como a seguir: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001; n.s.: estatisticamente não significativo.

Para corroborar nossos ensaios de *time-lapse*, nós investigamos, posteriormente, quais os efeitos da inibição de AURKA e/ou AURKB sobre a progressão mitótica de células A549. Utilizando células previamente sincronizadas em G2/M e tratadas com MLN ou AI II por 4 h, nós nos baseamos na distribuição da cromatina e organização do fuso mitótico para realizar a contagem de células nas diferentes fases da mitose celular. Nossos resultados demonstraram novamente que a inibição de AURKA por MLN 20 nM induz acúmulo em prometáfase (46,1 ± 5,0% para células tratadas com MLN 20 nM, contra 35,1 ± 1,1% na condição controle), que aumenta com a inibição dual de AURKA e AURKB por MLN 50 nM (53,4 ± 5,8%), e que é responsável pelo maior tempo de mitose observado em ensaios de *time-lapse*. Particularmente, AI II induz um acúmulo ainda maior de células em prometáfase (85,5 ± 1,3%) **(Fig. 4.10).**

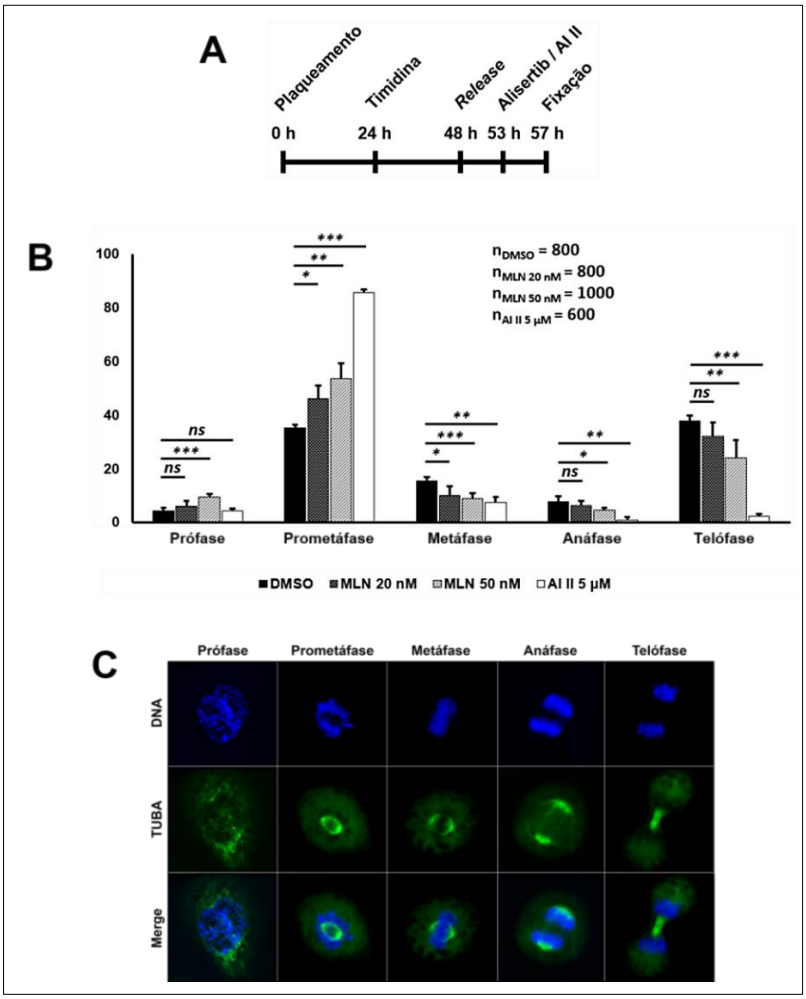


Fig. 4.10. Análise da progressão mitótica em células A549 após a inibição de AURKA e/ou AURKB. (A) Células A549 foram bloqueadas em fase S com timidina por 24 h e relaxadas com deoxicitidina por 9 horas, permitindo o acúmulo de células mitóticas em G2/M. Concomitantemente, estas células foram tratadas com MLN ou AI II, nas concentrações indicadas, pelas 4 horas anteriores à fixação e submetidas à analise da progressão mitótica. **(B)** Quantificação da estratificação celular em função de sua fase em mitose. Os valores representam a média ± desvio padrão de, no mínimo, três experimentos independentes para cada condiçao testada. O número (n) de células avaliadas para cada condição está indicado. **(C)** Imagens representativas das fases de mitose e critérios abordados para a classificação.

Esses resultados explicariam, em parte, nossos ensaios prévios mostrando que a inibição farmacológica de AURKA e AURKB por AI II induz redução do crescimento e proliferação celulares. Para checar essa hipótese, nós decidimos avaliar qual a proporção de células mitóticas observáveis ao longo de cada geração celular em função do tratamento com MLN ou AI II. Nossos resultados demonstram que, para cada célula controle (DMSO) que completa uma primeira divisão mitótica, apenas 1,7 são capazes de dividir-se novamente, e 2,6 células atingem uma terceira divisão mitótica. A inibição de AURKA, por MLN 20 nM, reduz essa proporção para 1:1,6:1,4. Já a inibição dual de AURKA e AURKB por MLN 50 nM induz uma taxa de divisão mitótica de 1:1,1:0,9, enquanto que AI II reduz essa proporção para 1:0,6:0,1. Assim, esses resultados não somente corroboram nossos ensaios de proliferação e crescimento celular, mas mostram que a inibição de AURKA e/ou AURKB induz uma redução do crescimento celular de modo geração dependente **(Fig. 4.11A).** Ademais, em nossos ensaios de *time-lapse,* nós observamos que a inibição de AURKA e/ou AURKB induz a perda completa da capacidade proliferativa em algumas células. A proporção de células que permanece em interfase, sem jamais entrar em mitose, ao longo de 48 h de vídeo em cada caso (*non dividing cells*, NDC) aumenta de modo dose e tempo dependente, mostrando que AURKA e AURKB são fundamentais para a entrada em mitose **(Fig. 4.11B)**.

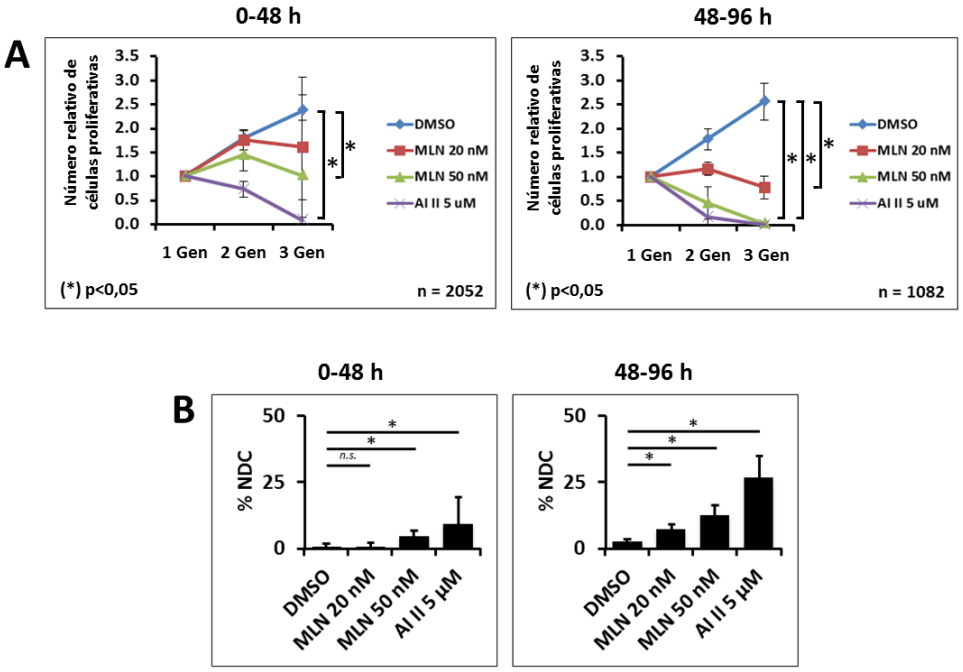


Fig. 4.11. A inibição de AURKA e/ou AURKB reduz a proliferação celular. (A) Proporção de células mitóticas observáveis na segunda e terceira gerações mitóticas, em relação a cada célula que se divide na primeira geração mitótica. A inibição farmacológica de AURKA e/ou AURKB por MLN ou AI II reduz significativamente a presença de mitoses observáveis em células A549, de modo geração dependente, seja de 0 a 48 h, seja de 48 a 96 h de tratamento. **(B)** A inibição de AURKA e/ou AURKB induz um aumento da população de células em interfase que não entram em mitose (*non divinding cells*, NDC) ao longo de 48 h de análise em ambos os vídeos, sugerindo um papel importante dessas quinases sobre a proliferação celular.

Além de estudar os efeitos da inibição das quinases AURKA e AURKB sobre o tempo de ciclo celular, nós estudamos também os efeitos dessa inibição sobre a estabilidade mitótica. Esta abordagem é extremamente importante, uma vez que se espera que estratégias terapêuticas contra o câncer sejam capazes de inibir o crescimento e a proliferação celular, sem, contudo, causar alterações genéticas que são uma pré-disposição à oncogenicidade celular. Para tanto, nós utilizamos o mesmo modelo descrito acima para avaliar, por técnicas de imageamento ao vivo, a indução de mitoses anômalas em células A549 após a inibição de AURKA e/ou AURKB por MLN ou AI II.

Nossos resultados demonstram que a inibição de AURKA por MLN 20 nM induz aumento da ocorrência de anomalias mitóticas, incluindo *blebbings* em telófase, que são protuberâncias da membrana plasmática causadas pela perturbação da estrutura do citoesqueleto e geralmente associadas ao estresse químico mediado por quimioterápicos, apoptose, necrose ou migração celular **(Charras, 2008)**, e erros de orientação do fuso mitótico, caracterizado pela presença de células mitóticas filhas sobrepostas **(Figs. 4.12 e 4.13)**. A inibição de AURKA combinada com AURKB por MLN 50 nM induz, sobretudo, *blebbings* associados à falha de citocinese, que leva à formação de células hiperploides, e a consequente formação de fusos mitóticos multipolares característicos de células hiperploides **(Figs. 4.12 e 4.13)**. Além disso, nós também observamos que, em ambas as concentrações testadas de MLN, a ocorrência de mitoses anômalas ocorre em maior proporção em células de segunda e terceira gerações mitóticas, que já acumularam defeitos de mitose em uma primeira divisão celular anormal **(Figs. 4.12 e 4.13)**. Por fim, a inibição de AURKA e AURKB por AI II induz uma entrada em mitose aparentemente normal, que progride até a prometáfase. As células, entretanto, impossibilitadas de prosseguirem no ciclo celular durante a primeira geração mitótica, retornam à interfase após uma tentativa frustrada de citocinese, gerando hiperploidia. Células de segunda e terceira gerações mitóticas (que já acumularam erros de divisão celular), como anteriormente dito, ciclam até a prometáfase e rapidamente retornam à interfase, sem, contudo, mostrar tentativas de citocinese **(Figs. 4.12 e 4.13)**. De qualquer maneira, a inibição conjunta de AURKA e AURKB em células A549 induziu hiperploidia intermitente, uma vez que ao longo de vários ciclos, as células continuavam a duplicar material genético, aumentando o volume celular, sem, contudo, dividir-se. A **Fig. 4.12** mostra todas as anomalias mitóticas identificadas em nossos experimentos de *time-lapse*, enquanto que a **Fig. 4.13** mostra a frequência e distribuição dessas anomalias em função da inibição de AURKA e/ou AURKB em células A549.

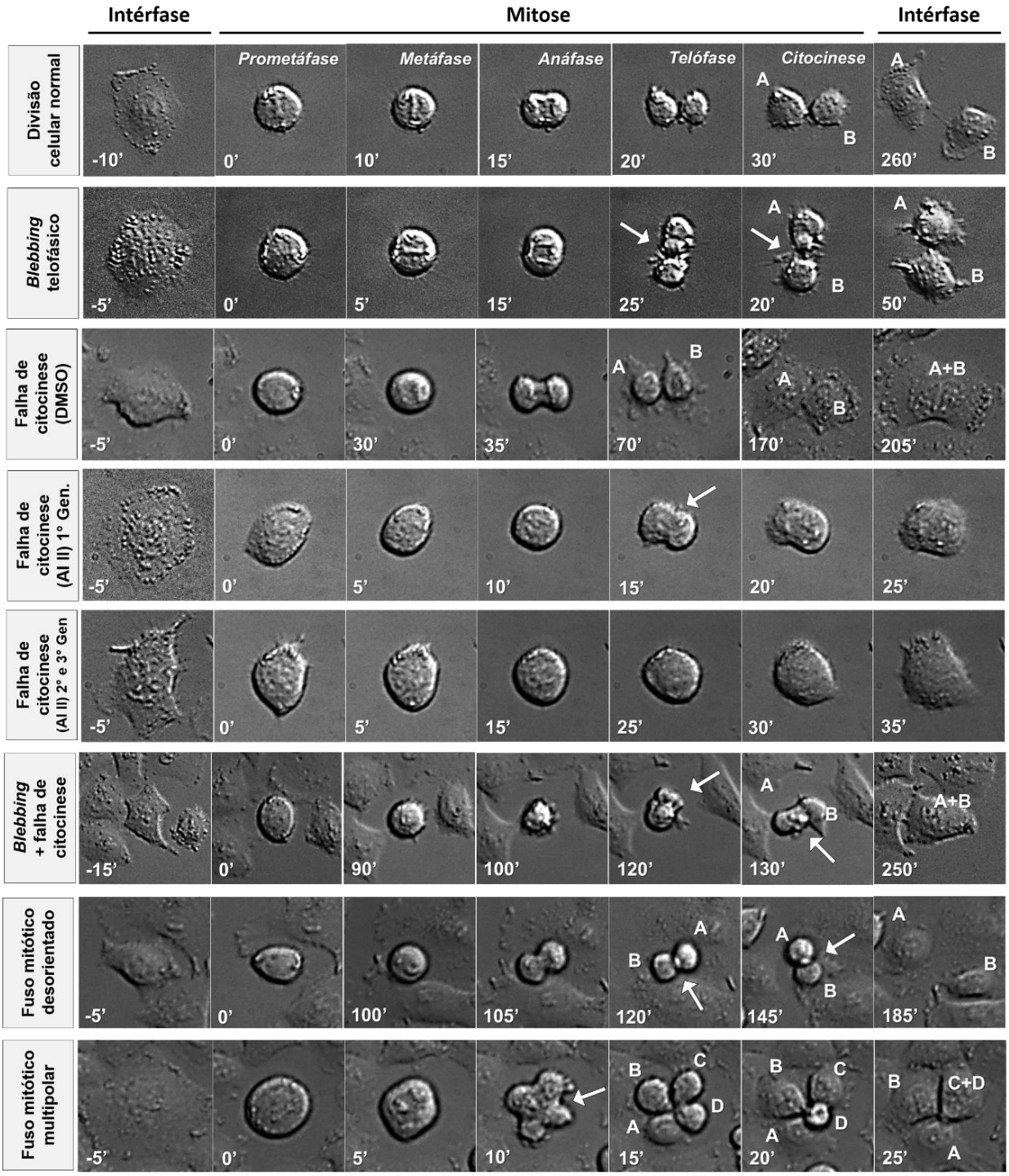


Fig. 4.12. Painel representativo das anomalias mitóticas induzidas pela inibição de AURKA e/ou AURKB observáveis por microscopia de *time-lapse* em células A549. Células A549, previamente bloqueadas em fase S por timidina e, posteriormente, sincronizadas em fase G2/M, foram tratadas com MLN, AI II ou DMSO (controle de solvente dos inibidores) e submetidas à análise por microscopia de *time-lapse* em intervalos de 0 a 48 h ou 48 a 96 h a partir do momento do tratamento com inibidores, para a observação de anomalias mitóticas ao longo de três gerações celulares consecutivas. A primeira linha deste painel representa uma divisão celular normal para a qual é possível identificar todas as fases da mitose. As alterações mitóticas observadas estão representadas neste painel em todas as demais linhas, independentemente do tratamento realizado, e são comuns à todas as condições testadas, salvo quando expressamente indicado. A duração da mitose em cada caso está representada em minutos (canto inferior esquerdo) e valores negativos representam a interfase precedente à mitose celular. A interfase subsequente representa o momento exato no qual essas células readerem à placa, terminando a divisão celular. As setas apenas evidenciam a presença de defeitos associados à mitose. A, B, C e D representam células filhas geradas a partir da mitose representada. A+B e C+D representam falhas de citocinese geradas a partir de pelo menos duas células filhas em cada mitose representada.

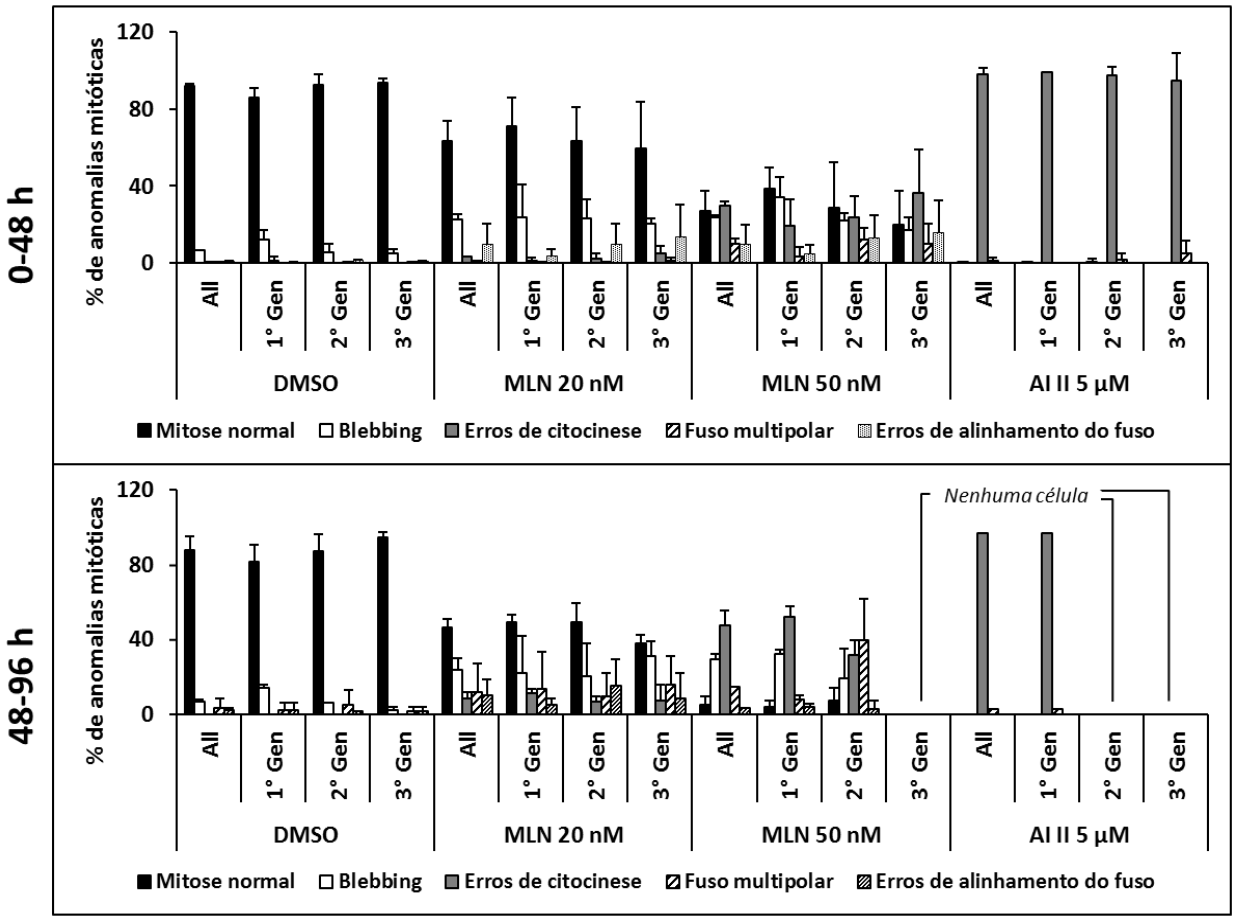


Fig. 4.13. Representação gráfica da frequência e distribuição das principais anomalias mitóticas induzidas pela inibição de AURKA e/ou AURKB em células A549. Células A549, previamente bloqueadas em fase S por timidina e, posteriormente, sincronizadas em fase G2/M, foram tratadas com MLN, AI II ou DMSO (controle de solvente dos inibidores) e submetidas à análise por microscopia de *time-lapse* em intervalos de 0 a 48 h ou 48 a 96 h a partir do momento do tratamento com inibidores, para a observação de anomalias mitóticas ao longo de três gerações celulares consecutivas. A ocorrência de *blebbings* e erros de citocinese não sofre variação ao longo das gerações mitóticas consecutivas, mas aumenta de modo tempo-dependente. Por outro lado, a ocorrência de fusos multipolares e erros de alinhamento do fuso aumentam de modo geração- e tempo-dependente. Células de terceira geração para MLN 50 nM e segunda e terceira gerações para AI II 5 µM (48-96 h de tratamento) não puderam ser analisadas porque células de gerações precedentes não se dividem antes do término de 48 h de análise em cada caso.

Posteriormente, para corroborar nossos experimentos de *time-lapse*, nós lançamos mão de técnicas de fluorescência para avaliar a presença de mitoses anômalas em lâminas fixadas. Utilizando o mesmo protocolo de bloqueio com timidina em fase S e sincronização de células em fase G2/M para células A549 **(Fig. 4.10A)**, e analisando a distribuição da cromatina e organização do fuso mitótico, nós observamos que a inibição de AURKA, sozinha ou combinada com a inibição de AURKB, induz erros de formação do fuso mitótico, incluindo a presença de extrapolos, micronúcleos, fusos desorganizados e fusos monopolares e multipolares **(Fig. 4.14)**.

Embora algumas anomalias mitóticas descritas em nossos experimentos de *time-lapse*, como *blebbings* telofásicos e falhas de citocinese, sejam tecnicamente difíceis de serem observadas em células fixadas, nossos resultados da pesquisa de anomalias em células fixadas corroboram a

observação da indução de mitoses multipolares ou com fuso mitótico desorientado em ensaios de *time-lapse* pela inibição de AURKA e/ou AURKB.

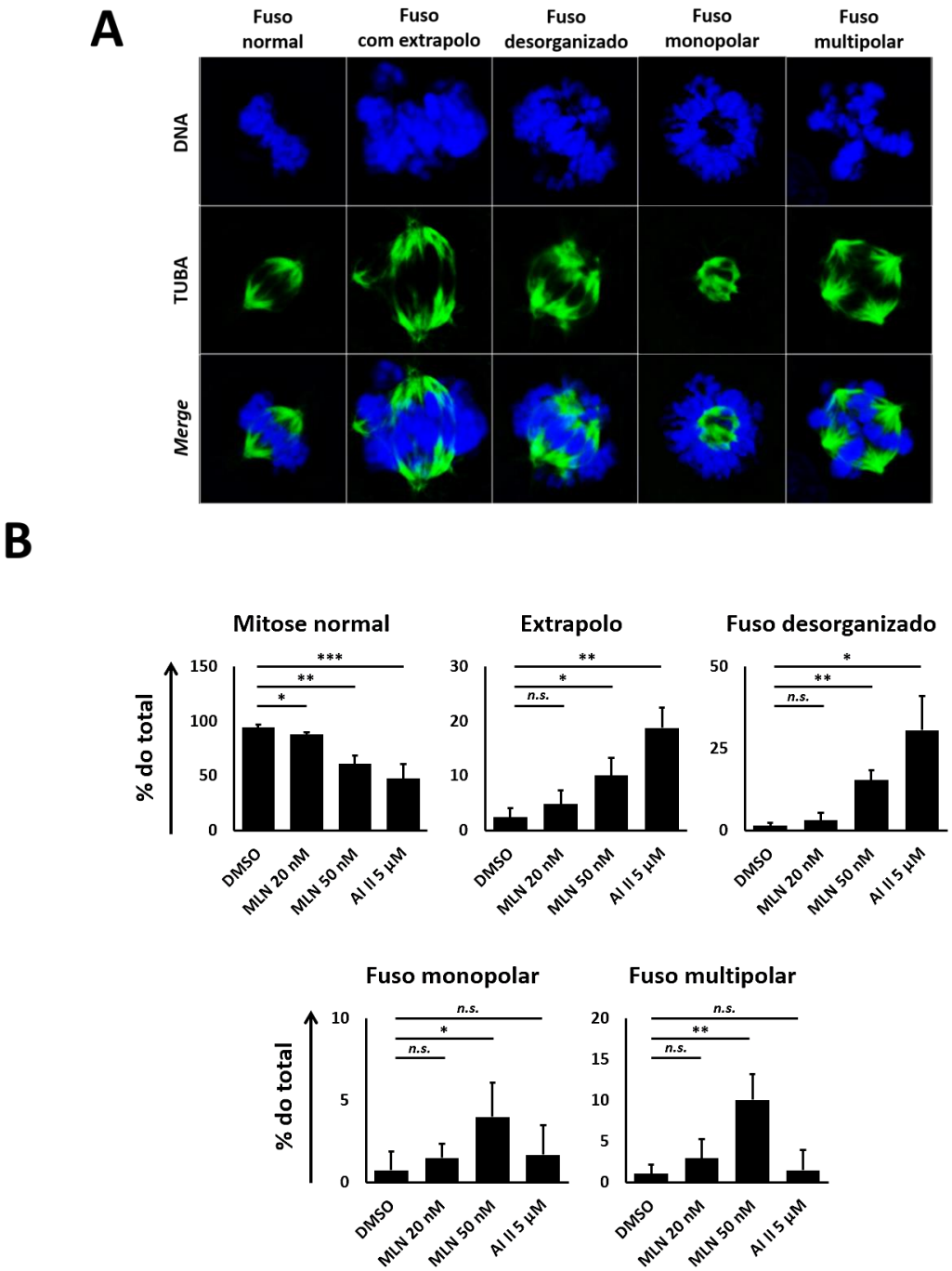


Fig. 4.14. Frequência e distribuição das anomalias mitóticas induzidas pela inibição das quinases AURKA e/ou AURKB em células A549. A inibicão de AURKA (por MLN 20 nM) ou ambas as quinases AURKA e AURKB (por MLN 50 nM ou AI II 5 µM) induz a ocorrência de mitoses anômalas em função da indução de diversos defeitos na formação do fuso mitótico, como fusos desorganizados, com extrapolo, monopolares e multipolares. **(A)** Imagens representativas de células mitóticas anômalas e os critérios usados para sua classificação. **(B)** Frequência e distribuição das anomalias mitóticas representadas em (A), para células A549, em função do tratamento com MLN ou AI II. As barras de erro representam a média ± 1 DP. A significância estatística foi determinada através do teste t de Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001, n.s.: estatisticamente não significativo).

Uma vez observado em nossos ensaios de *time-lapse* que a inibição farmacológica das quinases AURKA e AURKB induz erros de citocinese e, portanto, poliploidia, nós decidimos investigar mais detalhadamente os efeitos de MLN e AI II sobre a indução da poliploidização em células A549. Para tanto, nós utilizamos células A549 previamente bloqueadas em fase S e, posteriormente, sincronizadas em fase G2/M e realizamos o tratamento com DMSO, MLN ou AI II por 24 h, 48 h ou 96 h. A seguir nós realizamos a marcação imunológica de PCNT (pericentrina), como marcador de amplificação do centrossomo.

Em uma célula mitótica normal, o centrossomo consiste de dois centríolos circundados pelo material pericentriolar, do qual PCNT é um dos principais componentes estruturais. A amplificação do centrossomo é caracterizada pela combinação entre o aumento em número de centrossomos, tamanho e estrutura e função centroméricas anormais **(D'Assoro et al, 2002; Kramer et al, 2002; Nigg, 2002)**. Portanto, o aumento da expressão e área da proteína centrossomérica PCNT foi escolhido como marcador da amplificação do centrossomo. Igualmente importante, uma vez que a amplificação do centrossomo está fortemente associada a estágios avançados do desenvolvimento de diversos tumores, bem como com o desenvolvimento de aneuploidia e instabilidade genética **(Pihan et al, 1998; Lingle et al, 1998; Lingle et al, 1999; Gustafson et al, 2000; Philan et al, 2001)**, PCNT foi também utilizado como marcador para a avaliação dos efeitos da inibição de AURKA /ou AURKB sobre a ploidia e estabilidade genética.

Nós observamos, inicialmente, uma variação do tamanho do núcleo celular, que aumenta gradativamente, em função do tratamento com MLN ou AI II, de modo dose-dependente para o tratamento com MLN e tempo-dependente para todas as condições testadas **(Fig. 4.15 e Fig. 4.16A)**, sugerindo mais uma vez que a inibição de AURKA e/ou AURKB induz falha de citocinese e multinucleação. Mais importante, nós também observamos que a inibição de AURKA e/ou AURKB por MLN ou AI II, induz o aumento tanto na área (múltiplos *spots* ou agregados pericentriolares), quanto na intensidade de fluorescência de PCNT, novamente de modo dose-dependente para o tratamento com MLN e tempo-dependente para todas as condições testadas **(Fig. 4.15 e Fig. 4.16B e C)**. Isso sugere que a inibição de AURKA e AURKB induz progressivas falhas de citocinese, gerando poliploidização intermitente e amplificação do centrossomo associada à aneuploidia e instabilidade genética.

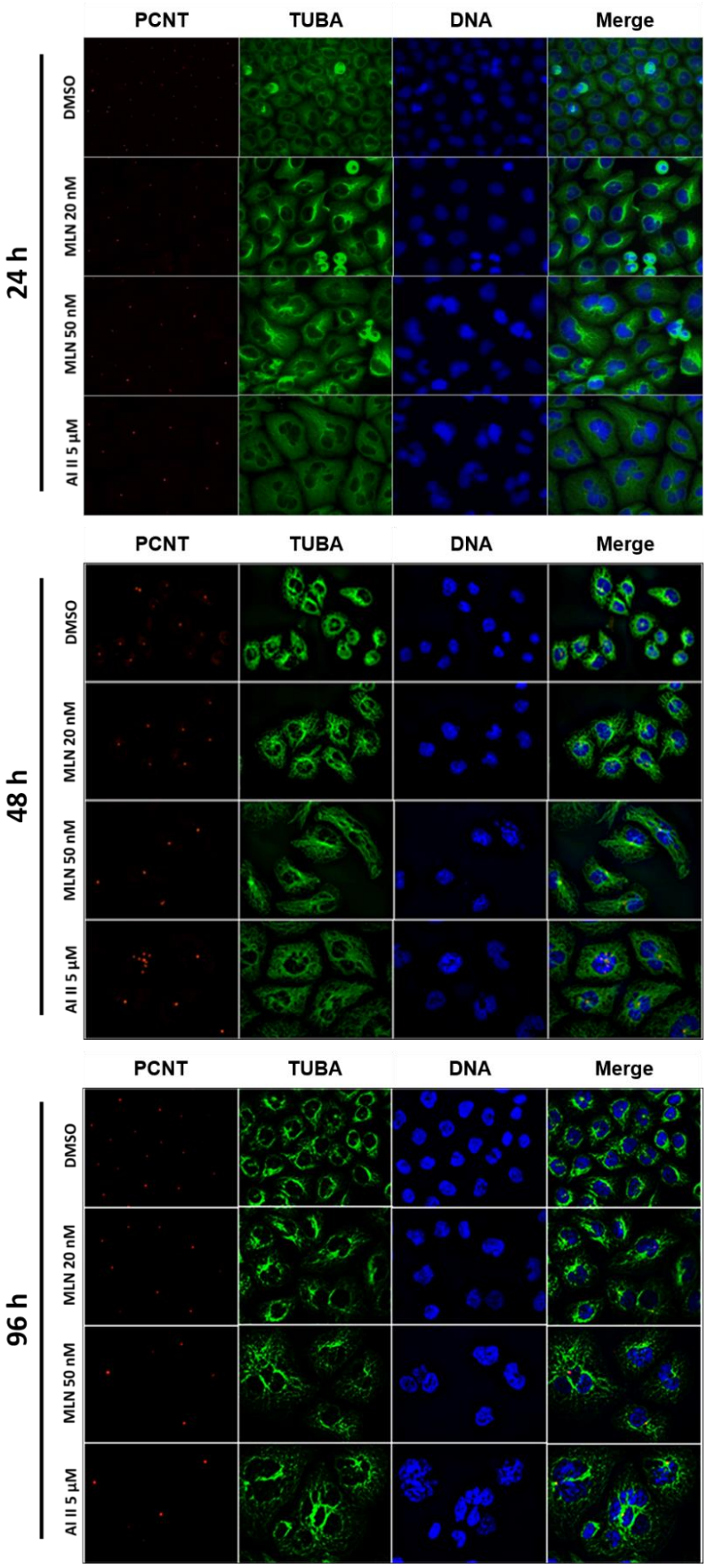


Fig. 4.15. A inibição de AURKA e/ou AURKB induz poliploidização intermitente. Imagens representativas dos efeitos da inibição de AURKA (por MLN 20 nM) ou ambas as quinases AURKA e AURKB (por MLN 50 nM ou AI II) sobre a ploidia celular, mostrando um aumento visual na área e intensidade de PCNT, e, sobretudo, na área do núcleo de células A549, sugerindo que a inibição de AURKA e/ou AURKB induz poliploidia.

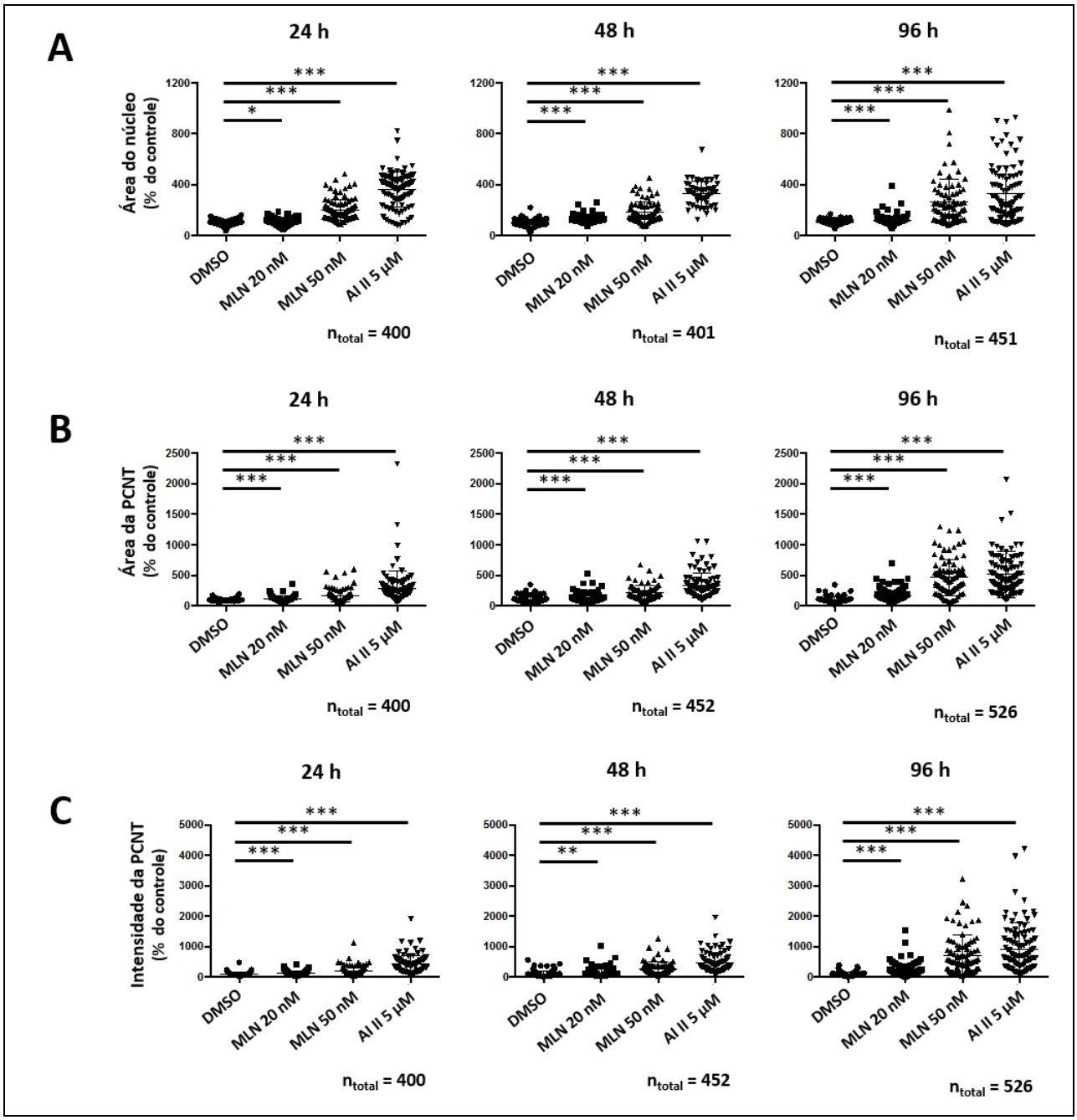


Fig. 4.16. A inibição de AURKA e/ou AURKB induz poliploidização intermitente e amplificação do centrossomo associada à aneuploidia e instabilidade genética. Quantificação das imagens representadas na Fig.15 por meio da **(A)** área do núcleo, **(B)** área da PCNT e **(C)** intensidade de fluorescência de PCNT, mostrando que a inibição de AURKA (por MLN 20 nM) ou ambas as quinases AURKA e AURKB (por MLN 50 nM ou AI II) induz poliploidia celular, caracterizada pela multinucleação e aumento do tamanho de núcleo, além de amplificação do centrossomo associada à aneuploidia e instabilidade genética, de modo dose-dependente para o tratamento com MLN e tempo-dependente para todas as condições testadas. As barras de erro representam a média ± 1 DP. A significância estatística foi determinada através do teste t de Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

4.2. A inibição das quinases AURKA ou AURKB por interferência de RNA em células portadoras de mutação em *KRAS* reduz a proliferação celular e a inibição de AURKA altera o tempo de ciclo celular, além de induzir hiperploidia e outras anomalias mitóticas.

Células A549 e H358 com expressão induzível por doxiciclina de shRNAs para AURKA (denominadas shAURKA#1 e shAURKA#2) ou AURKB (denominadas shAURKB#1 e shAURKB#2) foram geradas e validadas no laboratório **(dos Santos, 2013).** Entretanto, para a realização dos estudos aqui propostos, nós validamos novamente estes modelos celulares de inibição induzível das quinases AURKA ou AURKB por RNA de interferência. Para tanto, nós avaliamos, por *western blot*, a inibição da expressão de AURKA ou AURKB após a indução com doxiciclina. Nossos resultados confirmaram que a inibição de AURKA ou AURKB por *short hairpin* RNAs (shRNAs) foi eficiente em reduzir a expressão total dessas proteínas, para todas as sequências de shRNA utilizadas **(Fig. 4.17)**.

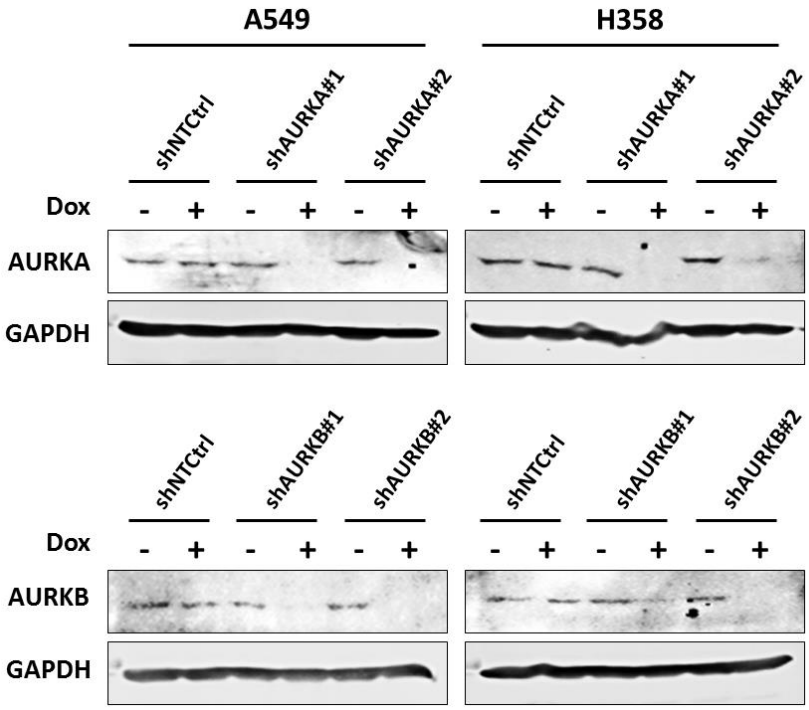


Fig. 4.17. Validação da inibição de AURKA ou AURKB por RNA de interferência em células portadoras de mutações em *KRAS*. Células A549 e H358 foram tratadas (+) ou não (-) por 5 dias com doxiciclina 2 µg/mL e os extratos proteicos totais submetidos à análise da expressão de AURKA e AURKB por *western blot*. Em todos os casos, as sequências de RNA utilizadas promoveram uma forte redução da expressão de AURKA ou AURKB. Os anticorpos usados estão indicados. GAPDH foi usado como controle endógeno (*loading control*).

Tendo uma vez demonstrado que a inibição por interferência de RNA das quinases Aurora A e Aurora B induz menor crescimento, viabilidade e capacidade de crescimento independente de ancoragem em células portadoras de mutações em *KRAS* **(dos Santos, 2013),** e dado que mutações em *KRAS* estão diretamente relacionadas à maior proliferação celular em diversos tumores **(Tuveson et al, 2004; Fatrai et al, 2011; Bryant et al, 2014; Staffas et al, 2015)**, incluindo tumores pulmonares **(Wang et al, 2009; Sunaga et al, 2011)**, nós decidimos investigar se os efeitos observados em nossos ensaios seriam devidos, pelo menos em parte, à alterações na proliferação celular mediada pela inibição de AURKA ou AURKB.

Primeiramente, nós utilizamos ensaios de citometria de fluxo baseados na incorporação de BrdU. Condizente com o papel conhecido das quinases AURKA e AURKB na mitose, e condizente com os nossos resultados de inibição farmacológica destas quinases, a inibição de AURKA ou AURKB por RNA de interferência (shAURKA + Dox; shAURKB + Dox) nas linhagens pulmonares portadoras de mutação em *KRAS,* A549 e H358, induz um acúmulo de células na fase G2/M do ciclo celular **(Fig. 4.18)**. Nós observamos que a inibição de AURKA induz um aumento no acúmulo de células em G2/M de 9,7% para 17,0% em células A549 e de 9,5% para 16,8% em células H358; similarmente, a inibição de AURKB induz um aumento no acúmulo de células em G2/M de 8,0% para 16,3% em células A549 e de 8,0% para 16,1% em células H358, considerando-se o shRNA#1 ou #2 utilizado em cada caso. Além disso, a inibição de AURKA induz uma redução na população de células em fase S de 1,5% para 0,9% em células A549 e de 1,5% para 1,1% em células H358; similarmente, a inibição de AURKB induz uma redução na população de células em fase S de 1,8% para 0,9% em células A549 e de 1,7% para 1,5% em células H358, considerando-se o shRNA#1 ou #2 utilizado em cada caso **(Fig. 4.18)**. Isso demonstra que a redução do crescimento, viabilidade e crescimento independente de ancoragem mediado pela inibição de AURKA e AURKB em células A549 e H358 é, pelo menos em parte, devido à menor proliferação celular.

Uma vez demonstrado que a inibição da quinase Aurora induz menor proliferação *in vitro*, nós decidimos investigar mais profundamente as alterações no ciclo celular associadas à inibição de AURKA em células portadoras de mutações em *KRAS*. Para tanto, nós utilizamos células A549 previamente tratadas para expressar um shRNA induzível para AURKA e analisamos, por técnicas de imageamento ao vivo, os tempos de ciclo celular e as anomalias mitóticas, célula a célula, ao longo de três gerações celulares subsequentes **(Fig. 4.19)**.

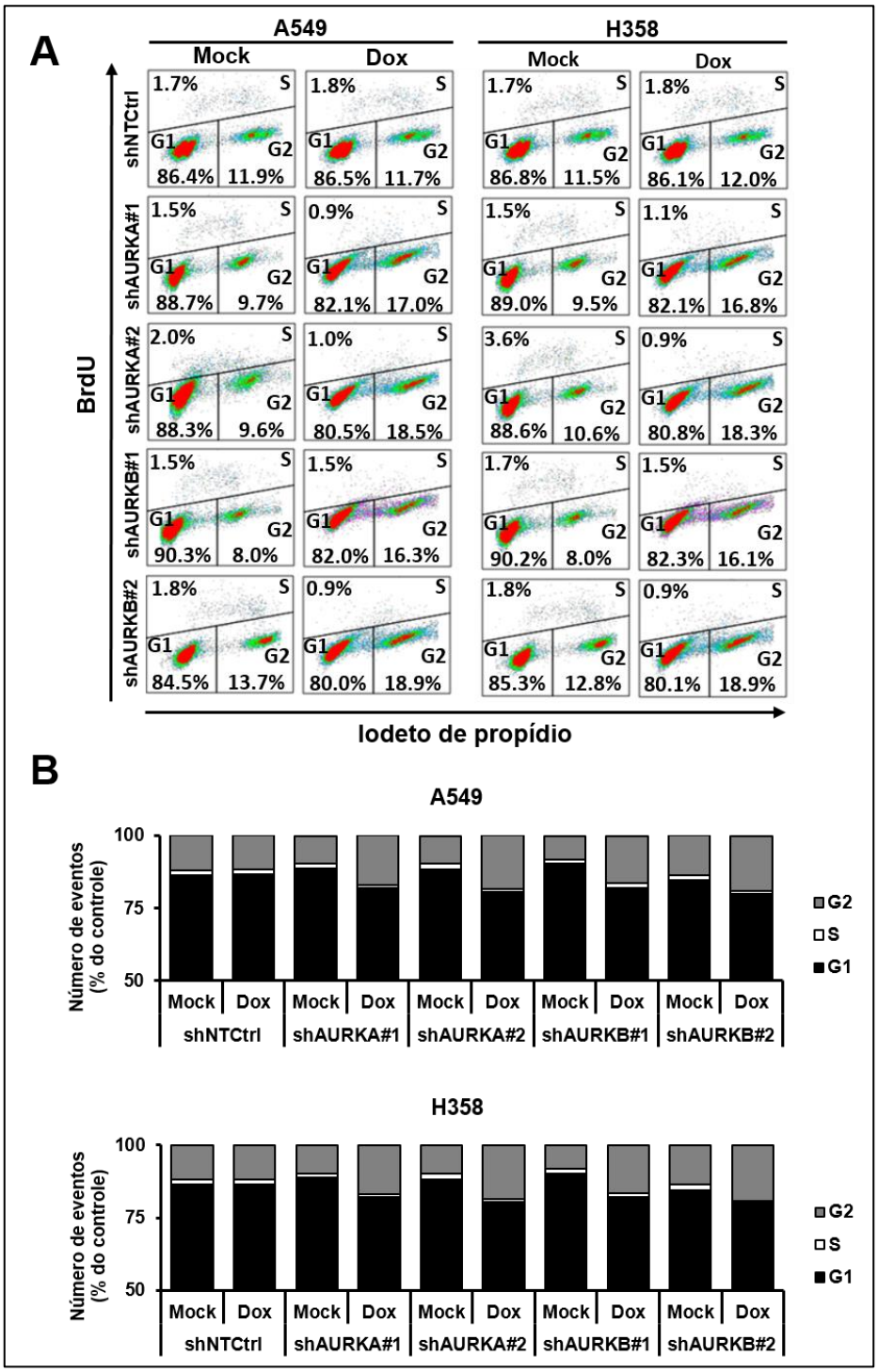


Fig. 4.18. A inibição da expressão de AURKA ou AURKB por interferência de RNA em células portadoras de mutações em *KRAS* reduz a proliferação celular e induz acúmulo de células em G2/M. (A) Ensaio de proliferação celular por citometria de fluxo baseada na incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU) e iodeto de propídeo (PI). Células A549 e H358 com expressão induzível por doxiciclina (Dox) de 2 shRNAs diferentes para AURKA (shAURKA#1 e shAURKA#2) ou AURKB (shAURKB#1 e shAURKB#2), bem como células H358 e A549 expressando um shRNA inócuo (shNTCtrl), foram tratadas com 2 µg/mL doxiciclina (Dox) por 5 dias ou deixadas sem tratamento (Mock). A inibição de AURKA ou AURKB reduziu consideravelmente a proliferação celular, além de induzir um acúmulo em G2/M. **(B)** Representação gráfica da distribuição de eventos mostrados em (A) nas fases do ciclo celular.

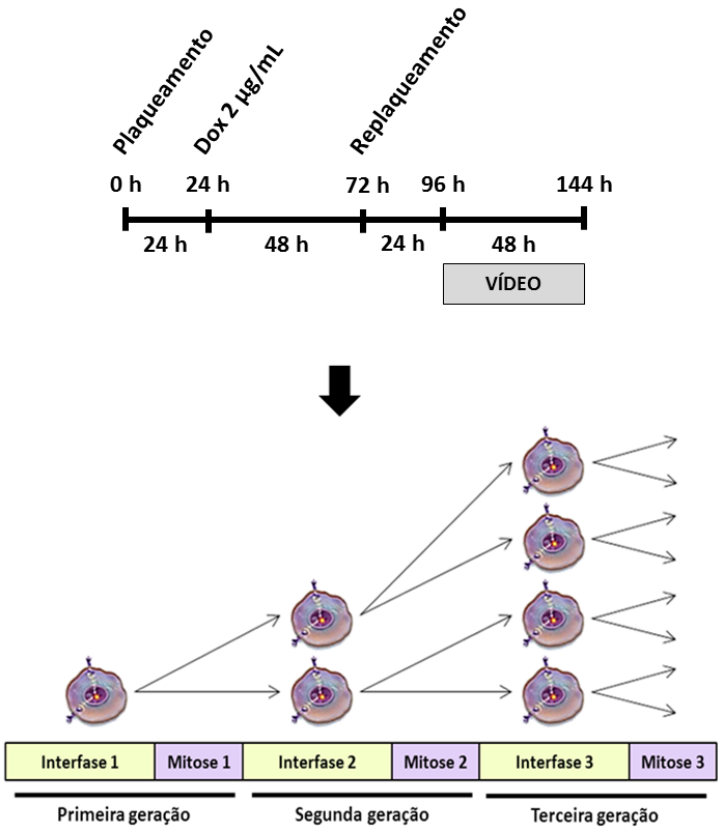
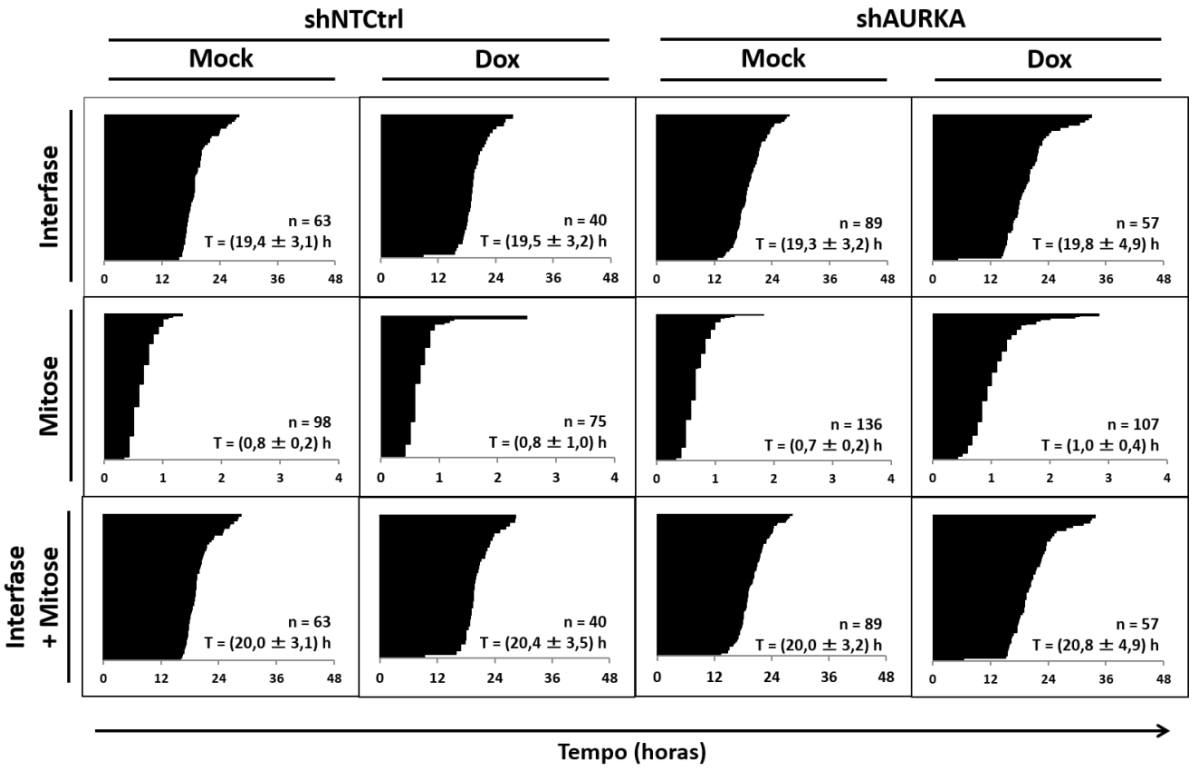


Fig. 4.19. Modelo experimental para imageamento ao vivo de células A549 shAURKA. ***Acima.*** Células A549 foram plaqueadas e tratadas com Doxiciclina (Dox) 2 µg/mL e deixadas em cultura por 72 h. Um repique dessas células foi realizado nas 24 h precedecentes ao início de cada vídeo. A aquisição de imagens foi, então, realizada por 48 h. ***Abaixo***. Para cada vídeo, nós analisamos três gerações celulares independentes; a primeira, compreendida do início da primeira interfase até o final da mitose seguinte; a segunda, do início da segunda interfase até o final da mitose conseguinte; e a terceira, do início da terceira interfase até o final da mitose conseguinte.

Inicialmente, nossos resultados demonstraram que a inibição de AURKA por interferência de RNA em células A549 não altera significativamente o tempo de interfase celular, considerando todas as gerações celulares analisadas conjuntamente. Entretanto, observamos um aumento no tempo de mitose de 1,0 ± 0,4 h para shAURKA + Dox, contra 0,8 ± 0,2 h para seu respectivo controle, o que é condizente com o fato de que AURKA, uma vez em mitose, é requerida para a progressão mitótica, e sua inibição induz o alentamento da mitose. Entretanto, quando analisados o ciclo celular completo (interfase + mitose), nós novamente não observamos diferenças estatísticas entre células nas quais AURKA foi inibida e células controle, o que é justificado pelo longo tempo de interfase comparado à rápida mitose nestas células **(Fig. 4.20)**.



	Mock vs. Dox	
	shNTCtrl	shAURKA
Interfase	n.s.	n.s.
Mitose	n.s.	****
Interfase e mitose	n.s.	n.s.

Fig. 4.20. Análise dos tempos de mitose e interfase em células A549 com inibição de AURKA por interferência de RNA. Células A549 expressando ou não RNA de interferência para AURKA, foram tratadas com doxiciclina por 72 h e submetidas, posteriormente, à análise do ciclo celular por técnicas de *time-lapse* pelas 48 h seguintes. A inibição de AURKA por RNA de interferência induz aumento do tempo de mitose, sem, contudo, interferir significativamente no tempo total do ciclo celular. ***Acima***. Representação gráfica dos tempos de interfase, mitose e mitose associada à interfase, analisados célula a célula ao longo de 48 h. ***Abaixo***. Análise estatística calculada pelo teste t de Student, mostrando uma diferença significativa apenas nos tempos de mitose entre células shAURKA induzidas (Dox) ou não induzidas (Mock) com doxiciclina.

Para saber se o aumento do tempo de mitose observado ocorria em função do bloqueio dessas células em prometáfase, como esperado, nós utilizamos técnicas de imunoflourescência para realizar a contagem de células mitóticas em função das fases da mitose (progressão mitótica), em lâminas fixadas. Os critérios utilizados para classificação das células em suas respectivas fases da mitose foram os mesmos abordados na **Fig. 4.14A**. Nossos resultados demonstraram que células A549 expressando um shRNA contra AURKA (shAURKA + Dox) apresentam uma maior população de células em prometáfase **(Fig. 4.21)**, o que, pelo menos em parte, justifica o aumento do tempo de mitose observado em nossos experimentos de *time-lapse* **(Fig. 4.20)**.

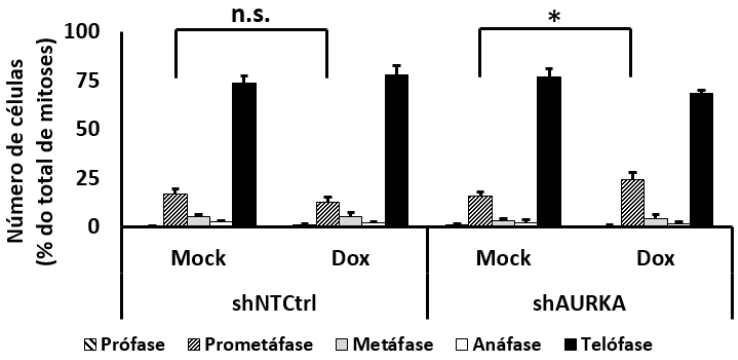


Fig. 4.21. A inibição de AURKA por RNA de interferência induz acúmulo de células mitóticas em prometáfase. Células A549 manipuladas para expressar de forma induzivel um shRNA para AURKA (shAURKA) ou um shRNA controle (shNTCtrl) foram tratadas (Dox) ou não (Mock) com doxiciclina 2 ug/mL por 72 h e fixadas em lâminas para análise da progressão mitótica por imunoflourescência. Os critérios utilizados para classificação das células em suas respectivas fases da mitose foram os mesmos abordados na Fig. 14A. As barras de erro representam a média ± 1 DP. A significância estatística foi determinada através do teste t de Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; n.s.: não significativo).

Mais importante, nós também observamos em nossos experimentos de *time-lapse* que a inibição de AURKA induz uma série de anomalias mitóticas, dentre as quais, a formação de *blebbings* em telófase, além de falhas de citocinese, associadas ou não à presença de *blebbings* em telófase, que são fatores causais do aumento de ploidia observado nessas células em função da inibição de AURKA. De fato, nós observamos um aumento considerável na presença de mitoses multipolares (tripolares e quadripolares), características de células hiperploides e multinucleadas. Por fim, a inibição de AURKA induziu uma maior ocorrência de divisões celulares não orientadas, como consequência da má formação e desalinhamento do fuso mitótico **(Fig. 4.22)**.

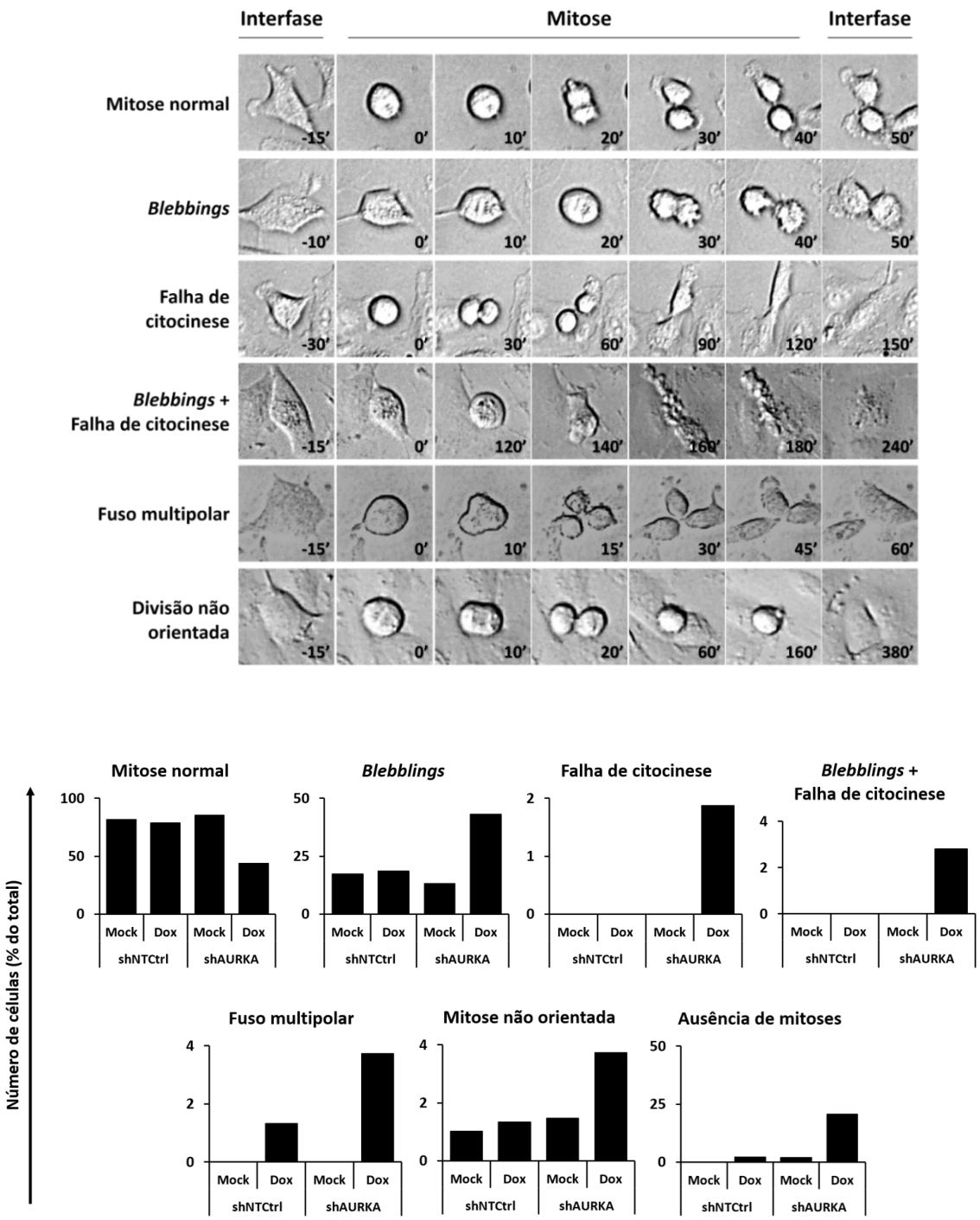


Fig. 4.22. A inibição da quinase Aurora A em células portadoras de mutações em *KRAS* induz diversas anomalias mitóticas. *Acima.* Painel representativo das anomalias mitóticas induzidas pela inibição genética de AURKA em células portadoras de mutação em *KRAS*. Células A549 manipuladas para expressar de forma induzivel um shRNA para AURKA (shAURKA) ou um shRNA controle (shNTCtrl) foram tratadas (Dox) ou não (Mock) com doxiciclina 2 ug/mL por 72 h e submetidas à análise por microscopia em tempo real pelas 48 h seguintes. As alterações mitóticas observadas estão representadas independentemente do tratamento realizado e são comuns à todas as condições testadas em que aparecem. Os tempos de mitose estão representados em minutos (canto inferior esquerdo) e valores negativos representam a interfase precedente à mitose celular. A interfase seguinte representa o momento exato em que a mitose termina e as células filhas readerem à placa. ***Abaixo***. Frequência e distribuição das anomalias mitóticas induzidas pela inibição de AURKA em células portadoras de mutações em *KRAS*. A inibição de AURKA por RNA de interferência induz o acúmulo de defeitos mitóticos, incluindo *blebbings*, falhas de citocinese, formação de fusos multipolares e erros de alinhamento do fuso.

4.3. A inibição farmacológica das quinases AURKA e AURKB em células portadoras de mutação em *KRAS* induz morte celular.

Além de avaliar os efeitos da inibição de AURKA e AURKB sobre o ciclo celular, nós avaliamos também se esta inibição provoca morte celular. Inicialmente, avaliamos a presença de morte celular por citometria de fluxo baseada na externalização de fosfatidilserina e incorporação de iodeto de propídio. Nós observamos que o tratamento com AI II induz morte celular por apoptose em A549 (~ 7,5% de células positivas para Anexina V - que se liga à fosfatidilserina exposta na membrana - na condição tratada contra ~ 3% no controle) e mais expressivamente em H358 (~ 13% de células positivas para Anexina V na condição tratada contra ~ 5% no controle), considerando-se a maior concentração testada de AI II em ambas as linhagens celulares **(Fig. 4.23)**.

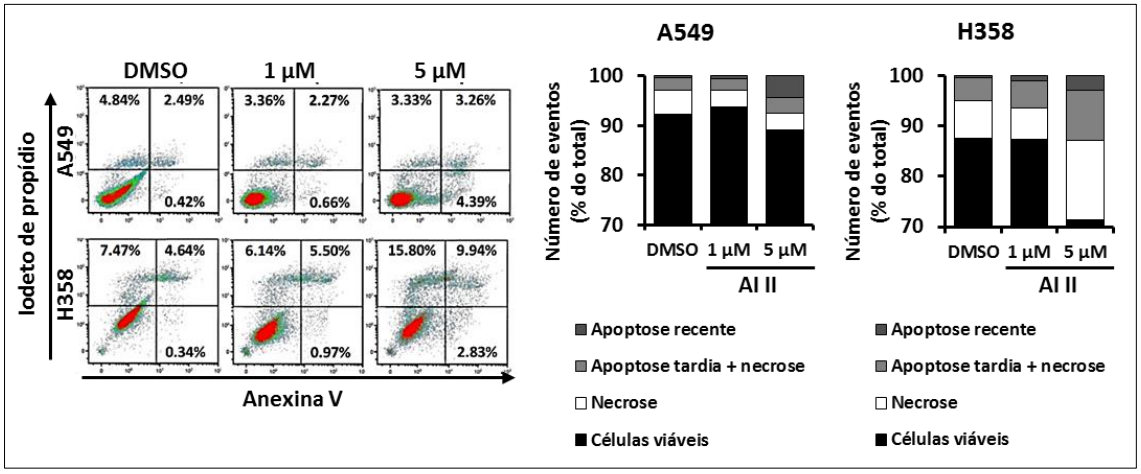


Fig. 4.23. A inibição farmacológica dual das quinases AURKA e AURKB induz morte em células portadoras de KRAS oncogênica. ***Esquerda.*** Ensaio de citometria de fluxo baseado na externalização de fosfatidilserina (marcada com Anexina V conjugada a FITC) e incorporação de iodeto de propídeo (PI). Células A549 e H358 foram tratadas com as concentrações indicadas do inibidor AI II ou com DMSO (controle de veículo) por 72h. A distribuição das populações celulares marcadas com PI ou Anexina V (ver métodos) estão indicadas. ***Direita.*** Representação gráfica da distribuição de eventos, considerando-se a classificação: (1) células viáveis: duplo negativo Anexina V/PI; (2) necrose: células positivas somente para PI; (3) apoptose recente: células positivas somente para Anexina V; e (4) apoptose tardia + necrose: duplo positivo Anexina V/PI.

Esses resultados foram posteriormente confirmados pela análise da clivagem de CASP3 por *western blot*. O tratamento de células portadoras de mutação em KRAS com AI II aumenta a razão CASP3 clivada/CASP3 total em ~ 36% para células A549 e ~ 32% para células H358, considerando a maior concentração testada de AI II, em relação ao controle DMSO. Uma vez que a clivagem de CASP3

é um dos eventos finais da cascata apoptótica, este é um forte indicativo de que a inibição de AURKA e AURKB induz morte celular por apoptose **(Fig. 4.24)**.

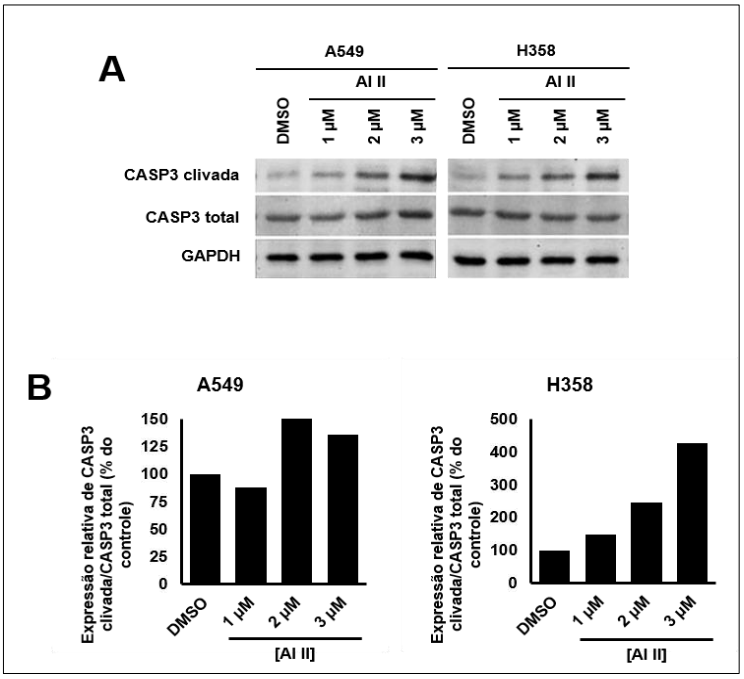


Fig. 4.24. A inibição farmacológica dual das quinases AURKA e AURKB induz morte por apoptose em células portadoras de KRAS oncogênica. Células A549 e H358 foram tratadas com as concentrações indicadas de AI II ou DMSO 0,1% (controle de solvente) por 72h e submetidas a ensaios de expressão proteica por *western blot*. **(A)** A inibição dual de AURKA e AURKB induz o aumento de CASP3 clivada de modo dose dependente, sugerindo morte apoptótica. **(B)** Quantificação das bandas reveladas em (A) por meio do software *ImageJ*, expresso por CASP3 clivada/CASP3 total, após normalização por GAPDH (*loading control*).

Por fim, uma vez demonstrado que a inibição farmacológica das quinases AURKA e AURKB induz morte em células portadoras de mutação em *KRAS* **(Fig. 4.23 e Fig. 4.24)**, nós buscamos identificar em qual momento do ciclo celular predomina o efeito indutor de morte mediado pela inibição de AURKA e/ou AURKB. Essa abordagem é extremamente relevante, uma vez que se espera que drogas anti-mitóticas sejam capazes de induzir morte somente em células que estejam se dividindo, sem, contudo, causar morte celular em interfase. Para tanto, nós utilizamos o mesmo protocolo de sincronização de células A549 em fase G2/M, descrito na **Fig. 4.6**, e realizamos ensaios de imageamento ao vivo para investigação do efeito indutor de morte mediado pela inibição de AURKA e/ou AURKB ao longo de três gerações celulares subsequentes. Nossos resultados mostram que a inibição de AURKA, por MLN 20 nM, bem como a inibição dual de AURKA e AURKB, por MLN 50 nM ou AI II 5 µM, induz morte celular em mitose, como esperado para uma estratégia anti-mitótica. Entretanto, em todos os casos, nós também observamos uma indução de morte celular em interfase, sugerindo que a inibição de AURKA e/ou AURKB pode ser citotóxica fora da mitose **(Fig. 4.25**). Independentemente do

mecanismo de morte celular, em todos os casos observamos uma maior indução de morte mitótica e interfásica em células de terceira geração, que já acumularam diversos defeitos de divisão celular, sugerindo que o acúmulo de defeitos mitóticos aumenta a susceptibilidade à morte celular mediada pela inibição de AURKA e/ou AURKB.

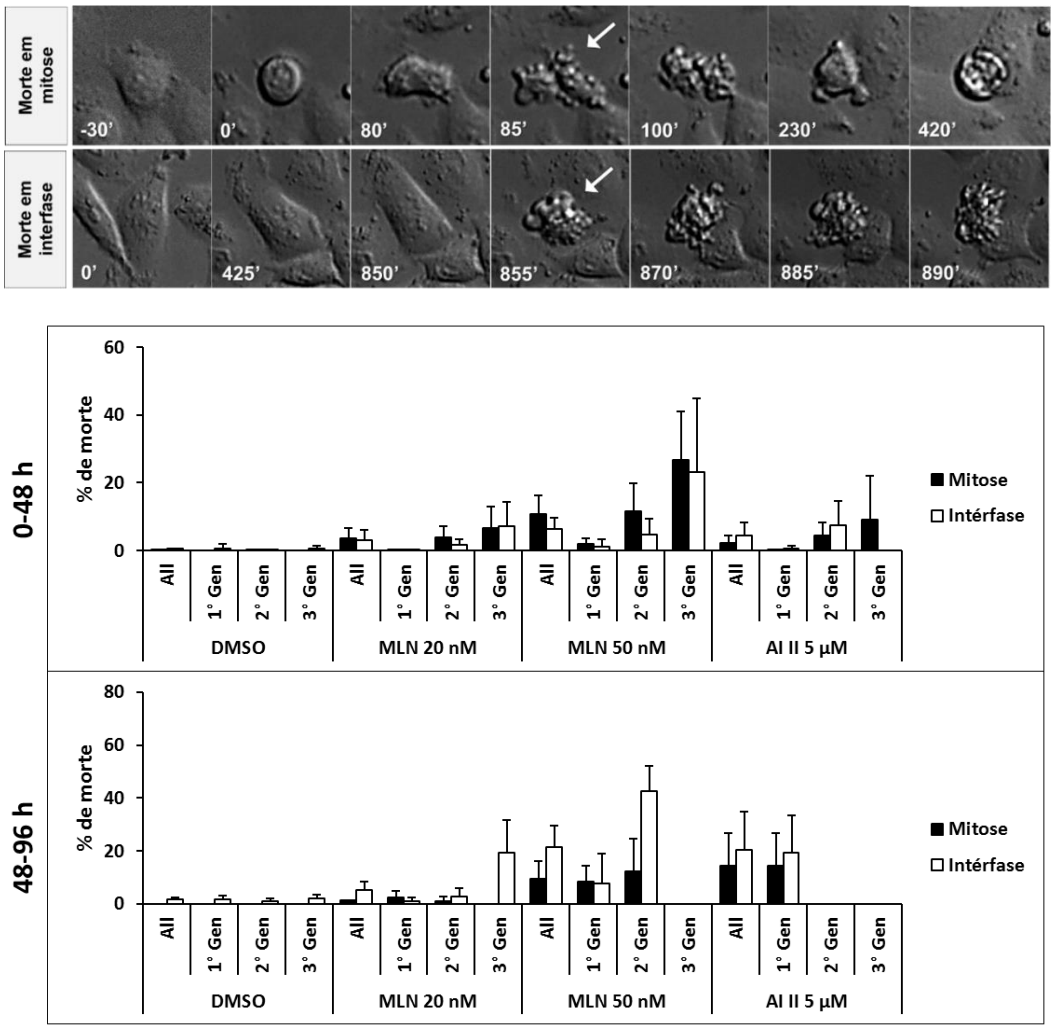


Fig. 4.25. A inibição das quinases AURKA e AURKB em células portadoras de mutação em KRAS induz morte celular em mitose e interfase. ***Acima***. Painel representativo da morte celular em mitose e interfase mediada pela inibição de AURKA e/ou AURKB em células A549. ***Abaixo***. Frequência e distribuição da morte celular em mitose e interfase, considerando três gerações celulares consecutivas (1° Gen., 2° Gen. e 3° Gen.) ou todas as gerações celulares conjuntamente (All), mostrando um acúmulo de morte em função do tratamento, de modo dose- e geração-dependente. Considerando-se o período de 48-96h, as células de terceira geração para MLN 50 nM e de segunda e terceira geração para AI II 5 µM não puderam ser analisadas porque nenhuma célula da geração celular anterior se dividiu. As barras de erro representam a média ± 1 DP. As diferenças estatísticas não são mostradas porque, embora a inibição de AURKA e/ou AURKB indique claramente uma maior morte celular em todos os casos, a alta variabilidade de resultados encontrada nas três replicadas experimentais não permite que esses valores sejam estatisticamente significativos.

Uma vez observado, ao longo de nossos experimentos de *time-lapse*, que a morte mitótica poderia ocorrer após diferentes tempos de parada em mitose, e que a morte celular originada de células que apenas entraram em mitose e outras que ficaram paradas por muitas horas em mitose poderia envolver diferentes mecanismos de morte mitótica, nós decidimos analisar o tempo decorrido em mitose

antes de cada morte celular. Nossos experimentos demonstram uma grande variação dos tempos de parada em mitose precedentes à morte mitótica. Em linhas gerais, quanto mais intensa a inibição das quinases Aurora, menor é o tempo que precede a morte mitótica. Por outro lado, quando as células foram tratadas com MLN 50 nM, observamos que uma fração das células apresentaram um aumento no tempo que precede a morte mitótica nas primeiras 48h. Isso indica que diferentes condições de inibição de AURKA e/ou AURKB induzem morte mitótica por diferentes mecanismos **(Fig. 4.26)**.

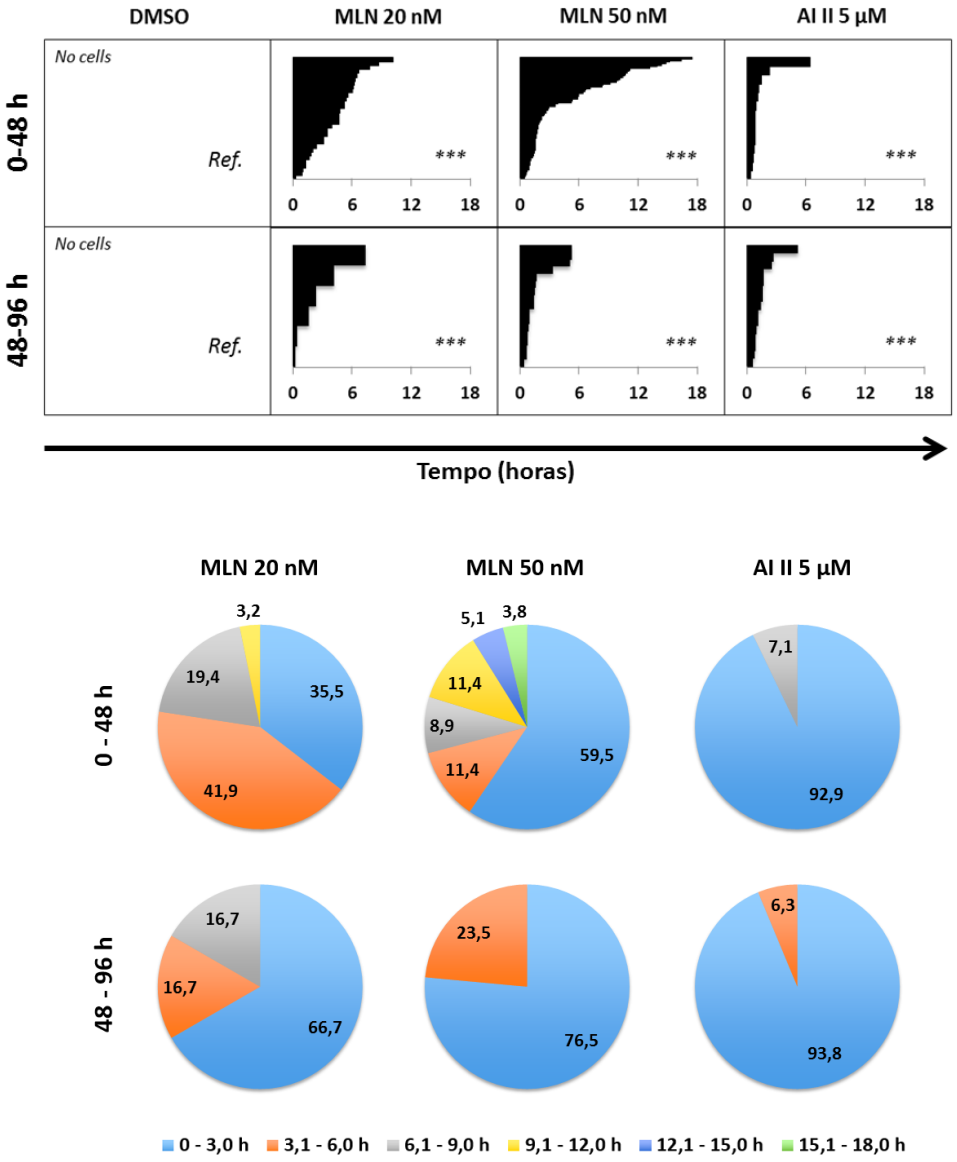


Fig. 4.26. Diferentes condições de inibição das quinases AURKA e/ou AURKB induzem diferentes perfis de morte mitótica. ***Acima.*** Representação gráfica dos tempos de parada que precedem a morte mitótica induzida pela inibição de AURKA e/ou AURKB, considerando-se todas as gerações mitóticas conjuntamente. ***Abaixo***. Distribuição e frequência dos tempos de parada em mitose que precede a morte mitótica em função da inibição de AURKA e/ou AURKB. Em linhas gerais, quanto mais intensa a inibição das quinases Aurora, ou quando maior o tempo de tratamento com inibidores, menor é o tempo que precede a morte mitótica.

4.4. A inibição das quinases AURKA e AURKB por interferência de RNA em células portadoras de mutação em *KRAS* induz morte celular.

Tendo em vista que alterações no ciclo celular, principalmente parada em G2/M podem induzir apoptose, e ainda, que as vias ativadas por *KRAS* estão relacionadas à regulação da morte celular **(Cardone et al, 1998; Okamoto et al, 2014; Zaanan et al, 2015)**, e somado ao fato de que a inibição farmacológica destas quinases foi capaz de induzir morte celular (*ver Resultados, item 4.3*), nós resolvemos também avaliar se a inibição de AURKA ou AURKB por interferência de RNA poderia induzir morte celular. Como pode ser visto na **Fig. 4.27**, nossos resultados demonstram claramente que a inibição de AURKA ou AURKB por RNA de interferência (shAURKA + Dox; shAURKB + Dox) induz, em ambas as linhagens celulares A549 e H358, um aumento de caspase 3 (CASP3) clivada.

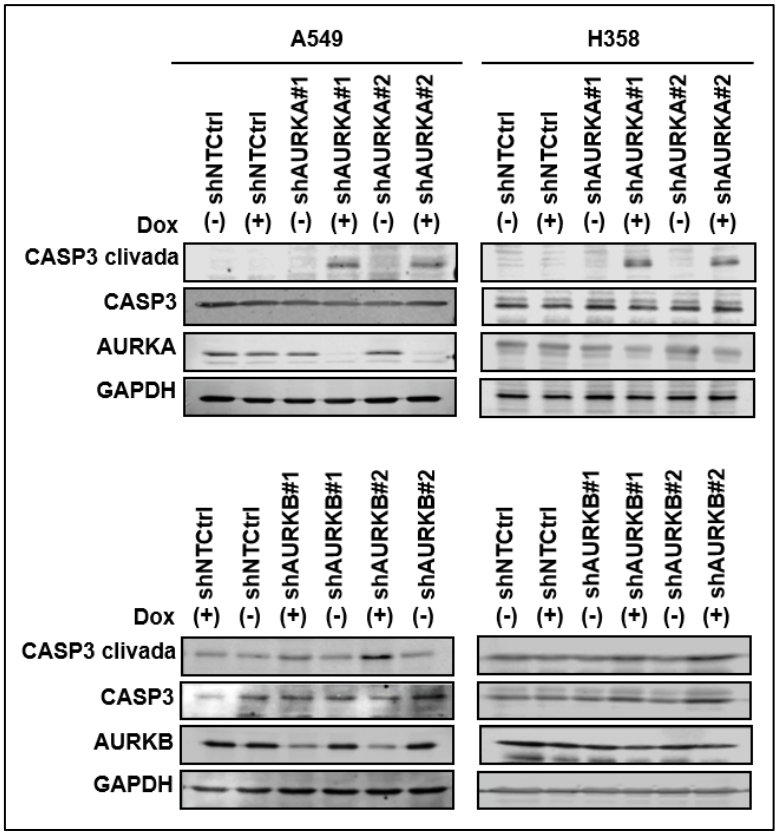


Fig. 4.27. A inibição da expressão de AURKA ou AURKB por interferência de RNA em células portadoras de mutações em *KRAS* induz morte celular por apoptose. Células A549 e H358 com expressão induzível por doxiciclina de 2 shRNAs diferentes para AURKA (shAURKA#1 e shAURKA#2) ou AURKB (shAURKB#1 e shAURKB#2), bem como células H358 e A549 expressando um shRNA inócuo (shNTCtrl) foram tratadas com 2 ug/mL doxiciclina (Dox) por 5 dias ou deixadas sem tratamento (Mock) e submetidas a *western blot.* A inibição de AURKA ou AURKB induziu um aumento de CASP3 clivada, sugerindo morte celular por apoptose. Os anticorpos usados estão indicados. GAPDH foi usado como controle endógeno (*loading control*).

Por fim, nós também observamos em nossos ensaios de morte celular por microscopia em tempo real que células A549 expressando um shRNA para AURKA (shAURKA + Dox) são mais sensíveis à morte celular em interfase **(Fig. 4.28)**, não sendo observada morte celular em mitose (dados não mostrados). Isso sugere que a morte celular mediada pela inibição da AURKA é citotóxica, uma vez que induz morte em células que não estão se dividindo.

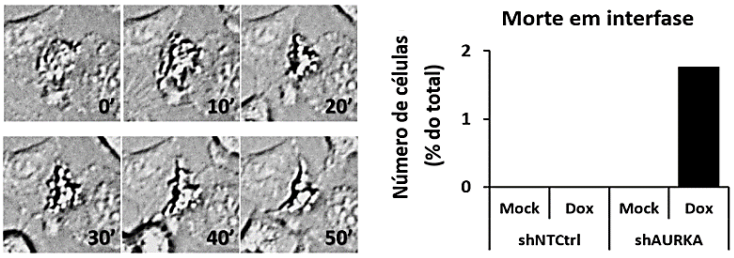


Fig. 4.28. A inibição da quinase AURKA em células portadoras de mutação em *KRAS* induz morte celular em interfase. Células A549 manipuladas para expressar de forma induzivel um shRNA para AURKA (shAURKA) ou um shRNA controle (shNTCtrl) foram tratadas (Dox) ou não (Mock) com doxiciclina (Dox) 2 ug/mL por 72 h e submetidas à análise por microscopia em tempo real pelas 48 h seguintes. ***Esquerda.*** Painel representativo da morte em interfase induzida pela inibição de AURKA em células portadoras de mutação em *KRAS*. Os números no canto inferior direito de cada imagem representam o tempo decorrido desde o início da morte celular observada. ***Direita.*** Frequência de morte em interfase observada, mostrando que a inibição de AURKA induz morte em interfase em células A549.

Portanto, o menor crescimento, viabilidade e capacidade de crescimento independente de ancoragem induzido pela inibição de AURKA ou AURKB em células portadoras de mutações em *KRAS* **(dos Santos, 2013)** podem, pelo menos em parte, ser explicados por uma menor proliferação e indução de morte celular mediadas pela inibição destas proteínas.

4.5. A indução de morte celular pela inibição das quinases AURKA e AURKB em linhagens pulmonares depende da presença de KRAS oncogênica.

Para que a inibição das quinases AURKA e AURKB possa ser uma abordagem relevante na terapia contra o câncer, é importante que os efeitos biológicos observados em decorrência da inibição farmacológica dessas quinases sejam específicos para (ou mais proeminentes em) células portadoras de mutações em *KRAS*. Para isso, nós realizamos uma série de ensaios biológicos em células H1703 tumorais que expressam KRAS oncogênica (denominadas G12V) somente na presença de doxiciclina. Uma vez tendo demonstrado que a inibição de AURKA e/ou AURKB reduz o crescimento, a viabilidade e a capacidade de crescimento independente de ancoragem celular de modo dependente da presença de KRAS oncogênica em linhagens celulares derivadas de câncer de pulmão **(dos Santos, 2013)**, nós investigamos, posteriormente, se esses efeitos eram devidos à uma maior morte celular ou menor capacidade proliferativa.

Em ensaios de citometria de fluxo baseados na detecção de fosfatidilserina externalizada por Anexina V e incorporação de iodeto de propídio, nós demonstramos que esses efeitos são, pelo menos em parte, devidos à morte de células portadoras de mutações em *KRAS* quando tratadas com AI II. Nossos resultados mostram um acúmulo de células positivas para Anexina V e PI (~ 25%) após o tratamento com AI II especificamente em células H1703 que expressam $KRAS^{G12V}$ (G12V + DOX). O tratamento com AI II em células que expressam somente $KRAS^{WT}$ (T-RexB +/- Dox) não induz significativamente a proporção de células positivas para Anexina V e PI. Da mesma forma, o tratamento com AI II de células G12V na ausência de doxiciclina (e, portanto, na ausência de expressão de $KRAS^{G12V}$) também não leva ao acúmulo de células apoptóticas (positivas para Anexina V) **(Fig. 4.29)**.

Esses resultados foram posteriormente confirmados pela análise da clivagem de CASP3 por *western blot*. O tratamento com baixas concentrações de AI II em células que expressam somente $KRAS^{WT}$ (T-RexB +/- Dox) ou não induzidas a expressar $KRAS^{G12V}$ (G12V - Dox) não aumenta a razão CASP3 clivada/CASP3. Por outro lado, o tratamento com AI II na presença de $KRAS^{G12V}$ (G12V + Dox + AI II) induz um aumento de CASP3 clivada, o que sugere morte celular por apoptose **(Fig. 4.30)**.

Portanto, a diminuição do crescimento, viabilidade e capacidade de crescimento independente de ancoragem induzida pela inibição de AURKA e/ou AURKB de forma dependente de KRAS se deve, pelo menos em parte, à apoptose de células que expressam $KRAS^{G12V}$.

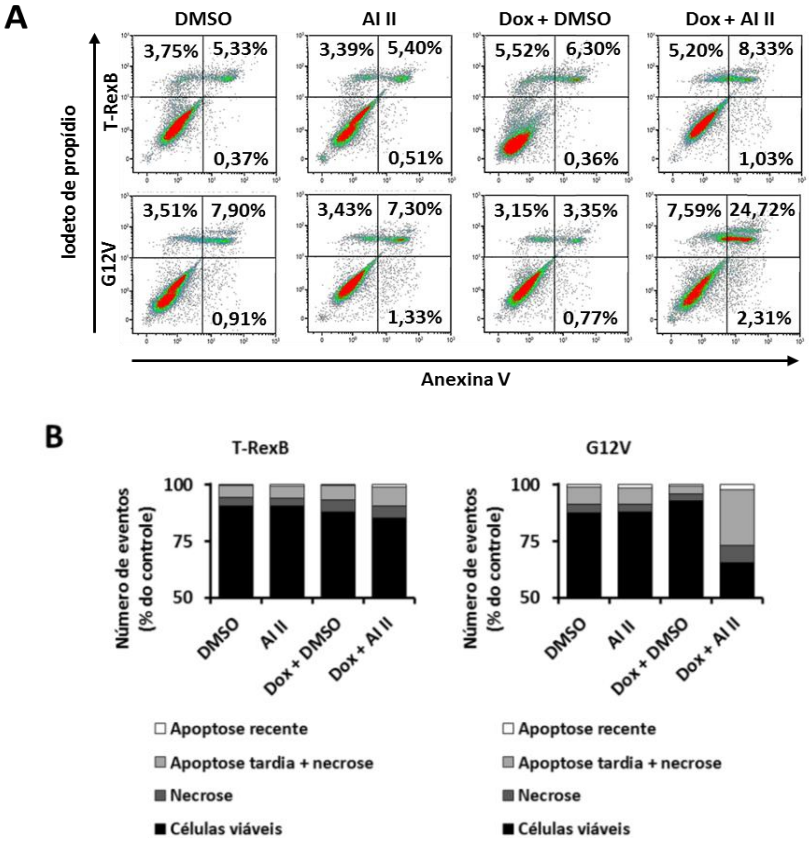


Fig. 4.29. A inibição farmacológica das quinases AURKA e AURKB induz morte celular de modo dependente da presença de KRAS oncogênica. (A) Ensaio de citometria de fluxo baseado na externalização de fosfatidilserina (Anexina V) e incorporação de iodeto de propídeo (PI). Células H1703, geneticamente modificadas para a expressão induzível por doxiciclina (Dox) de $KRAS^{G12V}$, foram cultivadas na presença de 2 µg/mL Doxicilina (Dox) ou não por 24h previamente ao tratamento com 1 µM AI II ou com 0.1% DMSO (controle de solvente) pelas 72h seguintes. A distribuição das populações celulares positivas para Anexina V e/ou PI estão indicadas. **(B)** Representação gráfica da distribuição dos eventos mostrados em (A), considerando-se a seguinte classificação: (1) células viáveis: duplo negativo Anexina V/PI; (2) necrose: células positivas somente para PI; (3) apoptose recente: células positivas somente para Anexina V; e (4) apoptose tardia + necrose: duplo positivo Anexina V/PI.

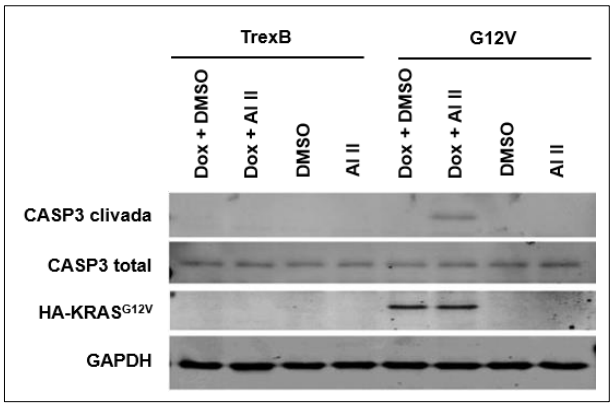


Fig. 4.30. A inibição farmacológica dual das quinases AURKA e AURKB induz morte por apoptose de modo dependente da presença de KRAS oncogênica. Células H1703 expressando $KRAS^{G12V}$ (G12V + Dox) ou apenas $KRAS^{WT}$ (TrexB +/- Dox ou G12V - Dox) foram tratadas com as concentrações indicadas do inibidor AI II ou com DMSO (controle de veículo) por 72h e submetidas a ensaios de expressão proteica por *western blot.* Os resultados mostram um aumento de CASP3 clivada somente na inibição de AURKA e AURKB em células expressando KRAS oncogênica, sugerindo morte celular por apoptose.

4.6. A inibição farmacológica das quinases AURKA e AURKB em células portadoras de mutação em *KRAS* reduz a migração, adesão e expressão e atividade de metaloproteinases de matriz associadas à invasão celular.

Uma vez demonstrado que a inibição farmacológica das quinases AURKA e AURKB é capaz de reduzir o crescimento, viabilidade, capacidade de crescimento independente de ancoragem **(dos Santos, 2013)** e proliferação (ver *Resultados, item 4.1*), além de induzir morte celular (*ver Resultados, item 4.3*), e dado que tumores possuindo mutação em *KRAS* são altamente malignos e invasivos **(Rui et al, 2015; Bournet et al, 2016; Kent et al, 2016)**, e, ainda, que as vias de sinalização de KRAS já foram implicadas na regulação da migração celular de diversos tumores **(Al-Ghamdi et al, 2011; Prieto et al, 2016)**, incluindo tumores pulmonares **(Ma et al, 2015; Castellano et al, 2016)**, uma estratégia terapêutica capaz de inibir que células transformadas por KRAS migrem e invadam novos tecidos seria de alta relevância terapêutica.

Inicialmente, nós decidimos inicialmente investigar se a inibição farmacológica dual de AURKA e AURKB por AI II possuía algum efeito sobre a migração de células positivas para KRAS. Para tanto, nós utilizamos células A549 e H358 parentais, não modificadas geneticamente, para realizar ensaios de migração baseados em técnicas de *wound-healing*. Nossos resultados demonstram que a inibição de AURKA e AURKB por AI II é capaz de reduzir a migração em 24 h, com uma diminuição da capacidade de migração celular de ~ 67% para células A549 **(Fig. 4.31A)** e ~ 45% para células H358 **(Fig. 4.31B)**, considerando-se a maior concentração testada de AI II, em relação ao controle DMSO, em ambos os casos. Para corroborar nossos resultados de migração celular por *wound-healing* e para expandir nossos conhecimentos acerca dos efeitos da inibição de AURKA e AURKB sobre a migração de células A549 e H358, nós, posteriormente, realizamos ensaios de migração baseados em técnicas de *time-lapse* para células tratadas com MLN ou AI II. Por meio da análise da migração célula a célula, nós observamos que a inibição de AURKA por MLN causa uma redução de 39% na distância celular migrada e redução de 37% da velocidade média de migração, para a maior concentração testada de MLN, em relação ao controle DMSO. Similarmente, AI II reduz a distância celular migrada em 55% e reduz a velocidade média de migração em 55%, em comparação ao controle DMSO **(Fig. 4.32)**. Tomados juntos, esses resultados fornecem evidencias sobre a importância de AURKA e AURKB para a regulação da migração de células portadoras de mutação em *KRAS*.

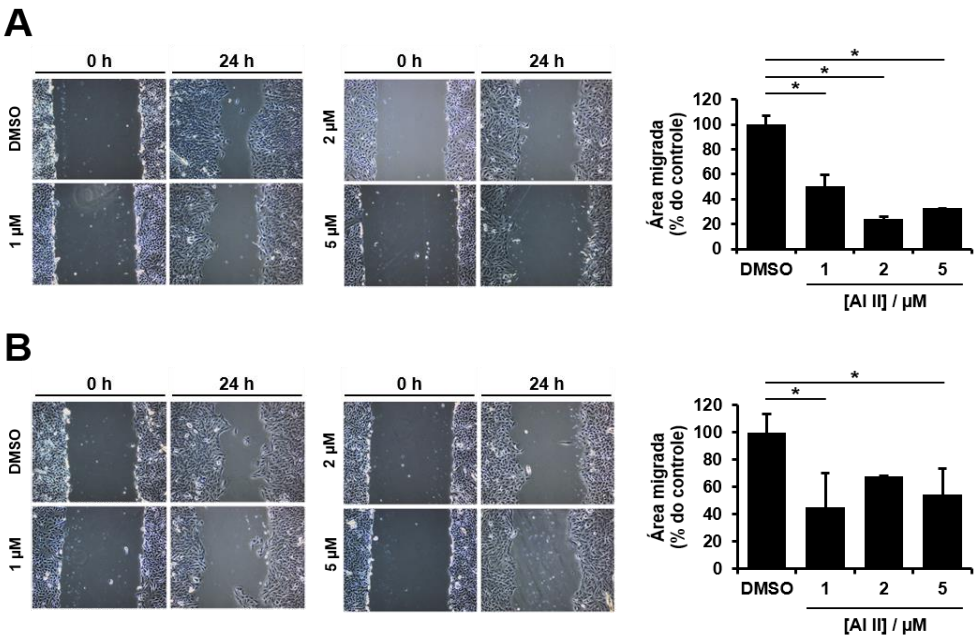


Fig. 4.31. A inibição farmacológica da atividade de AURKA e/ou AURKB por AI II em células portadoras de mutações em *KRAS* reduz a migração celular. Ensaio de migração celular por *would-healing* em um período de 24 h para células parentais A549 **(A)** e H358 **(B)**, tratadas com AI II nas concentrações indicadas ou DMSO 0,1% (controle de solvente do inibidor), mostrando que a inibição de AURKA e AURKB reduz a capacidade de migração de células portadoras de mutação em *KRAS*. ***Esquerda.*** Imagens representativas. ***Direita.*** Quantificação da área migrada mostrada à esquerda e normalizada em função do controle DMSO. As barras de erro representam a média ± 1 DP. A significância estatística foi determinada através do teste t de Student (*p<0,05).

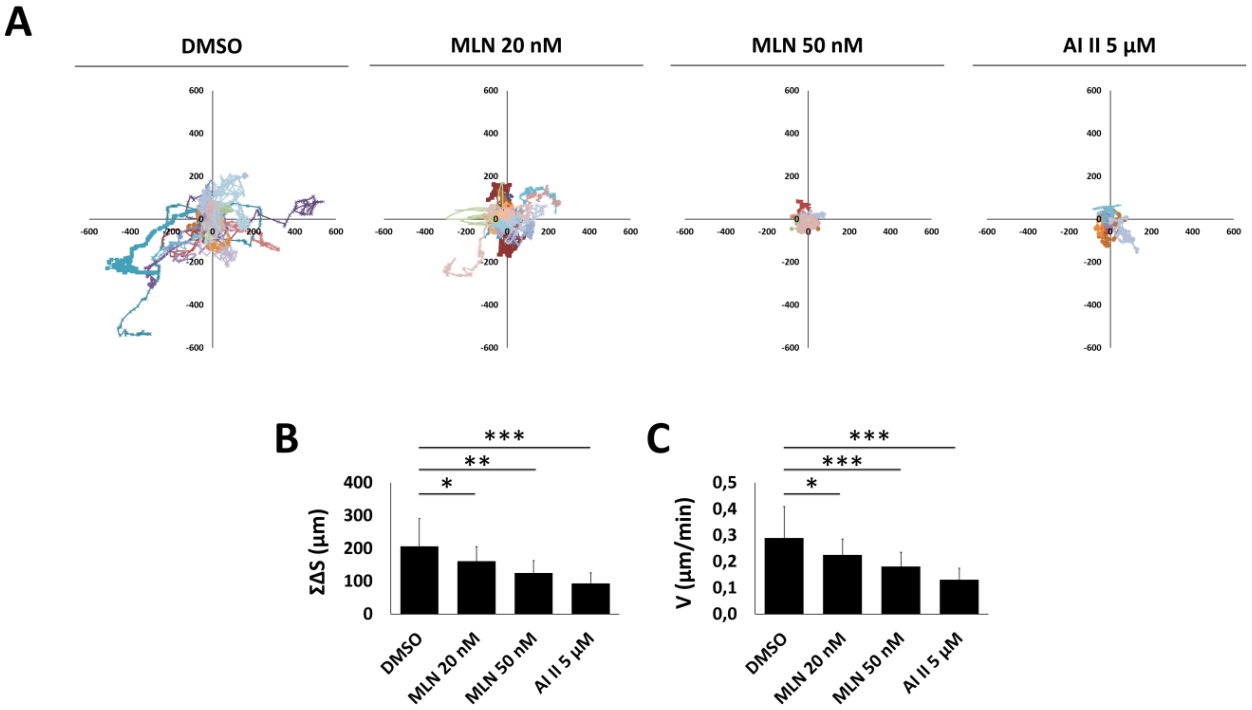


Fig. 4.32. A inibição farmacológica das quinases AURKA e/ou AURKB reduz a migração de células portadoras de mutação em *KRAS*. Células A549 foram tratadas com as concentrações indicadas de MLN ou AI II e submetidas à análise da migração celular individual por técnicas de imageamento ao vivo por 12 h a partir do momento do tratamento. **(A)** Imagens representativas da migração celular individual e bidimensional analisada por *time-lapse* ao longo de 12 h em intervalos regulares de 5 min normalizada para a coordenada (0,0), mostrando que a inibição de AURKA por MLN ou AURKA e AURKB por MLN e por AI II induz um menor deslocamento celular no plano cartesiano. **(B)** Representação gráfica da média da soma dos deslocamentos celulares individuais (ΣΔS) ao longo de 12 h. **(C)** Velocidade celular média (V), mostrando uma redução da capacidade de migração em função da inibição de AURKA e/ou AURKB. As barras de erro representam a média ± 1 DP. A significância estatística foi determinada através do teste t de Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Posteriormente, para investigar se as quinases AURKA e AURKB possuíam um papel importante na invasão de células portadoras de KRAS oncogênica, nós analisamos, posteriormente, qual seria o efeito da inibição dessas quinases na secreção de enzimas relacionadas à invasão celular. Uma vez que as metaloproteinases de matriz 2 (MMP2) e 9 (MMP9) são proteínas essenciais para invasão de tecidos adjacentes ao tumor e metástase **(Guan et al, 2015; Singh et al, 2015; Houghton, 2015)**, e dado que sua superexpressão e/ou atividade já foram implicadas na malignidade de diversos tumores **(Park et al, 2011; Rachagani et al, 2011; Jabłońska-Trypuć et al, 2016; Okada et al, 2016; Salem et al, 2016; Xiang et al, 2016)**, incluindo tumores pulmonares **(Wang et al, 2009; He et al, 2014; Lee et al, 2015; Wang et al, 2015; Gong et al, 2016)**, nós resolvemos avaliar a expressão e atividade dessas duas enzimas como uma abordagem indireta para investigar a capacidade de invasão de células portadoras de mutação em *KRAS* em função da inibição de AURKA ou AURKB.

Para tanto, nós utilizamos células A549 e H358 parentais, não modificadas geneticamente, para realizar ensaios de zimografia para avaliar a atividade gelatinolítica de MMP2 e MMP9 em função da inibição de AURKA e AURKB. Nossos resultados demonstram que a inibição de AURKA e AURKB por AI II reduz a atividade gelatinolítica de MMP2 e MMP9 em A549 e, sobretudo, em H358, sugerindo que essas quinases podem contribuir para a invasão de células transformadas por KRAS **(Fig. 4.33)**.

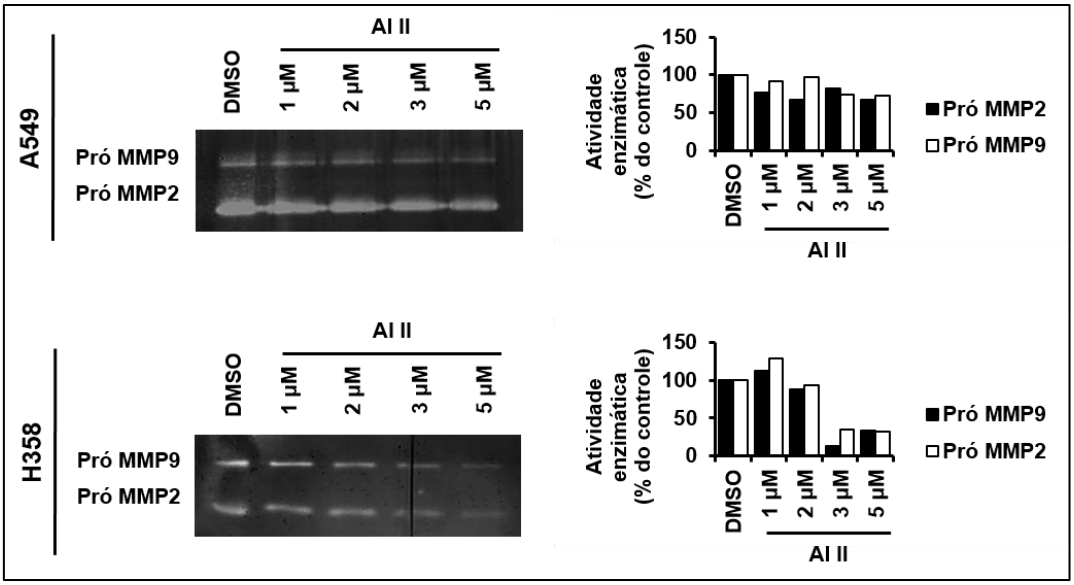


Fig. 4.33. A inibição farmacológica dual das quinases AURKA e AURKB reduz a atividade gelatinolítica de MMP2 e MMP9. ***Esquerda.*** Ensaio de zimografia de células H358 e A549 tratadas com as concentrações indicadas do inibidor AI II ou com DMSO 0,1% (controle de veículo) por 72h. As bandas correspondentes a pró-MMP2 e pró-MMP9 estão indicadas. ***Direita***. Quantificação das bandas mostradas à esquerda por meio do software *Odyssey* (Licor).

Dado que as quinases AURKA e AURKB parecem regular a atividade gelatinolítica de metaloproteinases de matriz, nós decidimos, posteriormente, investigar se esta redução de atividade enzimática causada pela inibição farmacológica da atividade das quinases AURKA e AURKB estava relacionada a uma regulação negativa da expressão de MMP2 e MMP9. Por meio de ensaios de expressão proteica por *western blot*, nós observamos que a expressão de MMP2 e o processamento de MMP9 para a forma ativa é diminuído na presença de AI II em ambas as linhagens A549 e H358. Além disso, a forma zimogênica de MMP9 em A549 e H358 parece sofrer regulação positiva na presença de AI II, o que, mais uma vez, é condizente com a inibição do processamento de MMP9. De qualquer forma, nós demonstramos que as quinases Aurora são requeridas para o acúmulo das formas ativas de MMP2 e MMP9, que podem estar envolvidas com a invasão de células A549 e H358 **(Fig. 4.34)**.

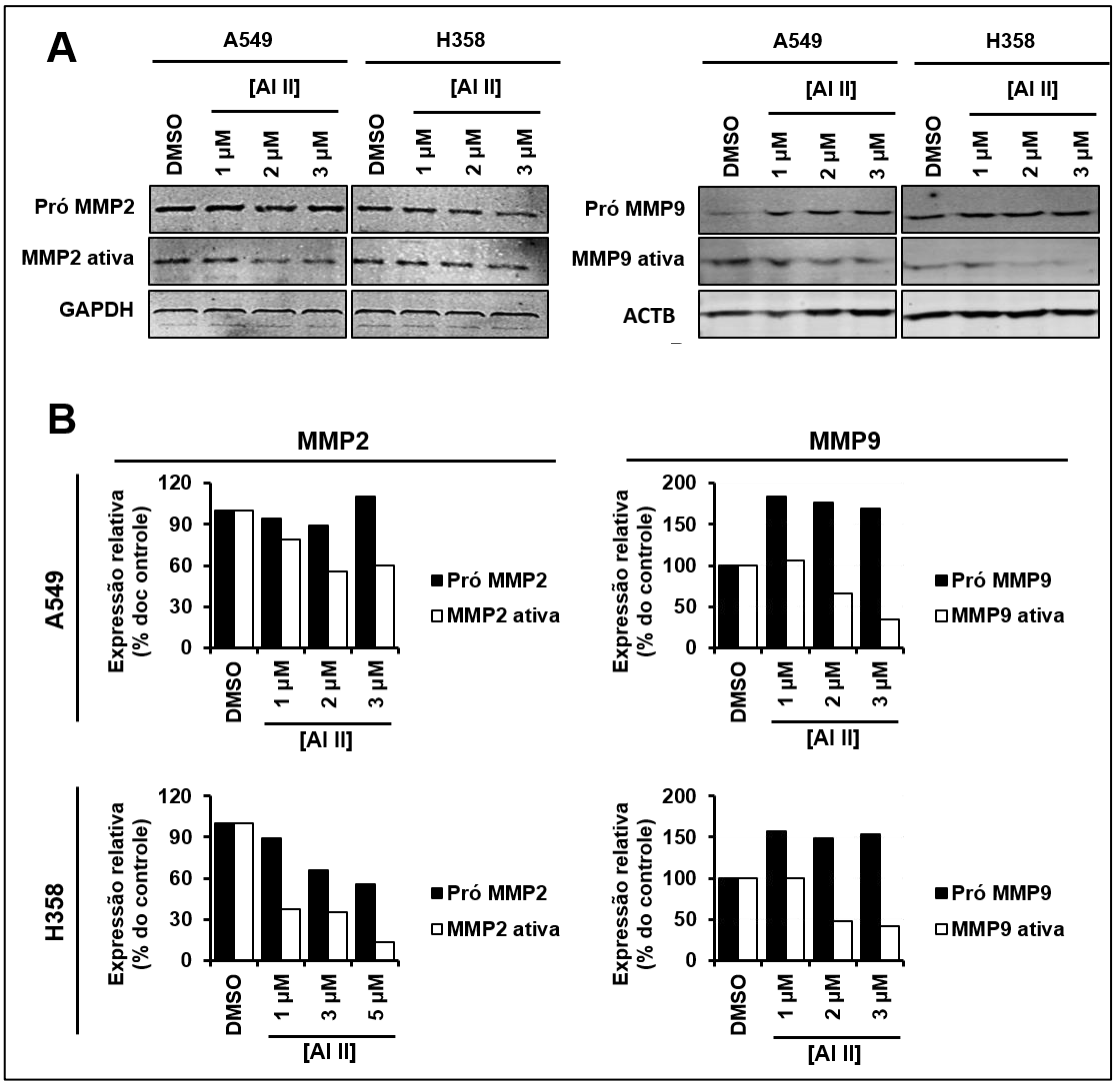


Fig. 4.34. A inibição farmacológica dual das quinases AURKA e AURKB reduz a abundância das formas ativas das metaloproteinases de matriz MMP2 e MMP9. (A) *Western blot* para células H358 e A549 tratadas com as concentrações indicadas do inibidor AI II ou com DMSO 0,1% (controle de veículo) por 72h. As bandas correspondentes às formas inativa e ativa de MMP2 e MMP9 estão indicadas. GAPDH e ACTB foram usados como controle de "*loading*". **(B)** Quantificação densitométrica das bandas por mostradas em (A) por meio do software Odyssey (Licor).

Por fim, embora não tivéssemos proposto no nosso plano de trabalho inicial, nós também decidimos investigar o papel de AURKA e AURKB sobre a capacidade de adesão de células portadoras de mutações em *KRAS*. Dado que a KRAS oncogênica regula a expressão de várias proteínas importantes para a adesão celular em tumores **(Liu et al, 2013; Satow et al, 2014; Alamo et al, 2015; Chu et al, 2015; Kim et al, 2016)**, incluindo tumores pulmonares **(Marcias-Perez et al, 2008; Rachagani et al, 2011; Symonds et al, 2016)**, e AURKA e AURKB são importantes efetores da atividade oncogênica de KRAS **(dos Santos, 2013)**, nós utilizamos os modelos celulares supramencionados para investigar os efeitos da inibição farmacológica de AURKA ou AURKB sobre a adesão de células portadoras de KRAS oncogênica.

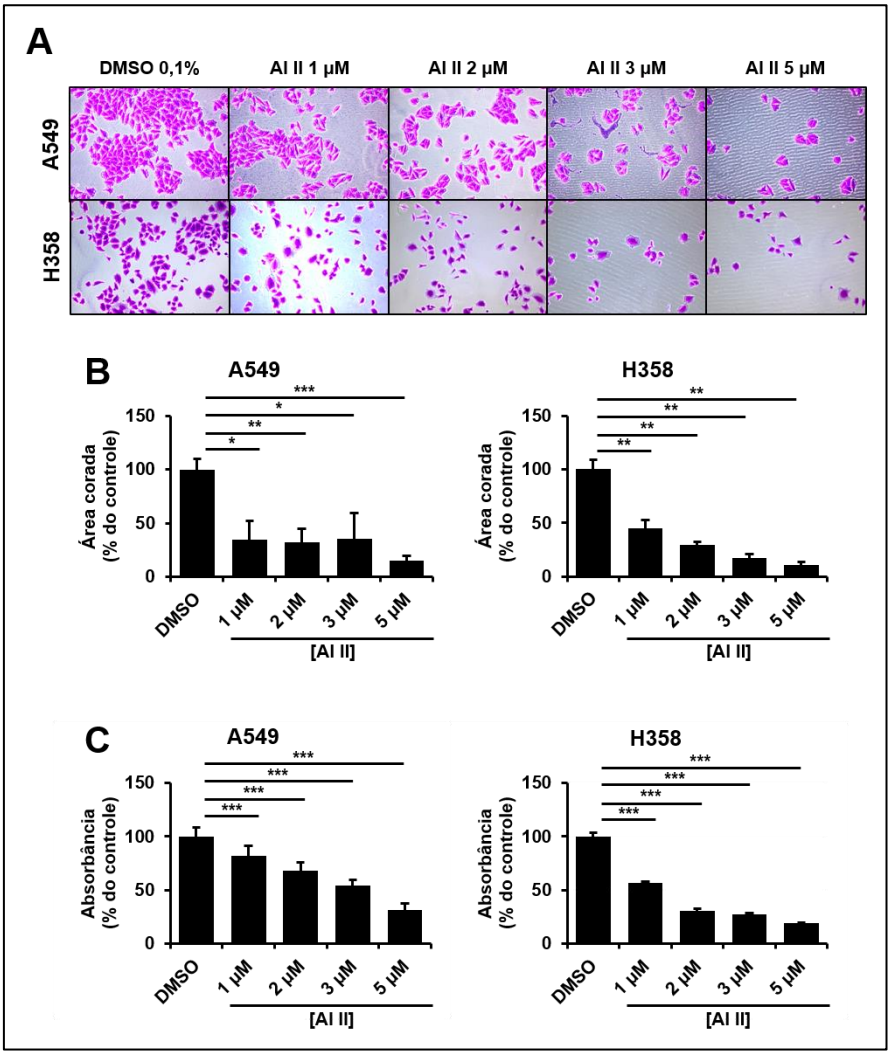


Fig. 4.35. A inibição farmacológica dual das quinases AURKA e AURKB reduz a adesão de células portadoras de KRAS oncogênica. (A) Imagens representativas de um ensaio funcional de adesão ao colágeno. Células A549 e H358 foram tratadas com as concentrações indicadas do inibidor AI II ou com DMSO 0,1% (controle de veículo) por 72h. **(B)** Quantificação da área corada das imagens representadas em (A) por meio do software ImageJ. **(C)** Ensaio de adesão celular combinado com ensaio de MTT, mostrando um decréscimo na redução de MTT de células aderidas mediante a inibição de AURKA ou AURKB. As barras de erro representam a média ± 1 DP. A significância estatística foi determinada através do teste t de Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Nossos resultados demonstraram que a inibição de AURKA e AURKB por AI II diminui fortemente a capacidade de adesão celular à matriz em ambas as linhagens celulares **(Fig. 4.35A)**, com um decréscimo de ~ 85% para células A549 e ~ 89% para células H358, considerando-se a maior concentração testada de AI II, em comparação ao controle DMSO, em ambos os casos **(Fig. 4.35B)**. Ainda assim, quando essas células são submetidas a um ensaio paralelo de redução de MTT, nós observamos uma redução da absorbância (e, portanto, do número de células aderidas à matriz) de ~ 69% para células A549 e ~ 80% para células H358, considerando-se a maior concentração testada de AI II, em comparação ao controle DMSO, em ambos os casos **(Fig. 4.35C)**. Portanto, a inibição de farmacológica de AURKA e/ou AURKB induz uma diminuição na capacidade de adesão de células A549 e H358.

4.7. A inibição das quinases AURKA e AURKB por interferência de RNA em células portadoras de mutação em *KRAS* reduz a migração, adesão e atividade proteolítica de metaloproteinases de matriz associadas à invasão celular.

Tendo demonstrado que a inibição farmacológica das quinases AURKA e AURKB em células portadoras de mutação em *KRAS* promove uma redução da migração, adesão e atividade proteolítica de metaloproteinases de matriz associadas à invasão celular (*ver Resultados, item 4.6)*, nós decidimos corroborar nossos resultados anteriores por meio da inibição de AURKA ou AURKB por RNA de interferência em células A549 e H358.

Para tanto, nós utilizamos células A549 e H358 geneticamente modificadas para expressar induzivelmente shRNAs contra KRAS (shKRAS#1 e shKRAS#2), AURKA (shAURKA#1 e shAURKA#2) ou AURKB (shAURKB#1 e shAURKB#2) e realizamos ensaios de *wound-healing*. Nossos resultados demonstram que a inibição de AURKA ou AURKB por RNA de interferência é capaz de reduzir a migração em 24 h (com uma diminuição da capacidade de migração celular de ~ 56-59% para KRAS, ~ 32-46% para AURKA e ~ 57-60% para AURKB, em relação ao controle shNTCtrl em células A549, e uma redução de ~ 43-49% para KRAS, ~ 45-55% para AURKA e ~ 43-45% para AURKB, em relação ao controle shNTCtrl em células H358) **(Fig. 4.36)**.

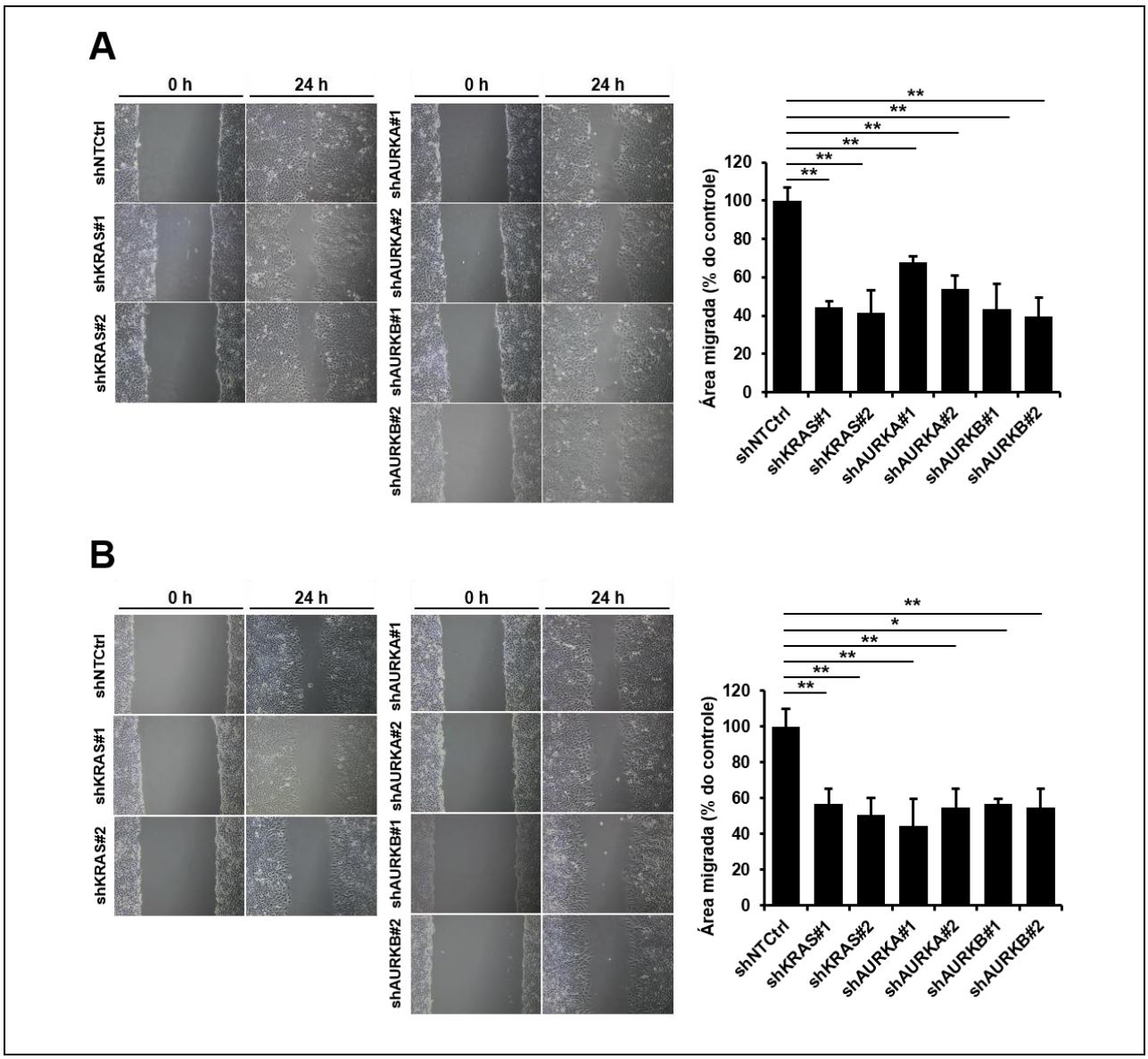


Fig. 4.36. A inibição da expressão de AURKA ou AURKB por interferência de RNA em células portadoras de mutações em *KRAS* reduz a migração celular. Ensaio de migração celular por *would-healing* em um período de 24 h para células **(A)** A549 e **(B)** H358 com expressão induzível por doxiciclina de 2 shRNAs diferentes para KRAS (shKRAS#1 e shKRAS#2), AURKA (shAURKA#1 e shAURKA#2) ou AURKB (shAURKB#1 e shAURKB#2), bem como células H358 e A549 expressando um shRNA inócuo (shNTCtrl). Todas as células representadas acima foram tratadas com 2 µg/mL de doxiciclina por 5 dias e então plaqueadas para a realização de cada ensaio. ***Esquerda.*** Imagens representativas da migração celular em 24 h de incubação. ***Direita.*** Quantificação da área migrada mostrada à esquerda e normalizada em função do controle shNTCtrl. As barras de erro representam a média ± 1 DP. A significância estatística foi determinada através do teste t de Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Posteriormente, para corroborar nossos ensaios de migração, nós utilizamos células A549 expressando um shRNA para AURKA e realizamos ensaios de migração celular baseados em técnicas de imageamento ao vivo, para avaliar a distância celular percorrida acumulada (∑ΔS) e a velocidade celular média (V). Nossos resultados demonstraram que a inibição de AURKA por interferência de RNA reduz consideravelmente a distância celular percorrida acumulada, bem como a velocidade celular

média, sugerindo um papel importante de AURKA para a migração de células portadoras de mutação em *KRAS* **(Fig. 4.37)**.

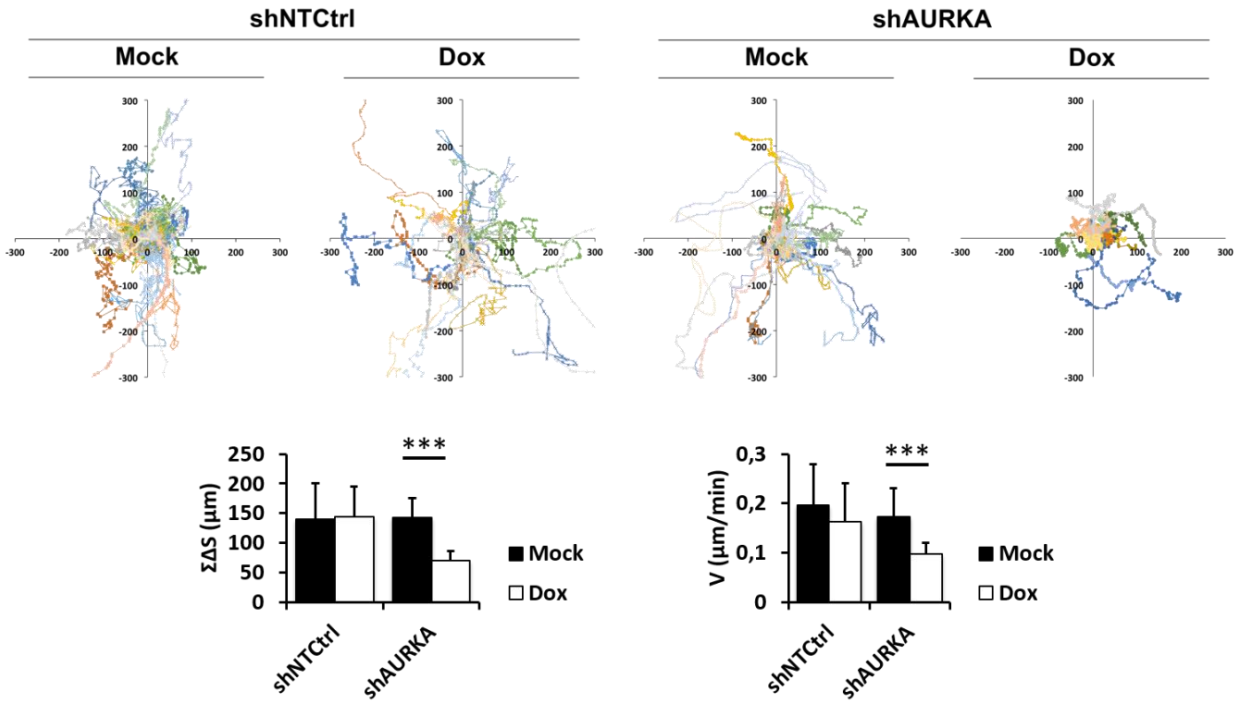


Fig. 4.37. A inibição de AURKA por interferência de RNA em células pulmonares portadoras de mutação em *KRAS* reduz a migração celular. Células A549 manipuladas para expressar de forma induzivel um shRNA para AURKA (shAURKA) ou um shRNA controle (shNTCtrl) foram tratadas (Dox) ou não (Mock) com doxiciclina 2 µg/mL por 72 h e, então, submetidas à análise da migração célula a célula por imageamento ao vivo, ao longo de 12 h. ***Acima***. Imagens representativas da migração celular individual e bidimensional normalizada para a coordenada (0,0), mostrando que a inibição de AURKA (shAURKA + Dox) induz um menor deslocamento celular no plano cartesiano. ***Abaixo***. Representação gráfica da migração celular individual em função da distância acumulada ao longo de 12 h (ΣΔS) e da velocidade escalar celular média (V). No mínimo 50 células em cada experimento independente foram utilizadas para a análise da migração celular. As barras de erro representam a média ± 1 DP. A significância estatística foi determinada através do teste t de Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Posteriormente, tendo uma vez demonstrado as quinases AURKA e AURKB são importantes para a invasão de células portadoras de KRAS oncogênica, nós decidimos corroborar nossos resultados de invasão celular por meio da inibição de AURKA e/ou AURKB por RNA de interferência. Para tanto, nós utilizamos células A549 e H358, que naturalmente apresentam mutações em *KRAS*, geneticamente modificadas para o silenciamento induzível de AURKA ou AURKB por interferência de RNA, e realizamos ensaios de atividade enzimática de MMP2 e MMP9 por zimografia. Uma vez que a inibição da expressão de AURKA ou AURKB com doxiciclina (Dox) levou a uma redução da atividade gelatinolítica de MMP2 e MMP9, nossos resultados mostram que essas quinases são proteínas importantes para a secreção de MMP2 e MMP9 em células tumorais transformadas por KRAS **(Fig. 4.38)**.

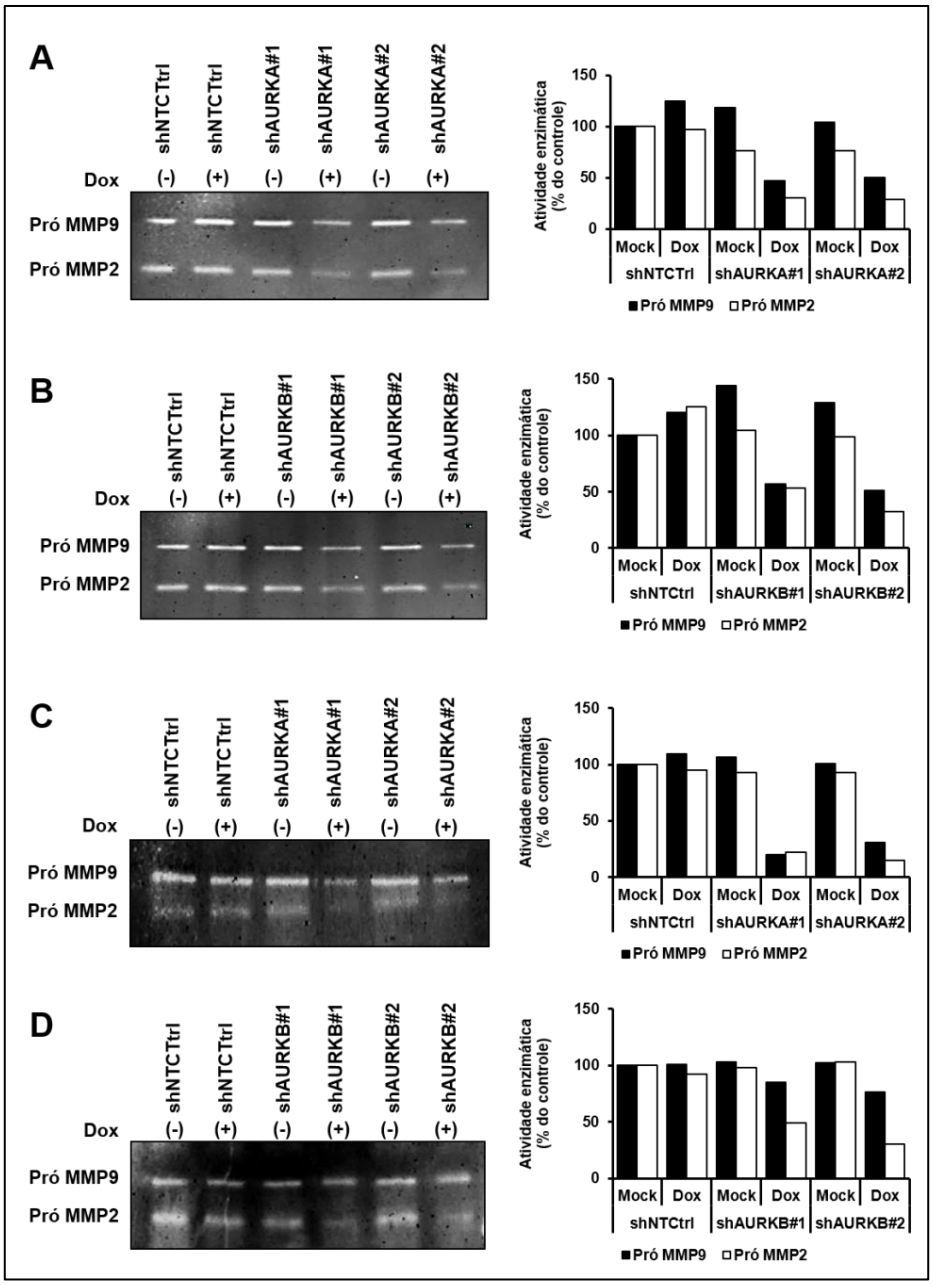


Fig. 4.38. A inibição da expressão de AURKA ou AURKB por interferência de RNA em células portadoras de mutações em *KRAS* reduz a atividade gelatinolítica das metaloproteinases de matriz MMP2 e MMP9. Células A549 **(painéis A e B)** e H358 **(painéis C e D)** com expressão induzível de 2 shRNAs distintos para AURKA (shAURKA#1 e shAURKA#2) ou para AURKB (shAURKB#1 e shAURKB#2) ou expressando um shRNA sem alvos conhecidos (shNTCtrl) foram tratadas com 2 ug/mL de doxiciclina (Dox) por 5 dias para induzir a expressão dos shRNAs ou não tratadas (Mock). ***Esquerda.*** Ensaio de zimografia. As bandas correspondentes à pró-MMP2 e pró-MMP9 estão indicadas. ***Direita.*** Quantificação densitométrica das bandas mostradas à esquerda realizada por meio do software ImageJ e normalizada em função do controle shNTCtrl não induzido com doxiciclina (Mock).

Por fim, embora não tivéssemos proposto em nosso plano de trabalho inicial, e tendo uma vez demonstrado que a inibição farmacológica de AURKA e/ou AURKB diminui a capacidade de adesão

de células portadoras de mutações em *KRAS*, nós também decidimos investigar se a inibição de AURKA ou AURKB por RNA de interferência diminuiria a adesão de células A549 e H358.

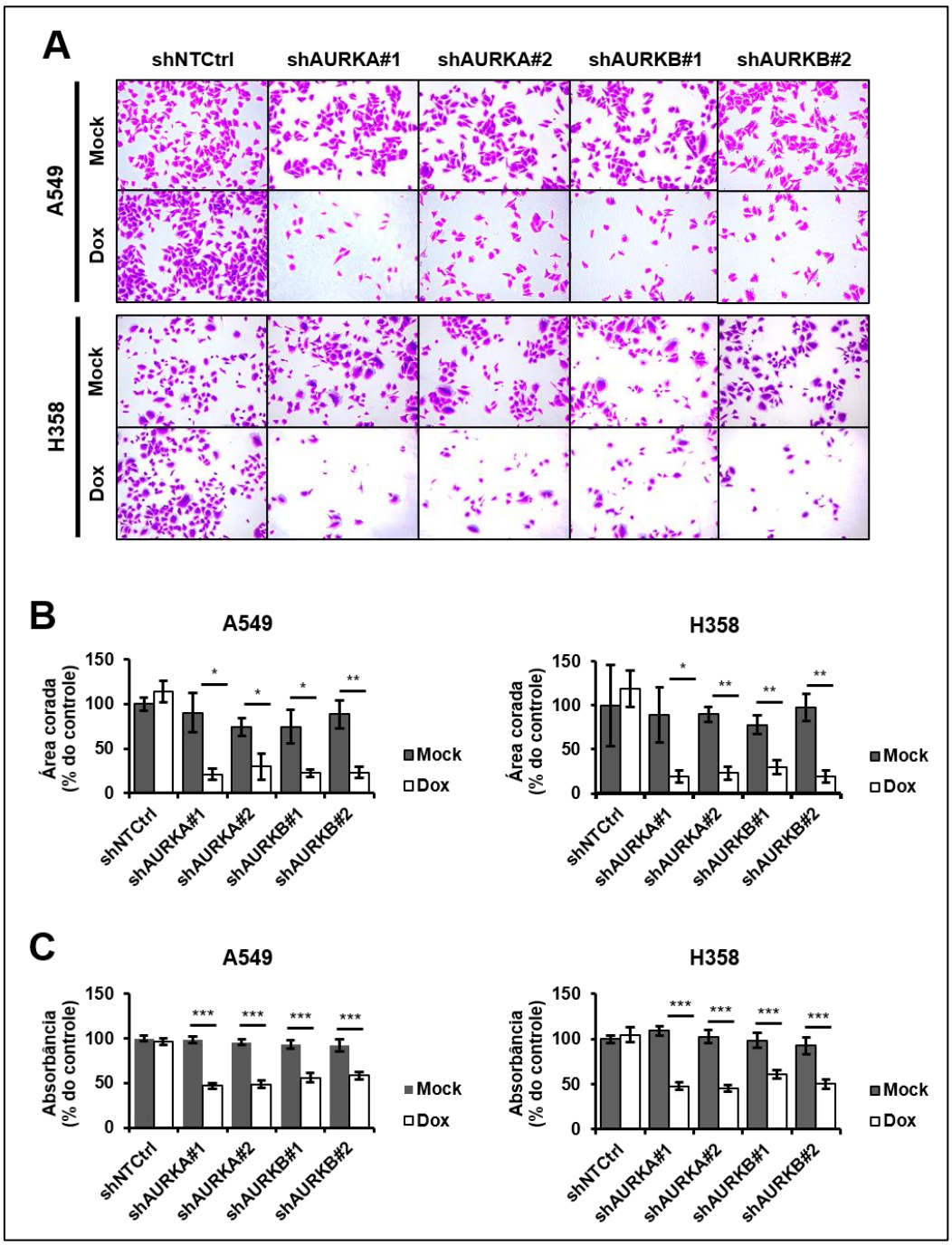


Fig. 4.39. As quinases AURKA e AURKB promovem a adesão de células portadoras de KRAS oncogênica. (A) Imagens representativas de um ensaio funcional de adesão ao colágeno. Células A549 e H358 com expressão induzível por doxiciclina (Dox) de 2 shRNAs diferentes para AURKA (shAURKA#1 e shAURKA#2) ou 2 shRNAs diferentes para AURKB (shAURKB#1 ou shAURKB#2), bem como células H358 e A549 expressando um shRNA inócuo (shNTCtrl) foram tratadas com 2 ug/mL doxiciclina (Dox) por 5 dias ou deixadas sem tratamento (Mock). **(B)** Quantificação da área corada das imagens representadas em (A) por meio do software ImageJ. **(C)** Ensaio de adesão celular combinado com ensaio de MTT, mostrando um decréscimo na redução de MTT de células aderidas mediante a inibição de AURKA ou AURKB. As barras de erro representam a média ± 1 DP. A significância estatística foi determinada através do teste t de Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Utilizando os mesmos modelos celulares descritos anteriormente, nós demonstramos que a inibição de AURKA e AURKB diminuem grandemente a capacidade de adesão à matriz em células portadoras de mutação em *KRAS* **(Fig. 4.39A)**. Quando analisamos a área total de células aderidas e coradas em cada condição, nós observamos uma redução da área corada (e, portanto, da capacidade de adesão) de ~ 60-77% para AURKA e ~ 70-74% para AURKB em células A549, e ~ 74-79% para AURKA e ~ 61-81% para AURKB em células H358, considerando-se as condições tratadas (Dox) em relação aos seus respectivos controles (Mock) em cada caso **(Fig. 4.39B)**. Ainda assim, quando essas células são submetidas a um ensaio paralelo de redução de MTT, nós observamos uma redução da absorbância (e, portanto, do número de células aderidas à matriz) de ~ 49-52% para AURKA e ~ 37-40% para AURKB em células A549, e ~ 55-56% para AURKA e ~ 38-46% para AURKB em células H358, considerando-se as condições tratadas (Dox) em relação aos seus respectivos controles (Mock) em cada caso **(Fig. 4.39C**), confirmando uma menor capacidade adesiva das células com inibição de AURKA ou AURKB. Portanto, nós propomos que as quinases AURKA e AURKB são importantes para a adesão de células portadoras de mutações em *KRAS*.

Tomados juntos, esses dados mostram importantes papéis não mitóticos para AURKA e AURKB e sugerem a inibição dessas quinases como potenciais alvos terapêuticos capazes de inibir a migração, invasão e adesão de células tumorais pulmonares portadoras de mutações oncogênicas em *KRAS*.

4.8. A inibição da quinase AURKA por interferência de RNA em células portadoras de mutação em *KRAS* promove uma redução da formação de tumores *in vivo*.

Para validar as quinases Aurora como potenciais alvos terapêuticos para o câncer de pulmão induzido por KRAS, é importante demonstrar que a inibição destas quinases reduz o crescimento tumoral induzido por KRAS *in vivo*. Tendo em vista que os nossos resultados *in vitro* foram semelhantes tanto para a AURKA, quanto para a AURKB (resultados descritos aqui e em **dos Santos (2013)** e **dos Santos et al,** (**2016)**, e tendo em vista que a AURKA vem sendo mais extensamente implicada na oncogênese, sendo requerida para a formação de tumores *in vivo* **(Tanaka et al, 2013; Jiang et al, 2014)**, nós realizamos estudos *in vivo* com a linhagem celular mutante para *KRAS* A549 com inibição induzível de AURKA por interferência de RNA para avaliar o efeito da inibição da expressão de AURKA no crescimento de tumores pulmonares xenográficos positivos para mutações em *KRAS*.

Para tanto, nós escolhemos nosso clone A549 shAURKA com melhor inibição induzível da expressão de AURKA (durante a etapa de validação), juntamente com nosso controle A549 shNTCtrl, e inoculamos subcutaneamente $2x10^6$ células em camundongos *nude*. Após aparecimento de tumores palpáveis, a doxiciclina foi adicionada à agua de beber (1 mg/ mL) para induzir a expressão do shRNA e o crescimento tumoral foi monitorado regularmente. A administração de doxiciclina em camundongos inoculados com A549 shAURKA reduziu significantemente o crescimento **(Fig. 4.40A)** e peso **(Fig. 4.40B)** de tumores formados. Estes efeitos não são oriundos da administração de doxiciclina, uma vez que o crescimento e peso tumorais não foram afetados por doxiciclina nos camundongos inoculados com A549 shNTCtrl. Por fim, a análise da expressão proteica de AURKA nos tumores dissecados confirma a inibição de AURKA somente nos tumores gerados a partir de células shAURKA tratadas com doxiciclina. **(Fig. 4.40C)**. Interessantemente, a análise da expressão proteica de CASP3 clivada nos tumores dissecados não revelou nenhuma diferença em relação ao controle experimental, tanto por *western blot* **(Fig. 4.40C)**, quanto por imunoistoquímica **(Fig. 4.40D)**, indicando que a redução do tamanho dos tumores envolve outros mecanismos que não a morte celular induzida por apoptose. De qualquer forma, nossos ensaios *in vivo* corroboram nossa hipótese de que AURKA é requerida para a tumorigenicidade de células A549 portadoras de mutação em *KRAS*.

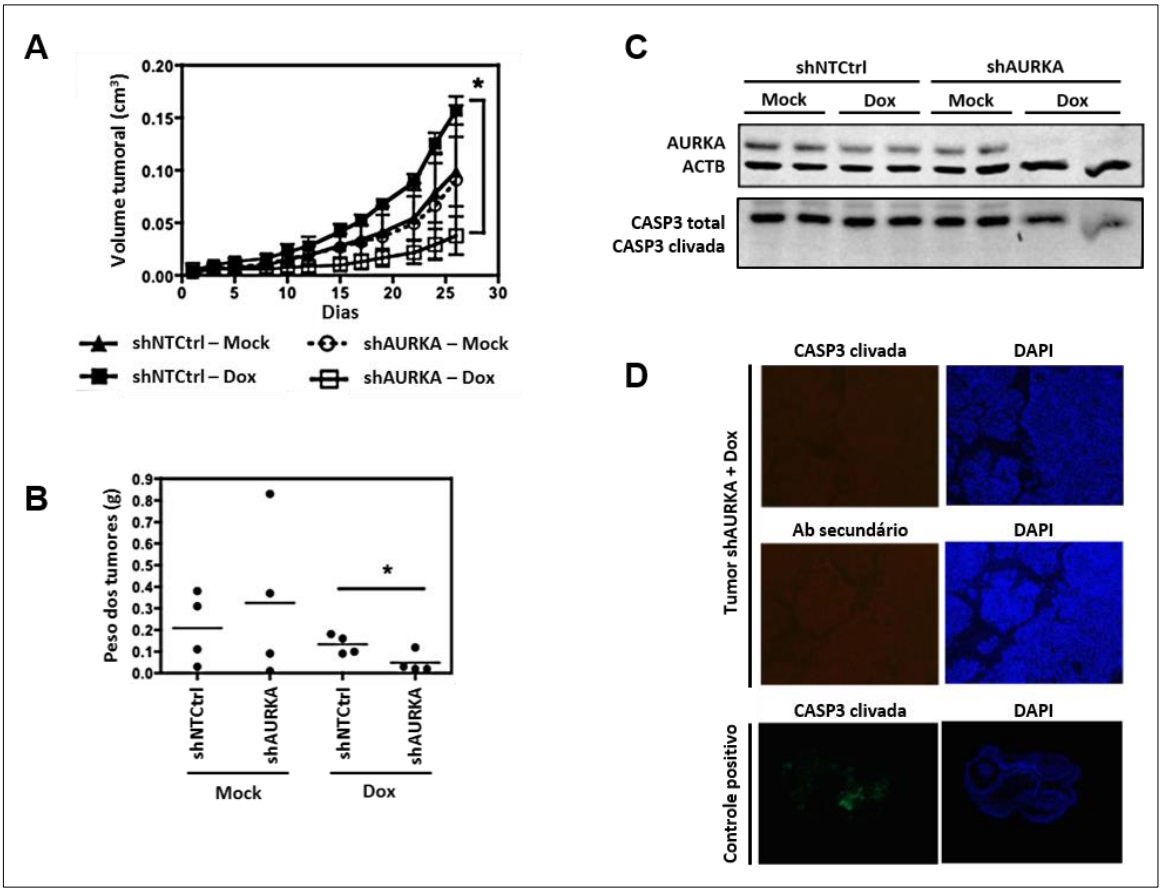


Fig. 4.40. A inibição da expressão de AURKA por interferência de RNA em células portadoras de mutação em *KRAS* reduz o crescimento de tumores xenográficos, mas não induz apoptose *in vivo*. Células A549 geneticamente modificadas para a expressão de um shRNA para AURKA (shAURKA) ou um shRNA sem homologia a genes humanos (shNTCtrl) foram subcutaneamente inoculadas em camundongos BalbC/nude (n=9 por grupo). A expressão do shRNA foi induzida pela adição de doxiciclina (Dox) na água de beber, conforme descrito nos métodos. Alternativamente, os camundongos foram inoculados com as células supramencionadas, mas não foram tratados (Mock, n=4 por grupo). **(A)** Volumes tumorais monitorados periodicamente após 26 dias do inóculo (dia 0). **(B)** Peso dos tumores após eutanásia (56 dias após inóculo). As barras de erro representam a média ± 1DP. **(C)** Análise da expressão de AURKA e CASP3 clivada por *western blot* após a excisão dos tumores. **(D)** Avaliação da morte celular por apoptose por imunofluorescência baseada na expressão de CASP3 clivada. Como controle positivo para presença de CASP3 clivada, usamos cortes histológicos de embriões de camundongo *knockout* para Ric-8B, cuja linhagem foi gerada a partir de células RRH188 (*Stryke et al, 2003*). A significância estatística foi determinada por ANOVA ("*one-way analysis of difference*") seguido do teste de Bonferroni para múltiplas comparações (*p<0.05) e as comparações com diferença significativa estão indicadas por barras verticais **(A)** ou horizontais **(B)**.

4.9. A KRAS oncogênica, não só induz a expressão de AURKA em células tumorais pulmonares, mas também do ativador de AURKA TPX2.

Nós demonstramos que a inibição das quinases AURKA e AURKB, alvos da atividade oncogênica de KRAS no câncer de pulmão, é eficiente na redução da malignidade tumoral. Entretanto, nossos estudos, assim como diversos outros na literatura, sugerem que a inibição de quinases mitóticas, como AURKA e, sobretudo AURKB, pode ser demasiadamente perigosa, uma vez que interfere na ploidia celular, além de induzir outras alterações genéticas, tanto em células tumorais quanto em células saudáveis, gerando predisposição à transformação maligna.

Tendo já sido demonstrado que TPX2, um importante ativador e estabilizador de AURKA, é também regulado por RAS, nós inicialmente hipotetizamos que a inibição de TPX2 poderia ser uma alterativa mais segura e/ou eficiente para inibir indiretamente a atividade oncogênica de AURKA no câncer de pulmão. Estudos já tinham demonstrado que TPX2 é requerido para atividade oncogênica de KRAS **(Morgan-Lappe et al, 2007)** e que a inibição farmacológica do complexo AURKA/TPX2 é capaz de modular alostericamente a atividade de AURKA **(Janeček et al, 2016)**. Entretanto, até hoje, nenhum estudo demonstrou se TPX2 é, de fato, regulado por KRAS no câncer de pulmão e se a inibição de TXP2 poderia especificamente reduzir a oncogenicidade de células portadoras de mutações em *KRAS*.

Para verificar se TPX2 é regulado positivamente por KRAS em células pulmonares, nós inicialmente utilizamos células tumorais pulmonares H1703 (que não expressam KRAS oncogênica), manipuladas para expressar induzivelmente HA-KRAS^{G12V} (G12V + Dox) ou não (T-RexB ± Dox; G12V - Dox). Uma vez induzida a expressão de HA-KRAS^{G12V}, nós demostramos que células G12V tratadas com doxiciclina (indutor), não só expressam a forma oncogênica de KRAS, e apresentam níveis aumentados de AURKA como já demonstrado anteriormente **(dos Santos, 2013)**, mas também apresentam níveis aumentados de TPX2 **(Fig. 4.41)**, indicando que TPX2 é regulado positivamente por KRAS em células pulmonares

Entretanto, sabendo-se que (1) KRAS induz proliferação celular e (2) AURKA e TPX2 são proteínas expressas sobretudo em mitose, nós resolvemos investigar se o aumento dos níveis de AURKA e TPX2 estavam associados a uma maior proporção de células mitóticas em cultura. Para verificar se a indução de KRAS oncogênica aumentava o índice mitótico em células H1703, nós realizamos novamente ensaios de expressão proteica por *western blot* para determinar os níveis de

ciclina B1 (CCNB1), como marcador de mitose celular. Nossos resultados demonstram que KRAS oncogênica eleva os níveis de CCNB1 em extrato proteico total, confirmando um aumento do índice mitótico induzido por KRAS **(Fig. 4.42)**. Portanto, o aumento da expressão de AURKA e TPX2 observado é devido, pelo menos em parte, à maior presença de células mitóticas nas amostras estudadas.

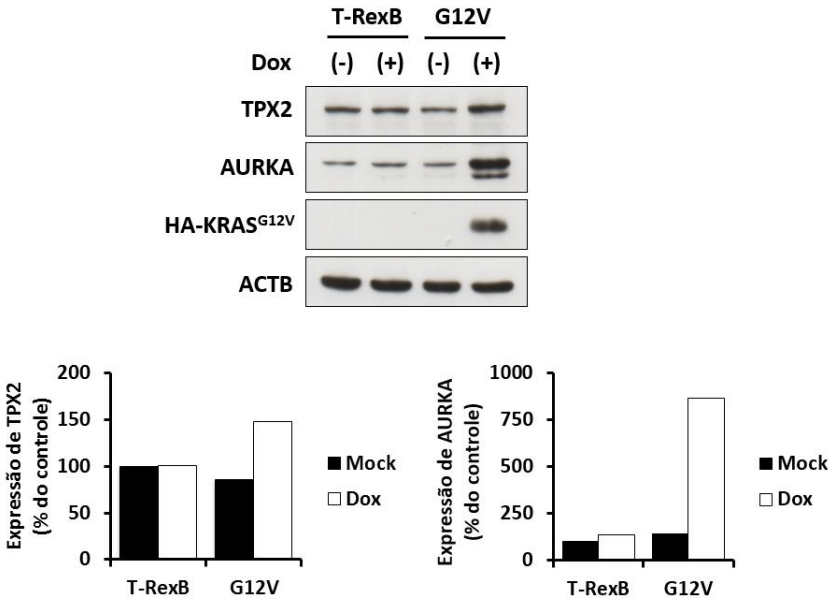


Fig. 4.41. A indução de KRAS^{G12V} leva ao aumento da expressão de AURKA e TPX2 em extratos proteicos totais de células geneticamente manipuladas para expressar KRAS oncogênica. *Acima.* Células H1703 foram tratadas ou não com doxiciclina (Dox) 2 ug/mL por 7 dias e os respectivos lisados submetidos à análise da expressão proteica de AURKA e TPX2 por *western blot*, mostrando que HA-KRAS^{G12V} leva a um aumento de AURKA e TPX2. ***Abaixo.*** Quantificação densitométrica das bandas representadas acima por meio do software *Image*J (NCBI).

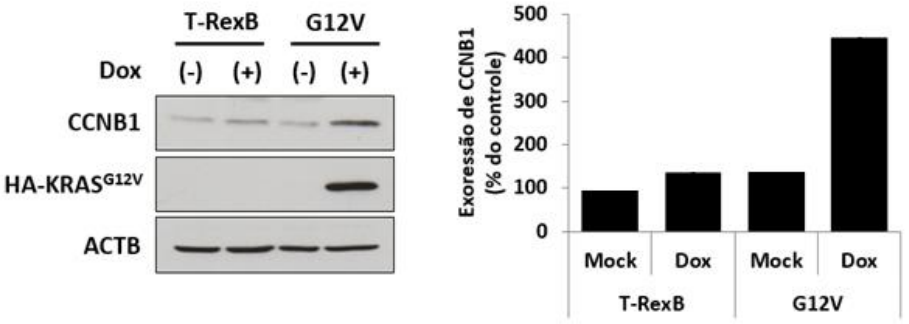


Fig. 4.42. A indução de KRAS^{G12V} leva ao aumento da expressão de CCNB1 em extratos proteicos totais de células geneticamente manipuladas para expressar KRAS oncogênica. *Acima.* Células H1703 foram tratadas ou não com doxiciclina (Dox) 2 ug/mL por 7 dias e os respectivos lisados submetidos à análise da expressão proteica de CCNB1 por *western blot*, mostrando que HA-KRAS^{G12V} induz aumento de CCNB1. ***Abaixo.*** Quantificação densitométrica das bandas representadas acima por meio do software *Image*J (NCBI).

Além disso, nós realizamos ensaios de imunoflourescência em células H1703 expressando KRAS oncogênica ou não, e quantificamos a expressão de AURKA e TPX2 associadas ao fuso mitótico somente em células em prometáfase e metáfase, que são as fases do ciclo celular de maior expressão dessas proteínas. Nossos resultados mostram que a indução de KRAS oncogênica induz um aumento de 301% sobre a expressão de AURKA e 274% sobre a expressão de TPX2, quando comparamos células H1703 G12V induzidas com doxiciclina com células H1703 G12V não induzidas. Portanto, a expressão mitótica de AURKA e TPX2 é fortemente regulada por KRAS oncogênica **(Fig. 4.43)**.

Por outro lado, uma vez que o potencial oncogênico de AURKA e TPX2 implica o envolvimento dessas proteínas em eventos celulares não mitóticos, como migração, invasão e resistência à morte celular, nós decidimos investigar se KRAS oncogênica regulava AURKA e TPX2 em interfase. Nossos resultados mostram que a expressão nuclear de AURKA e TPX2 é, respectivamente, 278% e 238% maior em células H1703 G12V que expressam KRAS oncogênica, em comparação ao seu controle não induzido. Ainda assim, a expressão nuclear e citoplasmática de AURKA, quando considerada conjuntamente, aumenta 172% quando células H1703 G12V são induzidas a expressar $KRAS^{G12V}$. Portanto, KRAS oncogênica induz aumento da expressão de AURKA e TPX2 nucleares, bem como de AURKA quando quantificada em toda a célula **(Fig. 4.44 e Fig. 4.46)**.

Entretanto, como visto, o aumento de AURKA nuclear é consideravelmente maior em relação ao aumento de AURKA citoplasmática quando células H1703 G12V são induzidas a expressar $KRAS^{G12V}$ **(Fig. 4.44 B e C)**. Isso poderia indicar que a presença de KRAS oncogênica induz uma redistribuição celular de AURKA para o núcleo durante a interfase. Para checar esta hipótese, nós utilizamos o mesmo sistema descrito para células H1703 e quantificamos a relação AURKA nuclear/AURKA citoplasmática em todas as condições testadas. Nossos resultados mostram que AURKA é 149% mais nuclear em células H1703 G12V que expressam $KRAS^{G12V}$, em relação ao seu controle não induzido **(Fig. 4.45)**. Isso demonstra que KRAS não somente regula a expressão de AURKA, mas também regula a sua localização subcelular em células tumorais pulmonares transformadas por KRAS.

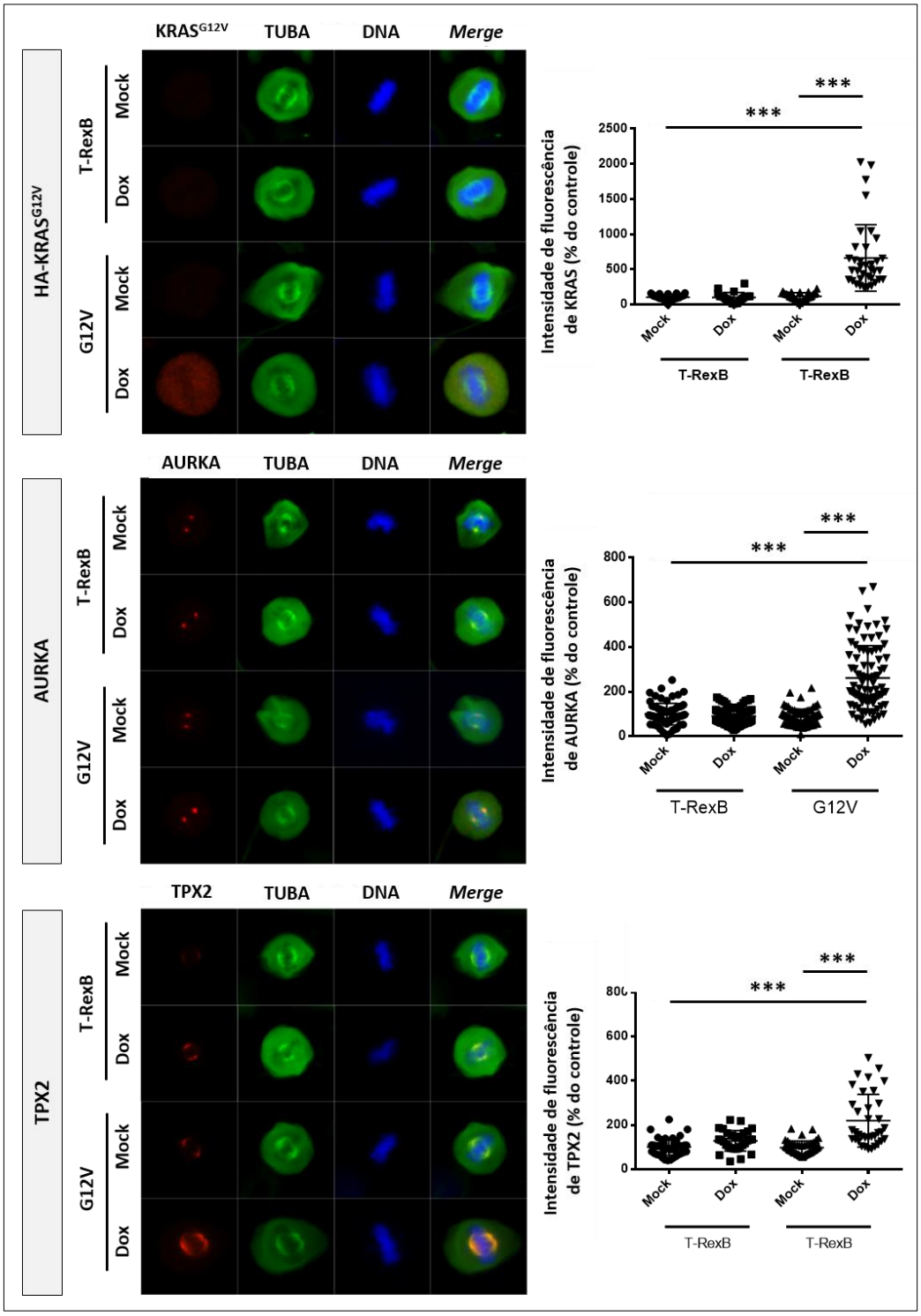


Fig. 4.43. A indução de KRAS^{G12V} leva a um aumento dos níveis mitóticos de AURKA e TPX2 em células geneticamente manipuladas para expressar KRAS oncogênica. Células H1703 foram plaqueadas e tratadas com doxiciclina (Dox) 2 ug/mL por 48h ou deixadas sem tratamento (Mock), fixadas e submetidas a ensaios de imunoflourescência para detecção de HA-KRAS^{G12V}, AURKA e TPX2. ***Direita***. Imagens representativas de células mitóticas em metáfase. ***Esquerda.*** Quantificação de KRAS, AURKA e TPX2, normalizada em função do controle T-RexB Mock. As barras de erro representam a média ± 1 DP. A significância estatística foi determinada através do teste t de Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

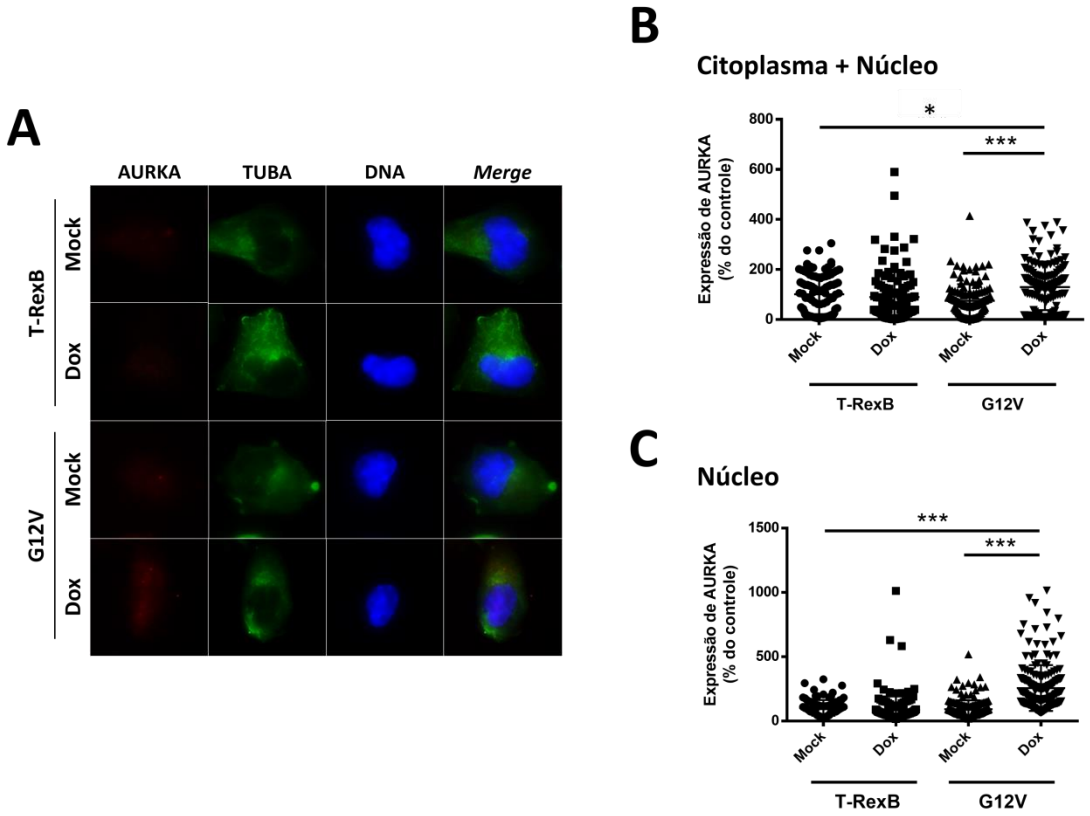


Fig. 4.44. A indução de KRAS^{G12V} leva a um aumento de AURKA em interfase em células geneticamente manipuladas para expressar KRAS oncogênica. Células H1703 foram plaqueadas e tratadas com doxiciclina (Dox) 2 ug/mL por 48h ou deixadas sem tratamento (Mock), fixadas e submetidas a ensaios de imunoflourescência para detecção de AURKA. **(A)** Imagens representativas, mostrando que células G12V apresentam maior expressão de AURKA em interfase. **(B e C)** Quantificação das mesmas imagens demonstrando a variação da expressão de AURKA presente em toda a célula **(B)** ou somente no núcleo **(C)** de células em interfase. As barras de erro representam a média ± 1 DP. A significância estatística foi determinada através do teste t de Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

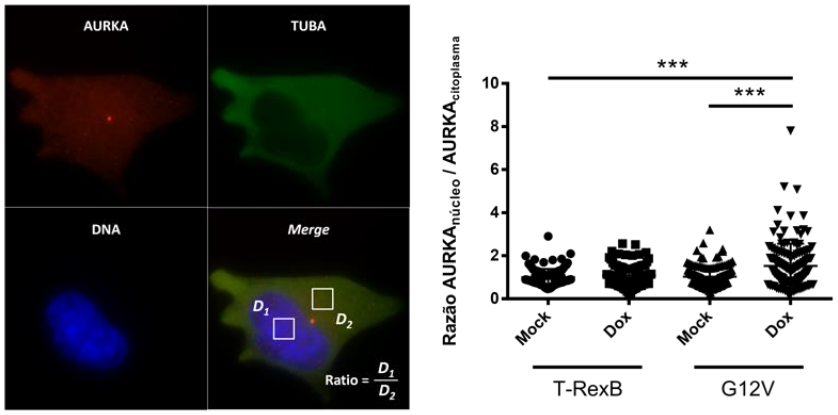


Fig. 4.45. A indução de KRAS^{G12V} induz o acúmulo de AURKA nuclear em interfase. Células H1703 foram plaqueadas e tratadas com doxiciclina (Dox) 2 ug/mL por 48h ou deixadas sem tratamento (Mock), fixadas e submetidas a ensaios de imunoflourescência para detecção de AURKA. Quantificação da distribuição subcelular de AURKA por meio da quantificação da relação AURKA$_{nuclear}$/AURKA$_{citoplasmática}$ célula a célula, demonstrando que a indução de KRAS^{G12V} induz acúmulo nuclear de AURKA. As barras de erro representam a média ± 1 DP. A significância estatística foi determinada através do teste t de Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

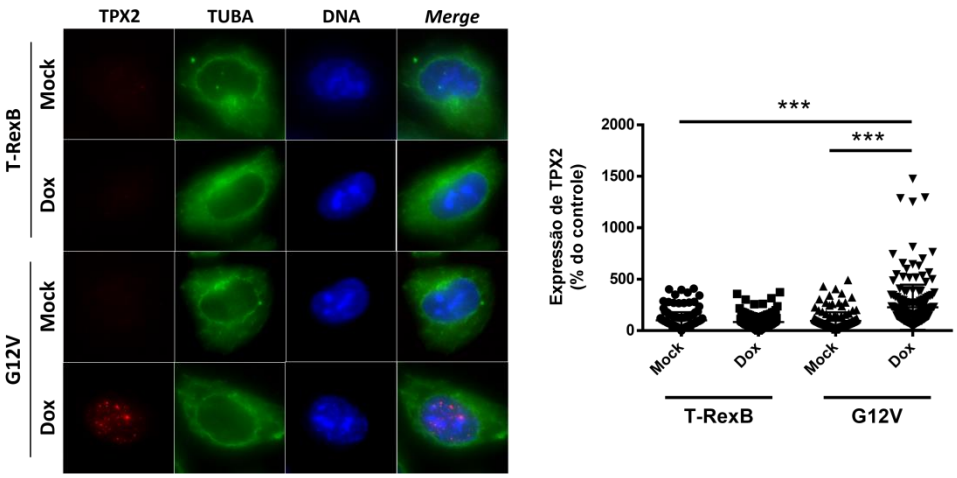


Fig. 4.46. A indução de KRAS^{G12V} leva a um aumento de TPX2 em interfase em células geneticamente manipuladas para expressar KRAS oncogênica. Células H1703 foram plaqueadas e tratadas com doxiciclina (Dox) 2 ug/mL por 48h ou deixadas sem tratamento (Mock), fixadas e submetidas a ensaios de imunoflourescência para detecção de TPX2. ***Esquerda.*** Imagens representativas, mostrando que células G12V induzidas apresentam maior expressão de TPX2 em interfase, em comparação aos respectivos controles. ***Direita.*** Quantificação das mesmas imagens mostrando a variação da expressão de TPX2 em interfase. As barras de erro representam a média ± 1 DP. A significância estatística foi determinada através do teste t de Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Sabendo-se que KRAS^{G12V} regula AURKA e TPX2 em células H1703 (ver resultados anteriores), nós, posteriormente, decidimos investigar se a expressão de KRAS oncogênica ocorria simultaneamente à expressão de AURKA ou TPX2 nas mesmas células, ou se esses dados refletiam apenas uma flutuação heterogênea do aumento de expressão dessas proteínas. Para tanto, nós realizamos ensaios de imunoflourescência de células H1703 duplamente marcadas com anticorpos anti-KRAS e anti-AURKA, bem como anti-KRAS e anti-TPX2. Ademais, tendo uma vez observado que alguns trabalhos descrevem AURKA e TPX2 como uma holoenzima oncogênica **(Asteriti et al, 2010)**, nós decidimos também investigar se o aumento de AURKA e TPX2 ocorria também simultaneamente, o que daria suporte à ideia de que KRAS regula a expressão deste complexo holoenzimático. Para tanto, utilizamos as mesmas células H1703 e realizamos ensaios de imunofluorescência com dupla marcação anti-AURKA e anti-TPX2. Em todos os casos, nossos resultados mostram que, após 48 h de indução com doxiciclina, o aumento de KRAS, AURKA e TPX2 ocorre simultaneamente, com índices de correlação linear (R^2) de 0,658 para AURKA/TPX2, 0,3868 para KRAS/AURKA e 0,8077 para KRAS/TPX2, demonstrando que essas proteínas são mutuamente reguladas e sugerindo um papel importante para a oncogênese mediada pelo complexo AURKA/TPX2 **(Fig. 4.47)**.

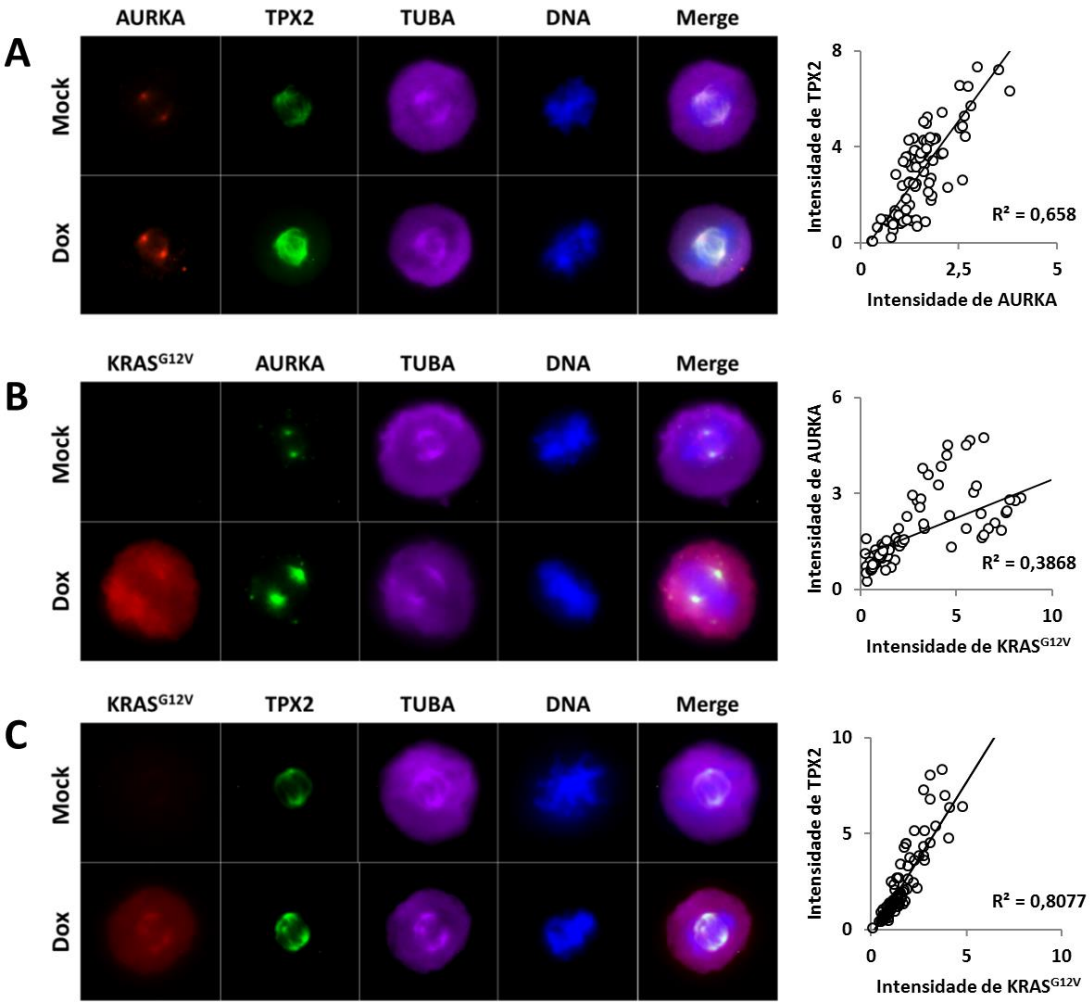


Fig. 4.47. A superexpressão KRAS^{G12V} é acompanhada pela co-expressão de AURKA e TPX2. A marcação dual de AURKA/TPX2 **(A)** sugere que este complexo funciona como uma unidade oncogênica, duplamente regulado por KRAS^{G12V} **(B e C)**. ***Esquerda***. Imagens representativas da marcação dual de AURKA/TPX2, KRAS/AURKA e KRAS/TPX2, mostrando um aumento conjunto na coexpressão dessas proteínas. ***Direita.*** Quantificação da intensidade de fluorescência combinada em cada caso, onde cada ponto representa a intensidade de fluorescência de duas proteínas diferentes em uma única célula, mostrando um aumento mútuo e progressivo da expressão de KRAS, AURKA e TPX2.

4.10. A expressão de AURKA e TPX2 está aumentada em pacientes de câncer de pulmão portadores de mutações oncogênicas em *KRAS* e está associada a um pior prognóstico.

Tendo uma vez demonstrado que KRAS regula a expressão do complexo holoenzimático AURKA/TPX2 em linhagens celulares tumorais geneticamente modificadas para a expressão de KRAS oncogênica (*ver Resultados, item 4.9*), nós decidimos investigar se AURKA e TPX2 também são regulados por KRAS oncogênica em tumores pulmonares humanos reais. Para tanto, nós utilizamos a plataforma online *SurvExpress – Biomarker validation for cancer gene expression*, disponível em http://bioinformatica.mty.itesm.mx:8080/Biomatec/SurvivaX.jsp, para realizar a análise de bioinformática da expressão de AURKA e TPX2 em amostras de pacientes portadores de NSCLC (que apresentam alta taxa de mutação em *KRAS*) pertencentes ao banco de dados *Lung Meta-base: 6 cohorts 22K genes*, bem como avaliar se a expressão de AURKA ou TPX2 estaria associada com o prognóstico em NSCLC. Através desta análise, nós determinamos que pacientes portadores de tumores de alto risco de menor sobrevida global apresentam maior expressão de AURKA e TPX2 em relação a pacientes portadores de câncer de pulmão de baixo risco **(Fig. 4.48)**. Ademais, nós observamos que uma alta expressão de AURKA ou TPX2 nestes mesmos tumores está associada a uma redução considerável na sobrevida de pacientes com NSCLC **(Fig. 4.49)**. Tomados juntos, esses dados sugerem AURKA e TPX2 como alvos de KRAS, são importantes para o fenótipo maligno induzido por esta oncoproteína no câncer de pulmão.

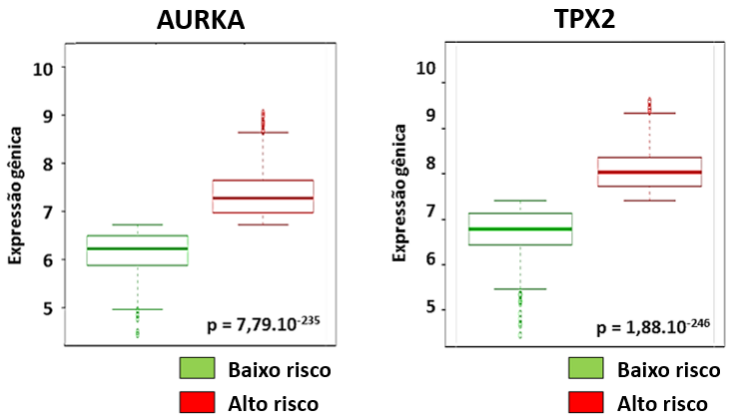


Fig. 4.48. A alta expressão de AURKA e TPX2 está associada a NSCLC de alto risco. Análise de bioinformática da expressão de AURKA e TPX2 em NSCLC, subclassificados em tumores de alto e baixo risco de menor sobrevida, de acordo com o banco de dados online *SurvExpress – Biomarker validation for cancer gene expression*, mostrando que ambos AURKA e TPX2 são superexpressos em tumores pulmonares mais agressivos.

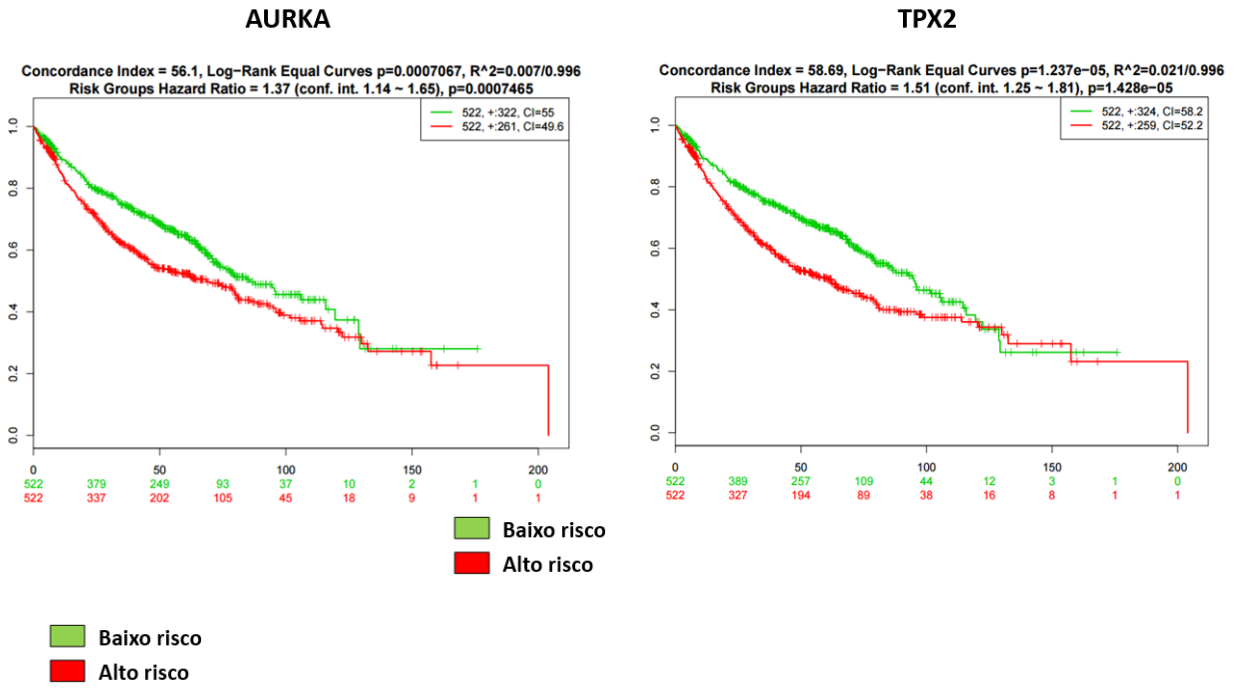


Fig. 4.49. A expressão alta de AURKA ou TPX2 está associada à menor sobrevida de pacientes com NSCLC. Análise de bioinformática da expressão de AURKA ou TPX2 em NSCLC, e sua relação com a sobrevida de pacientes portadores de NSCLC, de acordo com o banco de dados online *SurvExpress – Biomarker validation for cancer gene expression*, mostrando que a superexpressão de AURKA ou TPX2 induz menor sobrevida dos pacientes.

4.11. A inibição de TPX2 por interferência de RNA reduz o crescimento e viabilidade celulares e induz morte de modo dependente de KRAS^{G12V}.

Tendo uma vez demonstrado que TPX2 é alvo da atividade de KRAS oncogênica e para caracterizar TPX2 como alvo terapêutico no câncer de pulmão induzido por mutações em KRAS, nós utilizamos células A549, que naturalmente expressam KRAS oncogênica, além de células H1703, expressando ou não a forma oncogênica de KRAS, para inibir TPX2 por RNA de interferência. Por meio de ensaios de viabilidade baseados na formação de colônias em substrato sólido, nós demonstramos que a inibição de TPX2 induz a perda total da viabilidade de células A549 **(Fig. 50)**. Mais interessante, a inibição de TPX2 em células H1703 induz maior redução de viabilidade na presença de KRAS^{G12V}, mais devida à redução da viabilidade propriamente dita (número de colônias), do que à proliferação celular (área das colônias), sugerindo que células possuindo KRAS^{G12V} são mais sensíveis à inibição de TPX2 **(Fig. 51)**.

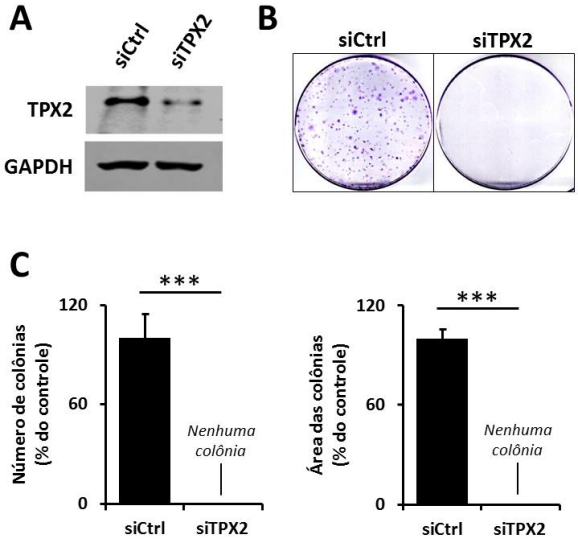


Fig. 50. A inibição de TPX2 em células pulmonares transformadas por KRAS induz a perda completa da viabilidade celular. A. *Western blot* mostrando a redução da expressão de TPX2 mediada por RNA de interferência em células A549. **B.** A inibição de TPX2 em células A549 induz a perda total da viabilidade celular. **C.** Quantificação do número (*à esquerda*) e área (*à direita*) das colônias mostradas em B. As barras de erro representam a média ± 1 DP. A significância estatística foi determinada através do teste t de Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Para saber se os efeitos da inibição de TPX2 sobre a viabilidade de células A549 e H1703 eram devidos a uma menor proliferação celular e/ou maior indução de morte celular, nós realizamos

ensaios de ciclo celular baseados em técnicas de citometria de fluxo, por meio da marcação dessas células com iodeto de propídeo (PI). Nossos resultados demonstraram que a inibição de TPX2 induz um bloqueio em G2/M, além de aumentar a população de células em subG1, indicando morte celular **(Fig. 52)**. Mais interessante, a inibição de TPX2 induz bloqueio em G2/M e induz morte celular mais intensamente em células que expressam KRAS^{G12V}, sugerindo que células portadoras de KRAS oncogênica são mais sensíveis à inibição de TPX2 **(Fig. 53)**.

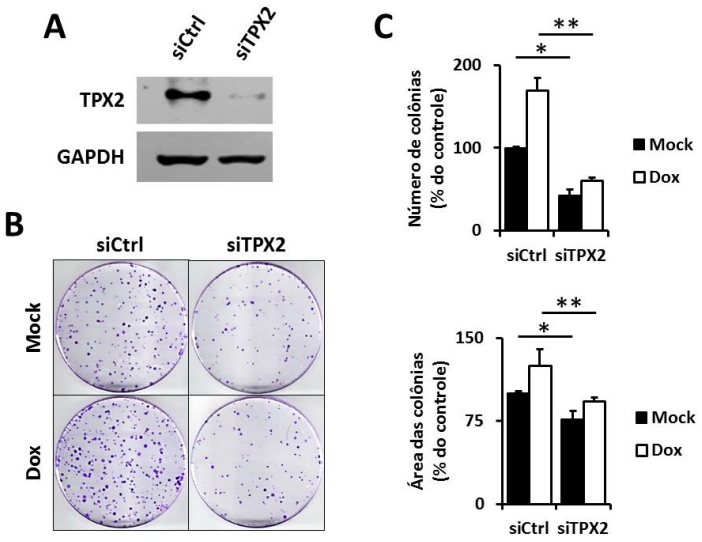


Fig. 51. A inibição de TPX2 reduz a viabilidade celular preferencialmente em células tumorais pulmonares portadoras de mutações em *KRAS*. A. *Western blot* a partir dos extratos proteicos mostrando a redução da expressão de TPX2 mediada por RNA de interferência em células H1703 G12V. **B.** A inibição de TPX2 (siTPX2) em células H1703 G12V induz uma maior redução da viabilidade celular na presença de KRAS oncogênica (Dox) quando comparada aos respectivos controles (siCtrl ou Mock). **C.** Quantificação do número (*acima*) e área (*abaixo*) das colônias mostradas em B, mostrando que células portadoras de mutações em *KRAS* (Dox) apresentam uma maior redução da viabilidade em relação a células tumorais não mutantes para *KRAS* (Mock). As barras de erro representam a média ± 1 DP. A significância estatística foi determinada através do teste t de Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

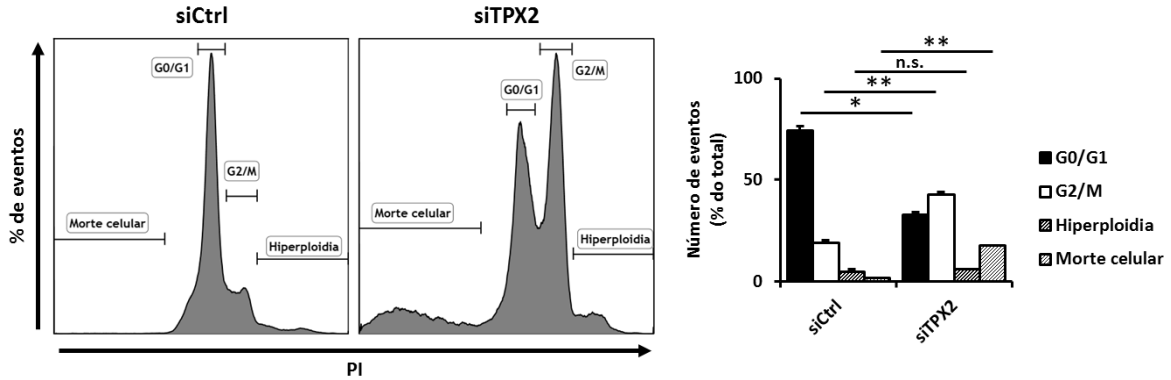


Fig. 52. A inibição de TPX2 em células portadoras de mutação em KRAS induz bloqueio em G2/M, hiperploidia e morte celular. Células A549 expressando siRNAs contra TPX2 (siTPX2) ou siRNAs sem homologia a genes humanos (siCtrl) foram submetidas a ensaios de citometria de fluxo baseados na incorporação de PI. ***Esquerda*.** Representação gráfica da distribuição das populações em função do ciclo celular. ***Direita***. Quantificação das populações mostradas à direta. As barras de erro representam a média ± 1 DP. A significância estatística foi determinada através do teste t de Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

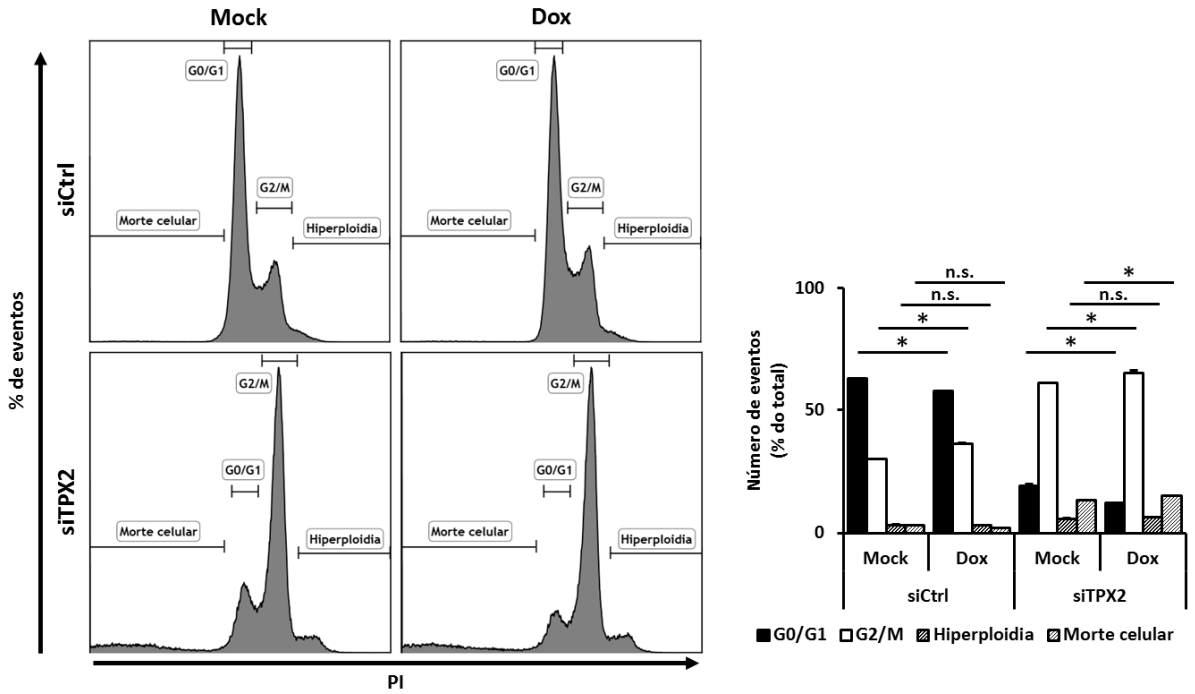


Fig. 53. A inibição de TPX2 por RNA de interferência em células geneticamente modificadas para expressar induzivelmente KRAS^{G12V} causa morte celular de modo levemente dependente de KRAS oncogênica. Células H1703 G12V previamente induzidas com doxiciclina 2 ug/mL (Dox) ou não (Mock) e expressando siRNAs contra TPX2 (siTPX2) ou siRNAs sem homologia a genes humanos (siCtrl) foram submetidas a ensaios de citometria de fluxo baseados na incorporação de PI. ***Esquerda.*** Representação gráfica da distribuição das populações em função do ciclo celular. ***Direita***. Quantificação das populações mostradas à direta. As barras de erro representam a média ± 1 DP. A significância estatística foi determinada através do teste t de Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Portanto, esses resultados sugerem que TPX2 é um importante efetor da atividade oncogênica de KRAS no câncer de pulmão e apontam esta proteína como um potencial alvo terapêutico no câncer de pulmão induzido por mutações em *KRAS*.

Tomados em conjunto, os resultados descritos nesta tese sugerem que KRAS ativa o complexo TPX2/AURKA e ativa também a AURKB, sendo que estas vias são importantes para promover proliferação, sobrevida, migração, adesão e crescimento tumoral de células pulmonares portadoras de KRAS oncogênica. Embora a inibição de AURKA e AURKB esteja associada com anomalias mitóticas e a inibição de TPX2 com hiperploidia, o que poderia comprometer o uso destas proteínas como alvos terapêuticos, a frequência destas anomalias está diretamente relacionada com a frequência de morte celular, sugerindo que a inibição destas proteínas pode sensibilizar às células a outras terapias citotóxicas. A observação de efeitos preferencialmente em células expressando KRAS oncogênica indica a existência de uma janela terapêutica a ser explorada que pode resultar no desenvolvimento de uma terapia-alvo benéfica para os pacientes portadores de NSCLC com mutações em *KRAS*.

5. DISCUSSÃO

Anteriormente ao desenvolvimento deste trabalho nós havíamos demonstrado que (1) AURKA e AURKB são alvos transcricionais de *KRAS* no câncer de pulmão; (2) a inibição AURKA ou AURKB por RNA de interferência, assim como sua inibição farmacológica dual, promove uma redução no crescimento, viabilidade e oncogenicidade de células A549 e H358 positivas para mutações em *KRAS;* e (3) estes efeitos eram dependentes da presença de KRAS oncogênica **(dos Santos, 2013; dos Santos et al, 2016)**.

Neste trabalho, para melhor caracterizar as quinases AURKA e AURKB como potenciais alvos terapêuticos no câncer de pulmão induzido por mutações em *KRAS*, nós decidimos inicialmente avaliar qual o mecanismo de redução do crescimento e perda de viabilidade associado à inibição de AURKA e AURKB em células A549 e H358 (*Objetivo Específico 1).*

A redução do crescimento e perda de viabilidade observada em nossos estudos precedentes poderia estar associada à menor proliferação e/ou menor resistência à morte celular. Por meio de ensaios de proliferação celular por citometria de fluxo baseados na incorporação de BrdU, nós demonstramos que a inibição farmacológica ou por interferência de RNA de AURKA ou AURKB em A549 e H358 induz acúmulo da população G2/M, além de uma redução da proliferação celular (fase S) **(Figs. 4.4 e 4.18)**. Esses resultados são consistentes com o fato de que AURKA e AURKB são quinases mitóticas, requeridas para a proliferação celular. **(Murata-Hori et al, 2002; Hirota et al, 2003; Marumoto et al, 2003; Eyers et al, 2003; Kunitoku et al, 2003; Ditchfield et al, 2003; Hauf et al, 2003; Goto et al, 2003; Dutertre et al, 2004; Fu et al, 2007)**. De fato, a inibição de AURKA ou AURKB induz uma redução da proliferação em diversos tumores **(Zhang et al, 2004; Zhang et al, 2011; Sun et al, 2015, Xing et al, 2015)**, incluindo tumores pulmonares **(Chin et al, 2014; Lu et al, 2014)**. Ademais, estudos mostram que a inibição de RALA, um componente da via de RalGDS requerido para a oncogenicidade mediada por *KRAS* **(Lim et al, 2005)** e ativado por AURKA **(Lim et al, 2010)** reduz a proliferação celular *in vitro* **(Male et al, 2012)**. Do mesmo modo, a inibição de NF-κB, outro componente necessário para a oncogenicidade mediada por *KRAS* **(Bassères et al, 2010)** e ativado por AURKA (**Briassouli et al, 2007)**, reduz a proliferação celular **(Al-Halabi et al, 2011; Chen et al, 2015)**. Além disso, a inibição da AURKA em tumores de ovário induz parada do ciclo celular e redução da proliferação de modo dependente da presença de NF-κB **(Chefetz et al, 2011)**. Isso sugere que AURKA requer, pelo menos

em parte, o envolvimento de vias de sinalização diversas na regulação da proliferação celular em tumores mediados por *KRAS* oncogênica.

Além disso, o efeito antiproliferativo de vários inibidores farmacológicos de AURKA e AURKB já foi demonstrado ser eficaz na redução da proliferação *in vitro* e *in vivo*. Compostos derivados de quinolonas, assim como AI II, capazes de inibir quinases por competição com ATP, mostram forte efeito antiproliferativo *in vitro* **(Carta et al, 2015)**. MLN8237, um inibidor seletivo para AURKA em baixas concentrações e que inibe simultaneamente AURKA e AURKB em concentrações elevadas **(Asteriti et al, 2010)**, em atual fase II de pesquisa clínica **(Infante et al, 2008)**, induz parada em G2/M em células de tecido mielóide **(Shu et al, 2015)**. Do mesmo modo, ZLJ213, um inibidor seletivo de AURKA e VEGFR suprime o crescimento de tumores de cólon e reduz a proliferação *in vitro* **(Zhou et al, 2015)**. Mais importante, MT477, um inibidor de AURKA, inibe a proliferação em várias linhagens celulares, incluindo células tumorais transformadas por *KRAS* **(Jasinski et al, 2011)**.

No caso da quinase Aurora B, o uso de inibidores seletivos, como barasertibe (AstraZeneca), atualmente em fase II de pesquisa clínica **(Boss et al, 2010; Lowenberg et al, 2011)**, reduz com grande eficácia a proliferação e repopulação celular de tumores altamente proliferativos **(Sak et al, 2012)**. Por fim, GSK1070916 (GlaxoSmithKline), um inibidor seletivo de AURKB e AURKC em atual fase I de pesquisa clínica **(Hardwicke et al, 2009)**, reduz a proliferação celular *in vitro* e *in vivo* em células de diversos tumores, incluindo células de tumores pulmonares, como A549 **(Hardwicke et al, 2009)**.

Para caracterizar mais a fundo os efeitos das quinases Aurora sobre a proliferação celular, nós avaliamos o efeito da inibição destas quinases sobre a ploidia e divisão celulares. Baseando-se em técnicas de imageamento ao vivo, nós investigamos os efeitos da inibição de AURKA e/ou AURKB sobre a regulação da entrada em mitose e demonstramos que a inibição de AURKA induz um atraso da entrada em mitose, além de prolongamento da própria mitose, que aumenta com o aumento da concentração de MLN **(Figs. 4.7, 4.8 e 4.9)**.

Consistentes com esses dados, vários estudos mostram que a inibição de AURKA é capaz de bloquear a transição G2/M **(Du et al, 2004; Cazales et al, 2005, dos Santos et al, 2016).** Isso, em parte, é explicado pelo fato de que, nos centrossomos, a AURKA fosforila CDC25B, induzindo o recrutamento de CCNB1 para o núcleo e ativação de CDK1, que são eventos importantes para a maturação do centrossomo durante a fase G2 do ciclo celular **(Lindqvist et al, 2009)** e, consequentemente, para a entrada em mitose **(Carvajal et al, 2006; Barr et al, 2007)**. De fato, estudos

mostram que a maturação do centrossomo e a ativação de CDK1 e CCNB1 são totalmente dependentes de AURKA e PLK1 **(Barr et al, 2007)**, enquanto outros mostram que proteínas centrossoméricas influenciam o tempo de quebra do envelope nuclear e, portanto, da entrada em mitose, de modo dependente de AURKA **(Hachet et al, 2007; Portier et al, 2007)**.

Esses resultados, embora estatisticamente significativos, são aparentemente pequenos, diante da importância de AURKA para a regulação de proteínas que coordenam a entrada em mitose. Todavia, isso pode ser explicado pelo fato de que muitas proteínas envolvidas na rede molecular que controla a entrada em mitose são redundantes para essa decisão **(Lindqvist et al, 2009)**. De fato, diversos estudos mostram que inibição genética ou farmacológica de CDC25B **(Lindqvist et al, 2005)**, PLK1 **(van Vugt et al, 2004)**, AURKA **(Marumoto et al, 2002)** ou CCNB1 **(Bellanger et al, 2007)** induz um efeito muito pequeno sobre a regulação da entrada em mitose e efeitos mais proeminentes são observados quando se faz a inibição simultânea de duas ou mais proteínas centrossoméricas **(Gong et al, 2007)**.

Interessantemente, a inibição dual de AURKA e AURKB por AI II, não só atrasa a entrada em mitose, mas também causa, em algumas células observadas, uma saída da mitose muito precoce (**Figs. 4.7, 4.8 e 4.9)**. O prolongamento da interfase e atraso da entrada em mitose observados neste caso são devidos provavelmente à inibição mais eficiente de AURKB por AI II, em comparação à inibição por MLN, uma vez que a inibição de AURKB resulta em atrasos da fosforilação mitose-específica da histona H3, fazendo com que células entrem em mitose tardiamente e com erros de condensação da cromatina **(Smith et al, 2001; Chang et al, 2007).** A saída precoce da mitose mediada por AI II, observada em algumas células, também pode explicada pela inibição de AURKB. De fato, estudos mostram que AURKB, diferentemente de AURKA, exerce muito mais seu papel como reguladora do *checkpoint* mitótico do que como mediador da progressão mitótica **(Keen et al, 2009)**. Desse modo, potentes inibidores de AURKB, como AI II induzem o alinhamento incorreto dos cromossomos na placa metafásica, ativando o *checkpoint* do fuso mitótico e, com isso, células ficam impossibilitadas de continuar a mitose e retornam à interfase rapidamente, diminuindo o tempo médio da mitose **(Gascoigne et al, 2009)**.

Por fim, nós observamos que células nas quais AURKB está inibida são muito mais sujeitas à erros de citocinese **(Figs. 4.12, 4.13 e 4.14)**. De fato, a inibição de AURKB leva à poliploidia causada por uma falha de citocinese **(Schumacher et al, 1998; Giet et al, 2001)**, em um mecanismo bastante complexo, que envolve diversas proteínas associadas à divisão celular normal, tais como a GTPase Rho

(Yokoyama et al, 2005), além de desmina, vimentina, ZEN-4/MKLP1, TACC1 e MgcRacGAP **(Severson et al, 2000; Kawajiri et al, 2003; Goto et al, 2003; Minoshima et al, 2003; Delaval et al, 2004; Guse et al, 2005)**.

Mais importante do que isso, nós observamos que a inibição de AURKA, seja por interferência de RNA, seja farmacológica, induz uma série de alterações mitóticas, como *blebbings* em telófase, associados ou não a erros de citocinese, defeitos de alinhamento do fuso mitótico e presença de mitoses multipolares **(Figs. 4.12, 4.13 e 4.14)**. Esses efeitos são, em parte, esperados, uma vez que AURKA é uma proteína essencial para o correto alinhamento e segregação das cromátides durante a mitose **(Berdnik et al, 2002; Kufer et al, 2002; Hirota et al, 2003; Marumoto et al, 2003; Eyers et al, 2003; Kunitoku et al, 2003; Dutertre et al, 2004; Fu et al, 2007)** e a perda dessa proteína resulta em severos erros de divisão celular. De fato, vários estudos mostram que a deleção ou inibição da atividade de AURKA induz a má formação do fuso mitótico **(Roghi et al, 1998; Giet et al, 1999; Hannak et al, 2001; Dutertre et al, 2002; Marumoto et al, 2003).**

Esses dados não somente corroboram nossos ensaios de proliferação celular, mas mostram que AURKA e AURKB são proteínas importantes para o crescimento e progressão tumoral. Tomados juntos, esses resultados apoiam nossa hipótese de que a inibição de AURKA e/ou AURKB poderia ser uma estratégia terapeuticamente relevante para tumores altamente proliferativos, tais como tumores pulmonares mediados por mutações em *KRAS*.

Posteriormente, nós investigamos se o mecanismo de perda de viabilidade e redução de crescimento celular mediado pela inibição de AURKA e AURKB poderia envolver também algum efeito sobre a morte celular. Nós observamos que a inibição de AURKA ou AURKB por interferência de RNA induz a clivagem de CASP3 **(Fig. 4.27)**, um dos eventos finais da cascata apoptótica **(Cohen, 1997)**.

Estes resultados estão de acordo com estudos que mostram que a inibição de AURKA por RNA de interferência induz morte celular por apoptose em tumores mamários **(Wan et al, 2010)** e estudos mostrando que AURKB inibe a apoptose através da ativação de NF-κB **(He et al, 2015)**. Além disso, estudos mostram que a quimioterapia associada à inibição de AURKB induz apoptose em tumores de estômago **(Chiou et al, 2014)**, bem como aumenta a sensibilidade à morte celular mediada por indometacina, via regulação de c-Myc **(Ma et al, 2015)**. Por fim, e mais importante, o silenciamento de AURKB por RNA de interferência mostrou-se eficiente na indução da apoptose em células pulmonares A549 **(Yu et al, 2015)**.

A inibição farmacológica de AURKA e AURKB também promove morte celular. De fato, a inibição da quinase Aurora A por VX-680 (*Merck Sharp & Dohme Corporation*), um inibidor em atual fase I de pesquisa clínica **(Traynor et al, 2011)**, aumenta a sensibilidade celular à apoptose induzida por paclitaxel em tumores de colo do útero **(Sum et al, 2015)**. Igualmente, ZLJ213, um inibidor seletivo de AURKA e VEGFR, suprime o crescimento e induz morte celular por apoptose em tumores de colo do útero **(Zhou et al, 2015)**. Por outro lado, MLN induz apoptose pela via mitocondrial e autofagia, num processo dependente das vias de sinalização PI3K/AKT/mTOR, p38 MAPK e AMPK **(Shu et al, 2015)**. Por fim, a inibição de RALA, um componente da via de sinalização de KRAS sabidamente regulado por AURKA **(Lim et al, 2005; Lim et al, 2010)**, induz apoptose *in vitro* **(Male et al; 2012)**.

No caso da AURKB, o uso de inibidores seletivos, como GSK1070916 ou AZD1152, é suficiente para induzir morte celular por apoptose **(Hardwicke et al, 2009; Sak et al, 2012)**. Além disso, a depleção de AURKB induz tetraploidia e células tetraploides são mais sensíveis à morte celular mediada pela inibição de AURKB **(Marxer et al, 2012)**, o que sugere um efeito de *feedback* positivo sobre a morte celular mediada pela inibição farmacológica de AURKB.

Ademais, em nossos ensaios de morte celular por imageamento ao vivo, nós observamos que a morte celular mediada pela inibição de AURKA foi eficiente em apenas uma pequena fração das células tratadas, sobretudo em células de terceira geração mitótica a partir do momento do tratamento com MLN ou AI II **(Fig. 4.25)**. Isso significa que a inibição de AURKA pode gerar mitoses anômalas, com defeitos que se propagam e amplificam ao longo das sucessivas gerações mitóticas, sem, contudo, causar morte celular. Particularmente, quando células A549 são tratadas com MLN, nós observamos a presença de múltiplas divisões celulares assimétricas, características do desbalanceamento cromossômico durante a mitose e responsáveis pela geração de células aneuploides. Por outro lado, quando células A549 são tratadas com AI II, o bloqueio simultâneo de AURKA e AURKB induz a perda quase total da capacidade de divisão celular. Essas células, entretanto, continuam a duplicar DNA e sofrem tentativas frustradas de citocinese, indeterminadamente, gerando, assim, hiperploidia. Em ambos os casos, apenas uma pequena fração de células acumula defeitos mitóticos suficientes para levar à morte mitótica **(Fig. 4.25)**.

A aneuploidia e poliploidia foram recentemente descritas por **Rutledge et al (2016)** e **Nitta et al (2002)**, respectivamente, como importantes causadores de instabilidade genética e câncer. Além disso, a aneuploidia tem sido considerada indicativo de mau prognóstico e responsável pela progressão tumoral e baixa sobrevida de pacientes portadores de diversos tumores **(Cappello et al, 2014; Mandrioli**

et al, 2016; Xu et al, 2016), incluindo tumores pulmonares **(Kops et al, 2005; Gao et al, 2007; Jung et al, 2007)**.

Diversos estudos mostram que a inibição de AURKA por MLN é capaz de induzir aneuploidia em alguns tumores, mas não em outros. Isso parece estar relacionado à função de p53, em um mecanismo que envolve o *checkpoint* pós-mitótico dependente de p53 como um mecanismo de prevenção da aneuploidia quando o *checkpoint* do fuso falha **(Huang et al, 2009; Li et al, 2010; Tsuchiya et al, 2011).** De fato, modelos celulares nos quais a função de p53 está intacta são mais resistentes à aneuploidia induzida pela inibição de AURKA **(Zhou et al, 2013)**.

Por outro lado, estudos mostram que alterações da expressão e/ou atividade de AURKB produzem células multinucleadas e interferem com a ploidia celular **(Tatsuka et al, 1998; Ota et al, 2002)**, contribuindo, inclusive, para o agravamento da aneuploidia em linhagens celulares derivadas de NSCLC, o que é um importante evento durante o desenvolvimento de tumores. Ademais, estes mesmos estudos mostram que a inibição de AURKB é muito mais eficiente na indução de aneuploidia, em relação à inibição de AURKA, mesmo em células não mutantes para p53 **(Takeshita et al, 2013)**.

Isso explica, pelo menos em parte, o fato de geralmente não observarmos a indução de aneuploidia em nossos modelos celulares quando fazemos a inibição de AURKA com MLN 20 nM. Por outro lado, a inibição combinada de AURKA e AURKB, seja pelo tratamento com MLN 50 nM, seja por AI II 5 µM, é muito mais eficiente na indução de aneuplodia em células A549, que não apresentam mutações em p53 **(Figs. 4.12, 4.13, 4.15 e 4.16)**.

Nesse sentido, a inibição de AURKA e/ou AURKB pode ser uma estratégia eficaz na redução da oncogenicidade mediada por mutações em *KRAS*, mas pode também originar diversos outros problemas associados à instabilidade genética e/ou indução de aneuploidia, que são eventos fortemente pró-tumorigênicos.

Essa dicotomia, porém, não descarta essas proteínas como potenciais alvos terapêuticos no câncer de pulmão mediado por *KRAS*, principalmente se usadas em combinação com agentes citotóxicos que causem morte celular. De fato, a inibição destas quinases sensibiliza células tumorais à morte celular **(Marxer et al, 2012)**. De qualquer forma, estudos adicionais são necessários para que essas quinases possam ser elencadas como alvos seguros e eficazes no tratamento de pacientes portadores de mutações em *KRAS*.

Por fim, para que a inibição de AURKA e/ou AURKB possa ser uma abordagem relevante na terapia contra o câncer de pulmão, é importante que os efeitos biológicos observados em decorrência

da inibição farmacológica dessas quinases sejam específicos para (ou mais proeminentes em) células portadoras de mutações em *KRAS*. Nós já havíamos demonstrado que a inibição de AURKA e/ou AURKB por AI II induz menor crescimento, viabilidade e capacidade de crescimento independentemente de ancoragem somente na presença de $KRAS^{G12V}$ **(dos Santos, 2013)**. Aqui nós vimos que a inibição dual de AURKA e AURKB por AI II induz um elevado percentual de células duplamente positivas para iodeto de propídio e Anexina V **(Fig. 4.29)**, além de induzir um aumento de CASP3 clivada **(Fig. 4.30)**, somente na presença de $KRAS^{G12V}$, sugerindo, pela primeira vez, que células portadoras de mutações em *KRAS* são mais sensíveis à morte celular induzida pela inibição de AURKA e/ou AURKB.

Embora a seletividade de inibição de AURKA e AURKB tenha sido estudada somente em células possuindo a mutação $KRAS^{G12V}$, é bem compreendido que o *status* mutacional de *KRAS* pode influenciar a resposta às terapias alvo-dirigidas. De fato, estudos mostram que, em tumores pancreáticos, a inibição de MEK, um componente da via de sinalização RAS/RAF/MEK/ERK, afeta preferencialmente células portadoras de mutações $KRAS^{G12D}$, ao passo que linhagens celulares possuindo $KRAS^{G12V}$ ou submetidas a ensaios de ganho de função de KRAS são cerca de dez vezes mais resistentes à inibição de MEK **(Hamidi et al, 2014)**. Similarmente, outros estudos mostram que células pulmonares H358 ($KRAS^{G12C}$) são sensíveis à inibição de MEK, ao passo que células A549 ($KRAS^{G12S}$) são resistentes a esta inibição. Entretanto, a inibição combinada de MEK e EGRF é capaz de sensibilizar células A549 ($KRAS^{G12S}$), mas não células pulmonares H23 ($KRAS^{G12C}$) **(Yoon et al, 2010)**. Além disso, estudos sugerem que a resposta celular ao decitabine é dependente do perfil mutacional de KRAS em tumores do ovário **(Stewart et ao, 2015)**. Por fim, estudos mostram que a proliferação e morte de células gástricas tumorais possuindo $KRAS^{WT}$ ou $KRAS^{G12A}$ são igualmente afetadas pelo cetuximabe *in vitro*, mas diferem significativamente em estudos *in vivo* **(Shi et al, 2014)**, sugerindo que terapias alvo-dirigidas são fortemente dependentes do perfil mutacional de *KRAS* e de contextos celulares distintos, sendo uma abordagem extremamente importante no estudo de novas terapias contra o câncer.

Desse modo, embora nossos resultados mostrem a seletividade dos efeitos da inibição de AURKA e/ou AURKB em células pulmonares H1703 portadoras da mutação $KRAS^{G12V}$, será preciso avaliar se esta seletividade também se confirma em face de outras mutações oncogênicas em *KRAS*. De qualquer forma, a mutação oncogênica $KRAS^{G12V}$ é a segunda mutação oncogênica em *KRAS* mais frequente em câncer de pulmão, sendo superada apenas pela mutação $KRAS^{G12C}$ **(Cox et al, 2014; Varsan et al, 2014)**.

De acordo com nosso *Objetivo Específico 2* nós, posteriormente, decidimos investigar os efeitos da inibição de AURKA e/ou AURKB sobre a migração e invasão de células portadoras de mutações em KRAS. Apesar de a maioria das terapias anti-tumorais terem como alvo a inibição do crescimento tumoral, a metástase é o principal fator que contribui para a alta letalidade do câncer **(Davies, 2012; Razidlo et al, 2015)**. De fato, metástases são responsáveis por cerca de 90% de todas as mortes relacionadas ao câncer em humanos **(Weigelt et al, 2005)**. Uma vez que tumores possuindo mutações em *KRAS* são altamente invasivos e metastáticos **(Yu et al, 2011; Deng et al, 2015; Castellano et al, 2016; Liu et al, 2016; Pietro et al, 2016; Ribeiro et al, 2016)**, espera-se que estratégias terapêuticas alvo-dirigidas para tumores mediados por KRAS sejam capazes de reduzir a malignidade tumoral, por meio da redução da migração e invasão celulares.

Nós demonstramos que a inibição farmacológica ou por interferência de RNA de AURKA ou AURKB é capaz de reduzir a migração celular, tanto em ensaios de *wound-healing* quanto em ensaios de imageamento ao vivo **(Figs. 4.31, 4.32, 4.36 e 4.37)**. De fato, as quinases AURKA e AURKB têm sido reportadas na regulação da migração celular em vários tumores **(Mahankali et al, 2015; Porcelli et al, 2015; Wu et al, 2016; Maimaiti et al, 2016)**, incluindo tumores pulmonares **(Zhou et al, 2014; Xu et al, 2014)**. Estudos mostram que o silenciamento de AURKA reduz a migração celular **(Xing et al, 2015),** através da fosforilação de FAK **(Zang et al, 2011; Zhang et al, 2012)**, que é requerida para manutenção da malignidade de tumores pulmonares transformados por *KRAS* **(Konstantinidou et al, 2013)**. Além disso, a ativação de RALA por AURKA é essencial para a migração celular em tumores renais **(Wu et al, 2005)**. Por outro lado, a inibição de AURKB também reduz a migração celular, por meio da regulação da via de sinalização de PI3K/Akt/NF-κB **(Zhu et al, 2014)**.

A inibição farmacológica de AURKA ou AURKB também é capaz de reduzir a migração celular em vários tumores. De fato, a inibição de AURKA por VX-680 induz menor migração por regulação da via de AKT e FAK em células de carcinoma de cabeça e pescoço **(Wu et al, 2016).** Além disso, dados de microarranjo mostram que tumores com elevado potencial de migração possuem superexpressão de AURKA e que sua inibição é suficiente para reduzir a migração celular *in vitro* **(Maimaiti et al, 2016)**. Por fim, barasertibe, um inibidor específico de AURKB, reduz grandemente a invasão e migração de tumores altamente metastáticos e com baixa resposta à quimioterapia **(Porcelli et al, 2015)**.

Embora não tenhamos avaliado diretamente a capacidade de invasão celular, utilizamos técnicas de zimografia para avaliar a atividade enzimática das metaloproteinases de matriz 2 (MMP2) e 9

(MMP9), bem como sua expressão proteica por *western blot*. Embora a investigação de outras MMPs seja também importante para o estudo de terapias alvo-dirigidas contra o câncer, uma vez que já foram implicadas na manutenção da oncogenicidade mediada por *KRAS*, tanto em tumores pancreáticos **(Krantz et al, 2011)**, quanto em tumores pulmonares **(Regala et al, 2011; Schütz et al, 2015)**, nós nos concentramos em avaliar MMP2 e MMP9 na oncogenicidade mediada por *KRAS* pelos motivos descritos a seguir. Primeiro, MMP2 e MMP9 já foram implicadas na malignidade de diversos tumores pulmonares, incluindo tumores mediados por *KRAS* oncogênica **(Thorgeirsson et al, 1985; Ballin et al, 1988; Bernhard et al, 1994; Deryugina et al, 2006)**. Segundo, a expressão ou atividade de MMP2 e MMP9 é aumentada por vários mediadores da oncogenicidade de *KRAS*, como RALA **(Aguirre-Ghiso et al, 1999)** e os fatores de transcrição NF-κB **(Hu et al, 2003; Bera et al, 2013)**, AP1 **(Noh et al, 2015)** e Ets1 **(Puzovic et al, 2014)**. Terceiro, a transformação maligna induzida por arsênico aumenta a secreção de MMP9, mas o silenciamento genético de *KRAS* é capaz de reverter esse fenótipo, reduzindo a secreção de MMP9 **(Ngalame et al, 2014)**. Quarto, células que perderam a capacidade de secreção de MMP2 e MMP9 em resposta à alta densidade celular tem essa função celular restaurada pela expressão de *RAS* oncogênica **(Esparza et al, 1999)**. E, finalmente, embora tenham seus estudos clínicos descontinuados em fase III em função de sua toxicidade, inibidores de metaloproteinases, como marimastate e prinomastate, são suficientes para reduzir a metástase de tumores pulmonares mediados por *KRAS*, incluindo NSCLC **(Cathcart et al, 2015)**.

De acordo com a nossa premissa, a inibição de AURKA ou AURKB por interferência de RNA diminui a secreção de pró-MMP2 e pró-MMP9 em células A549 e H358 **(Fig. 4.38)**. E o tratamento com o inibidor dual das quinases Aurora AI II também diminui, nas linhagens A549 e H358 positivas para mutações em *KRAS*, a atividade gelatinolítica de MMP2 e MMP9 de maneira dose-dependente (**Fig. 4.33)**. Esses dados são consistentes com o fato de que AURKA e AURKB promovem invasão e regulam metaloproteinases de matriz. A superexpressão de AURKA induzida por PEG3 leva à maior progressão tumoral por regulação positiva de MMP2 e MMP9 **(Emdad et al, 2005)**. Por outro lado, o *knockdown* de AURKA reduz a expressão de MMP2 *in vitro* **(Zhang et al, 2011; Zhang et al, 2012)**, o número de metástases *in vivo* **(Maimaiti et al, 2016)**, além de reduzir a invasão celular e a expressão de MMP9, por meio da inibição de NF-κB e AP-1, que são os principais fatores de transcrição de MMP9 em tumores mamários **(Noh et al, 2015)**. Ademais, a inibição de vias de sinalização *downstream* de AURKA, como RALA, reduz a invasão em células de tumores pulmonares mediados por *KRAS* **(Male et al, 2012)**. Por fim, DX-2400, um inibidor de MMP-14, enzima que catalisa a conversão de pró-MMP2 a MMP2 e pró-

MMP9 a MMP9 **(Lemaître et al, 2006)**, reduz o número de metástases observadas em tumores de fígado e pulmão **(Devy et al, 2009)**. Já no caso de AURKB, estudos sugerem que o silenciamento de AURKB por RNA de interferência reduz a expressão de MMP2 e MMP9 **(He et al, 2015)** e outros sugerem que AURKB regula a invasão celular em osteosarcoma por modulação da via PI3K/Akt/NF-κB **(Zhu et al, 2014)**.

Esses estudos não somente corroboram nossos resultados, mas mostram que a inibição de metaloproteinases de matriz é uma alternativa relevante para a terapia de tumores altamente invasivos, como tumores pulmonares mediados por *KRAS*. Embora o uso de inibidores diretos de metaloproteinases, como marimastate e prinomastate, tenham falhado em estudos clínicos de fase III devido a sua considerável toxicidade e baixa segurança **(Coussens et al, 2002; Cathcart et al, 2015)**, o uso de inibidores indiretos de MMPs, como os inibidores de quinases Auroras, poderiam constituir uma estratégia eficaz e mais segura para pacientes com tumores altamente malignos e metastáticos, melhorando, assim, a sobrevida e a morbidade dos pacientes portadores de tumores com mutações em *KRAS*.

Por fim, embora não tivéssemos proposto em nosso plano de trabalho inicial, nós adicionamos ao nosso *Objetivo Específico 2* o estudo das quinases Aurora sobre a adesão celular em A549 e H358. Isto é importante porque, juntamente com nossos ensaios de migração e invasão, este estudo fornece evidências sobre o potencial metastático de células tumorais na presença ou ausência da inibição das quinases Aurora.

Células transformadas por KRAS possuem uma alta expressão de proteínas de adesão celular, que são importantes para sua atividade oncogênica, incluindo integrinas **(Ermolayev et al, 2015; Symonds et al, 2016)**, caderinas **(Deramaudt et al, 2006; Mortazavi et al, 2015)**, cateninas **(Lemieux et al, 2015)** e lamininas **(Ichinokawa et al, 2013)**. Uma vez que inibição da expressão dessas moléculas reduz a oncogenicidade mediada por *KRAS* **(Macias-Perez et al, 2008; Lin et al, 2014)**, espera-se que abordagens terapêuticas dirigidas contra tumores mediados por *KRAS* sejam capazes de modularem a adesão, reduzindo a malignidade celular.

Em nossos ensaios de adesão celular, nós demonstramos que a inibição farmacológica ou por interferência de RNA de AURKA e/ou AURKB é capaz de reduzir a adesão de células A549 e H358 ao colágeno I **(Fig. 4.35 e 4.39)**. De fato, diversos estudos já demonstraram a regulação da adesão celular por AURKA **(Zhang et al, 2011; Do et al, 2014)** e AURKB **(Ferreira et al, 2013)**. Todos esses dados são consistentes com o fato de que a superexpressão de AURKA induz a expressão de diversas

proteínas de adesão celular, como β-catenina **(Jin et al, 2015; Liu et al, 2016)** e E-caderina **(Niu et al, 2015)**. Além disso, AURKA leva à ativação de NF-κB, que é fator de transcrição de integrina β-1 **(Wang et al, 2016)** e α-2 **(Yamada et al, 2016)**.

Desse modo, nós concluímos que a AURKA e AURKB são importantes mediadores da migração, invasão e adesão em A549 e H358 e que a inibição direta dessas quinases poderia ser uma estratégia terapeuticamente relevante em tumores altamente metastáticos como tumores mediados por KRAS oncogênica.

De acordo com nosso *Objetivo Específico 3*, para validar o efeito antiproliferativo de AURKA *in vivo*, nós utilizamos nosso modelo de inibição de AURKA por interferência de RNA em células A549 para realizar ensaios de formação de tumores xenográficos em camundongos imunossuprimidos Balb/c *nude*. Nossos resultados demonstraram que a inibição de AURKA reduz tanto o peso, quando o volume de tumores *in vivo* **(Fig. 4.40)**. De fato, a inibição de AURKA reduz a formação de tumores *in vivo* em diversas linhagens celulares **(Zhang et al, 2011; Zhang et al, 2012)**, incluindo linhagens celulares transformadas por *KRAS* **(Jasinski et al, 2011)**. Do mesmo modo, a inibição de RALA, um componente da via de sinalização de KRAS sabidamente regulado por AURKA **(Lim et al, 2005; Lim et al, 2010)**, reduz a formação de tumores *in vivo* gerados a partir de células pulmonares transformados por *KRAS* **(Male et al, 2012)**. Por fim, recentes estudos mostram que a superexpressão de AURKA é indicativo de mau prognóstico e que a inibição de AURKA por MLN induz redução do crescimento tumoral, aumentando a sobrevida de camundongos **(Furlan et al, 2015)**.

Embora este seja um ponto importante no estudo das quinases Aurora em câncer, nós não realizamos, até o presente momento, estudos envolvendo a inibição de AURKB *in vivo*. Entretanto, estudos recentes mostram que a inibição farmacológica de AURKB por AZD1152 (AstraZeneca) ou GSK1070916 (GlaxoSmithKline), reduz a formação de tumores xenográficos gerados a partir de diversas linhagens celulares, incluindo células A549, derivadas de tumores pulmonares transformados por *KRAS* **(Wilkinson et al, 2007; Hardwicke et al, 2009)**. Além disso, o uso de inibidores capazes de inibir AURKA e AURKB simultaneamente reduzem a formação de tumores *in vivo* gerados a partir de células de NSCLC, aumentando, também, a sensibilidade desses tumores ao gefitinibe **(Sheng et al, 2014)**. Por fim, um recente estudo mostra que a inibição de AURKB por RNA de interferência reduz a formação de tumores xenográficos gerados a partir de células pulmonares A549 **(Yu et al, 2015)**, corroborando nossa hipótese de que as quinases Aurora são importantes mediadores da oncogenicidade medida por *KRAS*.

Apesar de nós termos demonstrado que AURKA é importante para a proliferação celular *in vitro* e formação de tumores *in vivo*, nós não detectamos a presença de CASP3 clivada nos tumores *in vivo* dissecados, seja por *western blot*, seja por imunoistoquímica **(Fig. 4.40)**. Essa discrepância de resultados entre nossos dados *in vitro* e *in vivo* pode refletir o fato de que a análise *in vitro* não necessariamente reflete a resposta *in vivo* a determinado tratamento. Fatores de sobrevida extrínsecos ao tumor, influenciados pelo microambiente tumoral *in vivo*, podem afetar a habilidade de células tumorais em resistir à morte celular. É atualmente bem entendido que vários estágios da morte celular por apoptose são sensíveis à depleção de reservas energéticas celulares resultantes de condições como hipóxia e baixa concentração de glicose, comumente encontradas *in vivo* **(Hunter et al, 2006)**. Além disso, a hipóxia intratumoral seleciona células que perderam seu potencial de entrar em apoptose **(Graeber et al, 1996)**. Portanto, uma resposta inicial à apoptose que possa ocorrer no início da formação dos tumores pode ser perdida ao longo de vários dias de tratamento, o que justificaria a ausência de CASP3 clivada nos tumores analisados.

Embora não proposto no projeto inicial, nós decidimos também perseguir um objetivo adicional que foi avaliar o papel de TPX2 e do complexo AURKA/TPX2 na oncogenicidade mediada por *KRAS*. Uma vez que a inibição direta de AURKA pode acarretar defeitos mitóticos potencialmente indesejáveis, uma estratégia alternativa seria a inibição indireta de AURKA por meio da inibição de proteínas essenciais à sua atividade oncogênica.

TPX2 é uma proteína de 100 kDa que se associa à AURKA já no início da mitose e é essencial para sua autofosforilação e ativação **(Zorba et al, 2014; Janeček et al, 2016)**. Além disso, TPX2 é requerida para o desenvolvimento de tumores de cólon e mama mediados por *KRAS* **(Morgan-Lappe et al, 2007)**. Entretanto, nenhum estudo até hoje havia demonstrado se, de fato, TPX2, era uma proteína regulada por KRAS. Ademais, não se sabia se a inibição de TPX2 poderia ser uma estratégia terapêutica relevante para pacientes portadores de câncer de pulmão com mutação em *KRAS*.

Nesse sentido, nós inicialmente investigamos se TPX2 era regulada por KRAS. Nós vimos que a indução da expressão de $KRAS^{G12V}$ induz tanto maior expressão de AURKA, conforme já descrito anteriormente **(dos Santos, 2013)**, quanto a maior expressão de TPX2 **(Figs. 4.41, 4.43 e 4.46)**. Embora nenhum estudo anterior mostrasse que KRAS oncogênica regula positivamente TPX2, esses dados são condizentes com o fato de que KRAS regula positivamente AURKA **(Patel et al, 2012; Pitts et al, 2016, dos Santos et al, 2016)** e que TPX2 é requerida para a atividade oncogênica de AURKA **(Morgan-Lappe et al, 2007; Lee et al, 2016; Janeček et al, 2016)**.

Por meio da dupla marcação de AURKA e TPX2 em ensaios de imunofluorescência para células que expressam *KRAS* oncogênica, nós observamos, ainda, que o aumento de expressão de AURKA e TPX2 ocorria simultaneamente nas mesmas células, nos modelos testados **(Fig. 4.47)**. Esses dados corroboram estudos anteriores mostrando que AURKA e TPX2 funcionam como uma holoenzima, ou uma unidade oncogênica, sendo mutuamente dependentes no desenvolvimento de tumores **(Asteriti et al, 2010; Giubettini et al, 2011)**.

Para saber se a inibição de TPX2 poderia ser uma alternativa terapêutica para pacientes portadores câncer de pulmão com mutação em *KRAS*, nós realizamos ensaios biológicos para testar o papel de TPX2 na oncogenicidade mediada por KRAS. Por meio de ensaios de viabilidade baseados na formação de colônias em substrato sólido, nós demonstramos que a inibição de TPX2 inibe completamente a viabilidade de células A549, portadoras de mutação em *KRAS.* Mais importante, a perda da viabilidade mediada pela inibição de TPX2 ocorre um pouco mais expressivamente em células H1703 manipuladas para expressar *KRAS* oncogênica, em comparação ao seu respectivo controle **(Figs. 4.50 e 4.51)**.

Para saber se os efeitos da inibição de TPX2 sobre a viabilidade eram oriundos de uma maior proliferação ou menor resistência à morte celular, nós realizamos ensaios de ciclo celular baseados na marcação do DNA com PI. Novamente, nossos resultados demonstraram que a inibição de TPX2 em células A549 promoveu uma redução da proliferação, por bloqueio do ciclo celular em G2/M, bem como indução de morte celular. Por outro lado, nossos resultados também mostraram que a inibição de TPX2 induz maior número de células hiperploides **(Fig. 4.52)**. Resultados similares foram observados em células H1703 G12V, com eficiência ligeiramente aumentada na presença de *KRAS* oncogênica **(Fig. 4.53)**.

Esses dados são condizentes com a importante função de TPX2 na regulação do ciclo celular, integridade do fuso mitótico e estabilidade genômica **(Aguirre-Portolés et al, 2012; Wadsworth, 2015)**. Essas funções são compartilhadas por AURKA e, uma vez que TPX2 é requerido para a função mitótica de AURKA **(Giubettini et al, 2011; Morgan-Lappe et al, 2007; Lee et al, 2016; Janeček et al, 2016)**, não é inesperado que perturbações da expressão e/ou atividade de TPX2 produzam efeitos semelhantes à inibição de AURKA. De fato, vários estudos têm mostrado que TPX2 é requerido para o desenvolvimento de diversos tumores **(Yan et al, 2013; Liu et al, 2014)**, incluindo tumores pulmonares **(Lin et al, 2006)** e tumores não-pulmonares mediados por *KRAS* **(Morgan-Lappe et al, 2007)**. Portanto, da mesma forma que discutido para AURKA, é possível que uma estratégia terapêutica segura e eficaz

baseada na inibição de TPX2 vá requerer a combinação com agentes citotóxicos que provam morte celular.

Embora pouco ainda se saiba sobre os efeitos da inibição desta proteína nas vias de sinalização reguladas por KRAS, seja por modelos de inibição direta de TPX2 (como abordado neste trabalho), seja pela inibição da holoenzima oncogênica AURKA/TPX2, nossos resultados corroboram a hipótese de que TPX2 é um importante efetor da atividade oncogênica de *KRAS* através da regulação de AURKA e sugerem esta proteína como outro potencial alvo terapêutico em tumores pulmonares mediados por KRAS.

6. CONCLUSÃO

Sumarizando todos os resultados apresentados neste trabalho, observamos que:

a) a inibição das quinases AURKA e AURKB em células portadoras de mutação em *KRAS* promove uma redução da proliferação celular, sendo que a inibição de AURKA induz parada em mitose, aumentando o tempo de ciclo celular, além de induzir hiperploidiazação celular e diversas outras anomalias mitóticas, e a inibição de AURKA e AURKB induz prolongamento do ciclo celular e instabilidade genética seguida por hiperploidia e multinucleação;

b) a inibição das quinases AURKA e AURKB em células pulmonares portadoras de mutação em *KRAS* promove morte celular *in vitro*;

c) a inibição da viabilidade e indução de morte celular causadas pela inibição farmacológica de AURKA e AURKB ocorre preferencialmente na presença de KRAS oncogênica;

d) a inibição das quinases AURKA e AURKB em células pulmonares portadoras de mutação em *KRAS* promove uma redução da migração, adesão e atividade proteolítica de metaloproteinases de matriz associadas à invasão celular;

e) a inibição de AURKA por interferência de RNA em células portadoras de mutação em *KRAS* reduz a formação de tumores *in vivo*;

f) KRAS regula positivamente TPX2 em células pulmonares portadoras de mutação em *KRAS,* e pacientes portadores de NSCLC apresentam expressão significativamente aumentada de TPX2;

g) a inibição de TPX2 por interferência de RNA induz menor viabilidade e maior morte celular, sobretudo em modelos geneticamente modificados para a expressão de KRAS oncogênica.

7. BIBLIOGRAFIA

Adjei AA, Dy GK, Erlichman C, Reid JM, Sloan JA, Pitot HC, Alberts SR, Goldberg RM, Hanson LJ, Atherton PJ, Watanabe T, Geary RS, Holmlund J, Dorr FA. A phase I trial of ISIS 2503, an antisense inhibitor of H-ras, in combination with gemcitabine in patients with advanced cancer. Clin Cancer Res. 2003 Jan;9(1):115-23.

Adjei AA. Farnesyltransferase inhibitors. Cancer Chemother Biol Response Modif. 2003;21:127-44.

Adjei AA. K-ras as a target for lung cancer therapy. J Thorac Oncol. 2008 Jun;3(6 Suppl 2):S160-3.

Agrawal N, Jiao Y, Bettegowda C, Hutfless SM, Wang Y, David S, Cheng Y, Twaddell WS, Latt NL, Shin EJ, Wang LD, Wang L, Yang W, Velculescu VE, Vogelstein B, Papadopoulos N, Kinzler KW, Meltzer SJ. Comparative genomic analysis of esophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. Cancer Discov. 2012 Oct;2(10):899-905.

Aguirre-Ghiso JA, Frankel P, Farias EF, Lu Z, Jiang H, Olsen A, Feig LA, de Kier Joffe EB, Foster DA. RalA requirement for v-Src- and v-Ras-induced tumorigenicity and overproduction of urokinase-type plasminogen activator: involvement of metalloproteases. Oncogene. 1999 Aug 19;18(33):4718-25.

Aguirre-Portolés C, Bird AW, Hyman A, Cañamero M, Pérez de Castro I, Malumbres M. Tpx2 controls spindle integrity, genome stability, and tumor development. Cancer Res. 2012 Mar 15;72(6):1518-28.

Ahmed Z, Timsah Z, Suen KM, Cook NP, Lee GR 4th, Lin CC, Gagea M, Marti AA, Ladbury JE. Grb2 monomer-dimer equilibrium determines normal versus oncogenic function. Nat Commun. 2015 Jun 24;6:7354.

Alamo P, Gallardo A, Di Nicolantonio F, Pavón MA, Casanova I, Trias M, Mangues MA, Lopez-Pousa A, Villaverde A, Vázquez E, Bardelli A, Céspedes MV, Mangues R. Higher metastatic efficiency of KRas G12V than KRas G13D in a colorectal cancer model. FASEB J. 2015 Feb;29(2):464-76.

Al-Ghamdi S, Albasri A, Cachat J, Ibrahem S, Muhammad BA, Jackson D, Nateri AS, Kindle KB, Ilyas M. Cten is targeted by Kras signalling to regulate cell motility in the colon and pancreas. PLoS One. 2011;6(6):e20919.

Al-Halabi R, Bou CM, Abou MR, El-Hajj H, Zahr H, Schneider-Stock R, Bazarbachi A, Gali-Muhtasib H. Gallotannin inhibits NFkB signaling and growth of human colon cancer xenografts. Cancer Biol Ther. 2011 Jul 1;12(1):59-68.

Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. Cell. 1988 May 20;53(4):549-54.

Alvarado Y, Giles FJ. Ras as a therapeutic target in hematologic malignancies. Expert Opin Emerg Drugs. 2007 May;12(2):271-84.

American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2012. Disponível em: http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveilance/documents/do cument/acspc-031941.pdf.

American Cancer Society. Detailed Guide: Lung Cancer (Non-Small Cell). Disponível em: http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003115-pdf.pdf.

American Cancer Society. Global cancer facts and figures, 3rd edition, 2015.

Anand S, Penrhyn-Lowe S, Venkitaraman AR. AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. Cancer Cell. 2003 Jan;3(1):51-62.

Andersson P, Goldfarb MP, Weinberg RA. A defined subgenomic fragment of in vitro synthesized Moloney sarcoma virus DNA can induce cell transformation upon transfection. Cell. 1979 Jan;16(1):63-75.

Andrews PD, Ovechkina Y, Morrice N, Wagenbach M, Duncan K, Wordeman L, Swedlow JR. Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere. Dev Cell. 2004 Feb;6(2):253-68.

Appels NM, Beijnen JH, Schellens JH. Development of farnesyl transferase inhibitors: a review. Oncologist. 2005 Sep;10(8):565-78.

Araki K, Nozaki K, Ueba T, Tatsuka M, Hashimoto N. High expression of Aurora-B/Aurora and Ipll-like midbody-associated protein (AIM-1) in astrocytomas. J Neurooncol. 2004 Mar-Apr;67(1-2):53-64.

Arkenau HT, Plummer R, Molife LR, Olmos D, Yap TA, Squires M, Lewis S, Lock V, Yule M, Lyons J, Calvert H, Judson I. A phase I dose escalation study of AT9283, a small molecule inhibitor of aurora kinases, in patients with advanced solid malignancies. Ann Oncol. 2012 May;23(5):1307-13.

Arvanitakis M, Van Laethem JL, Parma J, De Maertelaer V, Delhaye M, Devière J. Predictive factors for pancreatic cancer in patients with chronic pancreatitis in association with K-ras gene mutation. Endoscopy. 2004 Jun;36(6):535-42.

Asteriti IA, Rensen WM, Lindon C, Lavia P, Guarguaglini G. The Aurora-A/TPX2 complex: a novel oncogenic holoenzyme? Biochim Biophys Acta. 2010 Dec;1806(2):230-9.

Atkinson V. Medical management of malignant melanoma. Aust Prescr. 2015 Jun;38(3):74-8.

Aviel-Ronen S, Blackhall FH, Shepherd FA, Tsao MS. K-ras mutations in non-small-cell lung carcinoma: a review. Clin Lung Cancer. 2006 Jul;8(1):30-8.

Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D, Zhang XF. Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. Recent Prog Horm Res. 2001;56:127-55.

Bachireddy P, Bendapudi PK, Felsher DW. Getting at MYC through RAS. Clin Cancer Res. 2005 Jun 15;11(12):4278-81.

Baines AT, Xu D, Der CJ. Inhibition of Ras for cancer treatment: the search continues. Future Med Chem. 2011 Oct;3(14):1787-808.

Baldini E, Arlot-Bonnemains Y, Sorrenti S, Mian C, Pelizzo MR, De Antoni E, Palermo S, Morrone S, Barollo S, Nesca A, Moretti CG, D'Armiento M, Ulisse S. Aurora kinases are expressed in medullary thyroid carcinoma (MTC) and their inhibition suppresses in vitro growth and tumorigenicity of the MTC derived cell line TT. BMC Cancer. 2011 Sep 26;11:411.

Ballester R, Marchuk D, Boguski M, Saulino A, Letcher R, Wigler M, Collins F. The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. Cell. 1990 Nov 16;63(4):851-9.

Ballin M, Gomez DE, Sinha CC, Thorgeirsson UP. Ras oncogene mediated induction of a 92 kDa metalloproteinase; strong correlation with the malignant phenotype. Biochem Biophys Res Commun. 1988 Aug 15;154(3):832-8.

Banerji S, Cibulskis K, Rangel-Escareno C, Brown KK, Carter SL, Frederick AM, Lawrence MS, Sivachenko AY, Sougnez C, Zou L, Cortes ML, Fernandez-Lopez JC, Peng S, Ardlie KG, Auclair D, Bautista-Piña V, Duke F, Francis J, Jung J, Maffuz-Aziz A, Onofrio RC, Parkin M, Pho NH, Quintanar-Jurado V, Ramos AH, Rebollar-Vega R, Rodriguez-Cuevas S, Romero-Cordoba SL, Schumacher SE, Stransky N, Thompson KM, Uribe-Figueroa L, Baselga J, Beroukhim R, Polyak K, Sgroi DC, Richardson AL, Jimenez-Sanchez G, Lander ES, Gabriel SB, Garraway LA, Golub TR, Melendez-Zajgla J, Toker A, Getz G, Hidalgo-Miranda A, Meyerson M. Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. Nature. 2012 Jun 20;486(7403):405-9.

Barbacid M. ras genes. Annu Rev Biochem. 1987;56:779-827.

Barbie DA, Tamayo P, Boehm JS, et al. Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. Nature. 2009;462(7269):108-112.

Barbie DA, Tamayo P, Boehm JS, Kim SY, Moody SE, Dunn IF, Schinzel AC, Sandy P, Meylan E, Scholl C, Fröhling S, Chan EM, Sos ML, Michel K, Mermel C, Silver SJ, Weir BA, Reiling JH, Sheng Q, Gupta PB, Wadlow RC, Le H, Hoersch S, Wittner BS, Ramaswamy S, Livingston DM, Sabatini DM, Meyerson M, Thomas RK, Lander ES, Mesirov JP, Root DE, Gilliland DG, Jacks T, Hahn WC. Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. Nature. 2009 Nov 5;462(7269):108-12.

Barnard RA, Wittenburg LA, Amaravadi RK, Gustafson DL, Thorburn A, Thamm DH. Phase I clinical trial and pharmacodynamic evaluation of combination hydroxychloroquine and doxorubicin treatment in pet dogs treated for spontaneously occurring lymphoma. Autophagy. 2014 Aug;10(8):1415-25.

Barr AR, Gergely F. Aurora-A: the maker and breaker of spindle poles. J Cell Sci. 2007 Sep 1;120(Pt 17):2987-96.

Barros TP, Kinoshita K, Hyman AA, Raff JW. Aurora A activates D-TACC-Msps complexes exclusively at centrosomes to stabilize centrosomal microtubules. J Cell Biol. 2005 Sep 26;170(7):1039-46.

Bass AJ, Lawrence MS, Brace LE, Ramos AH, Drier Y, Cibulskis K, Sougnez C, Voet D, Saksena G, Sivachenko A, Jing R, Parkin M, Pugh T, Verhaak RG, Stransky N, Boutin AT, Barretina J, Solit DB, Vakiani E, Shao W, Mishina Y, Warmuth M, Jimenez J, Chiang DY, Signoretti S, Kaelin WG, Spardy N, Hahn WC, Hoshida Y, Ogino S, Depinho RA, Chin L, Garraway LA, Fuchs CS, Baselga J, Tabernero J, Gabriel S, Lander ES, Getz G, Meyerson M. Genomic sequencing of colorectal adenocarcinomas identifies a recurrent VTI1A-TCF7L2 fusion. Nat Genet. 2011 Sep 4;43(10):964-8.

Bassères DS, Ebbs A, Cogswell PC, Baldwin AS. IKK is a therapeutic target in KRAS-Induced lung cancer with disrupted p53 activity. Genes Cancer. 2014 Apr;5(1-2):41-55.

Bassères DS, Ebbs A, Levantini E, Baldwin AS. Requirement of the NF-kappaB subunit p65/RelA for K-Ras-induced lung tumorigenesis. Cancer Res. 2010 May 1;70(9):3537-46.

Bayliss R, Sardon T, Vernos I, Conti E. Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle. Mol Cell. 2003 Oct;12(4):851-62.

Bearz A, Berretta M, Lleshi A, Tirelli U. Target therapies in lung cancer. J Biomed Biotechnol. 2011;2011:921231.

Bellanger S, de Gramont A, Sobczak-Thépot J. Cyclin B2 suppresses mitotic failure and DNA re-replication in human somatic cells knocked down for both cyclins B1 and B2. Oncogene. 2007 Nov 8;26(51):7175-84.

Bentires-Alj M, Kontaridis MI, Neel BG. Stops along the RAS pathway in human genetic disease. Nat Med. 2006 Mar;12(3):283-5.

Bera A, Zhao S, Cao L, Chiao PJ, Freeman JW. Oncogenic K-Ras and loss of Smad4 mediate invasion by activating an EGFR/NF-κB Axis that induces expression of MMP9 and uPA in human pancreas progenitor cells. PLoS One. 2013 Dec 5;8(12):e82282.

Berdnik D, Knoblich JA. Drosophila Aurora-A is required for centrosome maturation and actin-dependent asymmetric protein localization during mitosis. Curr Biol. 2002 Apr 16;12(8):640-7.

Bergo MO, Ambroziak P, Gregory C, George A, Otto JC, Kim E, Nagase H, Casey PJ, Balmain A, Young SG. Absence of the CAAX endoprotease Rce1: effects on cell growth and transformation. Mol Cell Biol. 2002 Jan;22(1):171-81.

Bernard M, Sanseau P, Henry C, Couturier A, Prigent C. Cloning of STK13, a third human protein kinase related to Drosophila aurora and budding yeast Ipl1 that maps on chromosome 19q13.3-ter. Genomics. 1998 Nov 1;53(3):406-9.

Berndt N, Hamilton AD, Sebti SM. Targeting protein prenylation for cancer therapy. Nat Rev Cancer. 2011; 11:775–91.

Bernhard EJ, Gruber SB, Muschel RJ. Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/collagenase) to the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 May 10;91(10):4293-7.

Biankin AV, Waddell N, Kassahn KS, Gingras MC, Muthuswamy LB, Johns AL, Miller DK, Wilson PJ, Patch AM, Wu J, Chang DK, Cowley MJ, Gardiner BB, Song S, Harliwong I, Idrisoglu S, Nourse C, Nourbakhsh E, Manning S, Wani S, Gongora M, Pajic M, Scarlett CJ, Gill AJ, Pinho AV, Rooman I, Anderson M, Holmes O, Leonard C, Taylor D, Wood S, Xu Q, Nones K, Fink JL, Christ A, Bruxner T, Cloonan N, Kolle G, Newell F, Pinese M, Mead RS, Humphris JL, Kaplan W, Jones MD, Colvin EK, Nagrial AM, Humphrey ES, Chou A, Chin VT, Chantrill LA, Mawson A, Samra JS, Kench JG, Lovell JA, Daly RJ, Merrett ND, Toon C, Epari K, Nguyen NQ, Barbour A, Zeps N; Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative, Kakkar N, Zhao F, Wu YQ, Wang M, Muzny DM, Fisher WE, Brunicardi FC, Hodges SE, Reid JG, Drummond J, Chang K, Han Y, Lewis LR, Dinh H, Buhay CJ, Beck T, Timms L, Sam M, Begley K, Brown A, Pai D, Panchal A, Buchner N, De Borja R, Denroche RE, Yung CK, Serra S, Onetto N, Mukhopadhyay D, Tsao MS, Shaw PA, Petersen GM, Gallinger S, Hruban RH, Maitra A, Iacobuzio-Donahue CA, Schulick RD, Wolfgang CL, Morgan RA, Lawlor RT, Capelli P, Corbo V, Scardoni M, Tortora G, Tempero MA, Mann KM, Jenkins NA, Perez-Mancera PA, Adams DJ, Largaespada DA, Wessels LF, Rust AG, Stein LD, Tuveson DA, Copeland NG, Musgrove EA, Scarpa A, Eshleman JR, Hudson TJ, Sutherland RL, Wheeler DA, Pearson JV, McPherson JD, Gibbs RA, Grimmond SM. Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. Nature. 2012 Nov 15;491(7424):399-405.

Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, Mossie K, Ng L, Souza B, Schryver B, Flanagan P, Clairvoyant F, Ginther C, Chan CS, Novotny M, Slamon DJ, Plowman GD. A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. EMBO J. 1998 Jun 1;17(11):3052-65.

Bodemann BO, White MA. Ral GTPases and cancer: linchpin support of the tumorigenic platform. Nat Rev Cancer. 2008 Feb;8(2):133-40.

Bolanos-Garcia VM. Aurora kinases. Int J Biochem Cell Biol. 2005 Aug;37(8):1572-7.

Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, Van Loo P, Alexandrov LB, Martincorena I, Dawson KJ, Iorio F, Nik-Zainal S, Bignell GR, Hinton JW, Li Y, Tubio JM, McLaren S, O' Meara S, Butler AP, Teague JW, Mudie L, Anderson E, Rashid N, Tai YT, Shammas MA, Sperling AS, Fulciniti M, Richardson PG, Parmigiani G, Magrangeas F, Minvielle S, Moreau P, Attal M, Facon T, Futreal PA, Anderson KC, Campbell PJ, Munshi NC. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. Nat Commun. 2014;5:2997.

Bolton MA, Lan W, Powers SE, McCleland ML, Kuang J, Stukenberg PT. Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation. Mol Biol Cell. 2002 Sep;13(9):3064-77.

Bonner T, Kerby SB, Sutrave P, Gunnell MA, Mark G, Rapp UR. Structure and biological activity of human homologs of the raf/mil oncogene. Mol Cell Biol. 1985 Jun;5(6):1400-7.

Boonstra J, Rijken P, Humbel B, Cremers F, Verkleij A, van Bergen en Henegouwen P. The epidermal growth factor. Cell Biol Int. 1995 May;19(5):413-30.

Boriack-Sjodin PA, Margarit SM, Bar-Sagi D, Kuriyan J. The structural basis of the activation of Ras by Sos. Nature. 1998 Jul 23;394(6691):337-43.

Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, Vogelstein B. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. Nature. 1987 May 28-Jun 3;327(6120):293-7.

Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. Cancer Res. 1989 Sep 1;49(17):4682-9.

Bosetti C, Malvezzi M, Rosso T, Bertuccio P, Gallus S, Chatenoud L, Levi F, Negri E, La Vecchia C. Lung cancer mortality in European women: trends and predictions. Lung Cancer. 2012 Dec;78(3):171-8.

Boss DS, Witteveen PO, Van der sar J, Lolkema MP, Voest EE, Stockman PK, Ataman O, Wilson D, Das S, Schellens JH. Clinical evaluation of AZD1152, an i.v. inhibitor of Aurora B kinase, in patients with solid malignant tumors. Ann Oncol. 2010 Oct 1. 22:431-37.

Bossù P, Vanoni M, Wanke V, Cesaroni MP, Tropea F, Melillo G, Asti C, Porzio S, Ruggiero P, Di Cioccio V, Maurizi G, Ciabini A, Alberghina L. A dominant negative RAS-specific guanine nucleotide exchange factor reverses neoplastic phenotype in K-ras transformed mouse fibroblasts. Oncogene. 2000 Apr 20;19(17):2147-54.

Bournet B, Muscari F, Buscail C, Assenat E, Barthet M, Hammel P, Selves J, Guimbaund R, Cordelier P, Buscail L. KRAS G12D Mutation Subtype Is A Prognostic Factor for Advanced Pancreatic Adenocarcinoma. Clin Transl Gastroenterol. 2016 Mar 24;7:e157.

Bowman BM, Sebolt KA, Hoff BA, Boes JL, Daniels DL, Heist KA, Galbán CJ, Patel RM, Zhang J, Beer DG, Ross BD, Rehemtulla A, Galbán S. Phosphorylation of FADD by the kinase CK1α promotes KRASG12D-induced lung cancer. Sci Signal. 2015 Jan 27;8(361):ra9.

Braun BS, Tuveson DA, Kong N, Le DT, Kogan SC, Rozmus J, Le Beau MM, Jacks TE, Shannon KM. Somatic activation of oncogenic Kras in hematopoietic cells initiates a rapidly fatal myeloproliferative disorder. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jan 13;101(2):597-602.

Bray FI, Weiderpass E. Lung cancer mortality trends in 36 European countries: secular trends and birth cohort patterns by sex and region 1970-2007. Int J Cancer. 2010 Mar 15;126(6):1454-66.

Brembeck FH, Schreiber FS, Deramaudt TB, Craig L, Rhoades B, Swain G, Grippo P, Stoffers DA, Silberg DG, Rustgi AK. The mutant K-ras oncogene causes pancreatic periductal lymphocytic infiltration and gastric mucous neck cell hyperplasia in transgenic mice. Cancer Res. 2003 May 1;63(9):2005-9.

Briassouli P, Chan F, Savage K, Reis-Filho JS, Linardopoulos S. Aurora-A regulation of nuclear factor-kappaB signaling by phosphorylation of IkappaBalpha. Cancer Res. 2007 Feb 15;67(4):1689-95.

Britten CD, Rowinsky EK, Soignet S, Patnaik A, Yao SL, Deutsch P, Lee Y, Lobell RB, Mazina KE, McCreery H, Pezzuli S, Spriggs D. A phase I and pharmacological study of the farnesyl protein transferase inhibitor L-778,123 in patients with solid malignancies. Clin Cancer Res. 2001 Dec;7(12):3894-903.

Britten CD. PI3K and MEK inhibitor combinations: examining the evidence in selected tumor types. Cancer Chemother Pharmacol. 2013 Jun;71(6):1395-409.

Brock EJ, Ji K, Reiners JJ Jr, Mattingly RR. How to Target Activated Ras Proteins: Direct Inhibition vs. Induced Mislocalization. Mini Rev Med Chem. 2015 Oct 1.

Brognard J, Clark AS, Ni Y, Dennis PA. Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. Cancer Res. 2001 May 15;61(10):3986-97.

Brough R, Frankum JR, Costa-Cabral S, Lord CJ, Ashworth A. Searching for synthetic lethality in cancer. Curr Opin Genet Dev. 2011 Feb;21(1):34-41.

Brown JR, Koretke KK, Birkeland ML, Sanseau P, Patrick DR. Evolutionary relationships of Aurora kinases: implications for model organism studies and the development of anti-cancer drugs. BMC Evol Biol. 2004 Oct 12;4:39.

Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. Cancer Cell. 2002 Sep;2(3):243-7.

Bryant KL, Mancias JD, Kimmelman AC, Der CJ. KRAS: feeding pancreatic cancer proliferation. Trends Biochem Sci. 2014 Feb;39(2):91-100.

Buhrman G, O'Connor C, Zerbe B, Kearney BM, Napoleon R, Kovrigina EA, Vajda S, Kozakov D, Kovrigin EL, Mattos C. Analysis of binding site hot spots on the surface of Ras GTPase. J Mol Biol. 2011 Nov 4;413(4):773-89.

Burgering BM, Coffer PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. Nature. 1995 Aug 17;376(6541):599-602.

Burns MC, Sun Q, Daniels RN, Camper D, Kennedy JP, Phan J, Olejniczak ET, Lee T, Waterson AG, Rossanese OW, Fesik SW. Approach for targeting Ras with small molecules that activate SOS-mediated nucleotide exchange. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Mar 4;111(9):3401-6.

Buschhorn HM, Klein RR, Chambers SM, Hardy MC, Green S, Bearss D, Nagle RB. Aurora-A over-expression in high-grade PIN lesions and prostate cancer. Prostate. 2005 Sep 1;64(4):341-6.

Byrne JL, Paterson HF, Marshall CJ. p21Ras activation by the guanine nucleotide exchange factor Sos, requires the Sos/Grb2 interaction and a second ligand-dependent signal involving the Sos N-terminus. Oncogene. 1996 Nov 21;13(10):2055-65.

Cancer Genome Atlas Research Network, Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, Akbani R, Liu Y, Shen H, Robertson AG, Pashtan I, Shen R, Benz CC, Yau C, Laird PW, Ding L, Zhang W, Mills GB, Kucherlapati R, Mardis ER, Levine DA. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. Nature. 2013 May 2;497(7447):67-73.

Cantrell DA. GTPases and T cell activation. Immunol Rev. 2003 Apr;192:122-30.

Cappello P, Blaser H, Gorrini C, Lin DC, Elia AJ, Wakeham A, Haider S, Boutros PC, Mason JM, Miller NA, Youngson B, Done SJ, Mak TW. Role of Nek2 on centrosome duplication and aneuploidy in breast cancer cells. Oncogene. 2014 May 1;33(18):2375-84.

Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. Science. 1998 Nov 13;282(5392):1318-21.

Carmena M, Earnshaw WC. The cellular geography of aurora kinases. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003 Nov;4(11):842-54.

Carpino N, Wisniewski D, Strife A, Marshak D, Kobayashi R, Stillman B, Clarkson B. p62(dok): a constitutively tyrosine-phosphorylated, GAP-associated protein in chronic myelogenous leukemia progenitor cells. Cell. 1997 Jan 24;88(2):197-204.

Carta D, Bortolozzi R, Hamel E, Basso G, Moro S, Viola G, Ferlin MG. Novel 3-Substituted 7-Phenylpyrrolo[3,2-f]quinolin-9(6H)-ones as Single Entities with Multitarget Antiproliferative Activity. J Med Chem. 2015 Oct 22;58(20):7991-8010.

Carvajal RD, Tse A, Schwartz GK. Aurora kinases: new targets for cancer therapy. Clin Cancer Res. 2006 Dec 1;12(23):6869-75.

Cary LA, Han DC, Guan JL. Integrin-mediated signal transduction pathways. Histol Histopathol. 1999 Jul;14(3):1001-9.

Casas E, Kim J, Bendesky A, Ohno-Machado L, Wolfe CJ, Yang J. Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition and metastasis. Cancer research. 2011;71(1):245-254.

Castellano E, Molina-Arcas M, Krygowska AA, East P, Warne P, Nicol A, Downward J. RAS signalling through PI3-Kinase controls cell migration via modulation of Reelin expression. Nat Commun. 2016 Apr 13;7:11245.

Castellano E, Santos E. Functional specificity of ras isoforms: so similar but so different. Genes Cancer. 2011 Mar;2(3):216-31.

Castellano E, Sheridan C, Thin MZ, Nye E, Spencer-Dene B, Diefenbacher ME, Moore C, Kumar MS, Murillo MM, Grönroos E, Lassailly F, Stamp G, Downward J. Requirement for interaction of PI3-kinase p110α with RAS in lung tumor maintenance. Cancer Cell. 2013 Nov 11;24(5):617-30.

Castro A, Arlot-Bonnemains Y, Vigneron S, Labbé JC, Prigent C, Lorca T. APC/Fizzy-Related targets Aurora-A kinase for proteolysis. EMBO Rep. 2002 May;3(5):457-62.

Castro A, Vigneron S, Bernis C, Labbé JC, Prigent C, Lorca T. The D-Box-activating domain (DAD) is a new proteolysis signal that stimulates the silent D-Box sequence of Aurora-A. EMBO Rep. 2002 Dec;3(12):1209-14.

Cathcart J, Pulkoski-Gross A, Cao J. Targeting Matrix Metalloproteinases in Cancer: Bringing New Life to Old Ideas. Genes Dis. 2015 Mar 1;2(`1):26-34.

Caulin C, Nguyen T, Longley MA, Zhou Z, Wang XJ, Roop DR. Inducible activation of oncogenic K-ras results in tumor formation in the oral cavity. Cancer Res. 2004 Aug 1;64(15):5054-8.

Cavalcante TM. O controle do tabagismo no Brasil: avanços e desafios. Rev. Psiq. Clín. 32(5);283-300, 2005.

Cazales M, Schmitt E, Montembault E, Dozier C, Prigent C, Ducommun B. CDC25B phosphorylation by Aurora-A occurs at the G2/M transition and is inhibited by DNA damage. Cell Cycle. 2005 Sep;4(9):1233-8.

Chakrabarti M, Jang H, Nussinov R. The Hypervariable Region (HVR) of GDP-Bound K-Ras4A Is Unlikely to Autoinhibit the Effector Binding Site. J Phys Chem B. 2016 Jan 13.

Chan F, Sun C, Perumal M, Nguyen QD, Bavetsias V, McDonald E, Martins V, Wilsher NE, Raynaud FI, Valenti M, Eccles S, Te Poele R, Workman P, Aboagye EO, Linardopoulos S. Mechanism of action of the Aurora kinase inhibitor CCT129202 and in vivo quantification of biological activity. Mol Cancer Ther. 2007 Dec;6(12 Pt 1):3147-57.

Chan IT, Kutok JL, Williams IR, Cohen S, Kelly L, Shigematsu H, Johnson L, Akashi K, Tuveson DA, Jacks T, Gilliland DG. Conditional expression of oncogenic K-ras from its endogenous promoter induces a myeloproliferative disease. J Clin Invest. 2004 Feb;113(4):528-38.

Chang BH, Smith L, Huang J, Thayer M. Chromosomes with delayed replication timing lead to checkpoint activation, delayed recruitment of Aurora B and chromosome instability. Oncogene. 2007 Mar 22;26(13):1852-61.

Chang EH, Gonda MA, Ellis RW, Scolnick EM, Lowy DR. Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982 Aug;79(16):4848-52.

Chang YS, Graves B, Guerlavais V, Tovar C, Packman K, To KH, Olson KA, Kesavan K, Gangurde P, Mukherjee A, Baker T, Darlak K, Elkin C, Filipovic Z, Qureshi FZ, Cai H, Berry P, Feyfant E, Shi XE, Horstick J, Annis DA, Manning AM, Fotouhi N, Nash H, Vassilev LT, Sawyer TK. Stapled α-helical peptide drug development: a potent dual inhibitor of MDM2 and MDMX for p53-dependent cancer therapy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Sep 3;110(36):E3445-54.

Cheetham GM, Knegtel RM, Coll JT, Renwick SB, Swenson L, Weber P, Lippke JA, Austen DA. Crystal structure of aurora-2, an oncogenic serine/threonine kinase. J Biol Chem. 2002 Nov 8;277(45):42419-22.

Chefetz I, Holmberg JC, Alvero AB, Visintin I, Mor G. Inhibition of Aurora-A kinase induces cell cycle arrest in epithelial ovarian cancer stem cells by affecting NFκB pathway. Cell Cycle. 2011 Jul 1;10(13):2206-14.

Chefetz I, Holmberg JC, Alvero AB, Visintin I, Mor G. Inhibition of Aurora-A kinase induces cell cycle arrest in epitelial ovarian cancer stem cells by affecting NF-KB pathway. Cell Cycle. 2011 Jul 1;10(13):2206-14.

Chen G, Oh S, Monia BP, Stacey DW. Antisense oligonucleotides demonstrate a dominant role of c-Ki-RAS proteins in regulating the proliferation of diploid human fibroblasts. J Biol Chem. 1996 Nov 8;271(45):28259-65.

Chen X, Bahrami A, Pappo A, Easton J, Dalton J, Hedlund E, Ellison D, Shurtleff S, Wu G, Wei L, Parker M, Rusch M, Nagahawatte P, Wu J, Mao S, Boggs K, Mulder H, Yergeau D, Lu C, Ding L, Edmonson M, Qu C, Wang J, Li Y, Navid F, Daw NC, Mardis ER, Wilson RK, Downing JR, Zhang J, Dyer MA; St. Jude Children's Research Hospital–Washington University Pediatric Cancer Genome Project. Recurrent somatic structural variations contribute to tumorigenesis in pediatric osteosarcoma. Cell Rep. 2014 Apr 10;7(1):104-12.

Chen X, Makarewicz JM, Knauf JA, Johnson LK, Fagin JA. Transformation by Hras(G12V) is consistently associated with mutant allele copy gains and is reversed by farnesyl transferase inhibition. Oncogene. 2014 Nov 20;33(47):5442-9.

Chen XB, Chen GL, Liu JN, Yang JZ, Yu DK, Lin DX, Tan W. Genetic polymorphisms in STK15 and MMP-2 associated susceptibility to esophageal cancer in Mongolian population. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi. 2009 Jul;43(7):559-64.

Chen Y, Lu R, Zheng H, Xiao R, Feng J, Wang H, Gao X, Guo L. The NFKB1 polymorphysm (rs4648068) is associated with the cell proliferation and motility in gastric cancer. BMC Gastroenterol. 2015 Feb 14;15:21.

Chieffi P, Cozzolino L, Kisslinger A, Libertini S, Staibano S, Mansueto G, De Rosa G, Villacci A, Vitale M, Linardopoulos S, Portella G, Tramontano D. Aurora B expression directly correlates with prostate cancer malignancy and influence prostate cell proliferation. Prostate. 2006 Feb 15;66(3):326-33.

Chien Y, Kim S, Bumeister R, Loo YM, Kwon SW, Johnson CL, Balakireva MG, Romeo Y, Kopelovich L, Gale M Jr, Yeaman C, Camonis JH, Zhao Y, White MA. RalB GTPase-mediated activation of the IkappaB family kinase TBK1 couples innate immune signaling to tumor cell survival. Cell. 2006 Oct 6;127(1):157-70.

Chin L, Tam A, Pomerantz J, Wong M, Holash J, Bardeesy N, Shen Q, O'Hagan R, Pantginis J, Zhou H, Horner JW 2nd, Cordon-Cardo C, Yancopoulos GD, DePinho RA. Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. Nature. 1999 Jul 29;400(6743):468-72.

Chinn DC, Holland WS, Mack PC. Anticancer activity of the Aurora A kinase inhibitor MK-5108 in non-small-cell lung cancer (NSCLC) in vitro as monotherapy and in combination with chemotherapies. J Cancer Res Clin Oncol. 2014 Jul;140(7):1137-49.

Chiou SK, Hoa N, Hodges A, Ge L, Jadus MR. Indomethacin promotes apoptosis in gastric cancer cells through concomitante degradation of Survivin and Aurora B kinase proteins. Apoptosis. 2014 Sep;19(9):1378-88.

Chiu VK, Bivona T, Hach A, Sajous JB, Silletti J, Wiener H, Johnson RL 2nd, Cox AD, Philips MR. Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. Nat Cell Biol. 2002 May;4(5):343-50.

Chu PC, Yang MC, Kulp SK, Salunke SB, Himmel LE, Fang CS, Jadhav AM, Shan YS, Lee CT, Lai MD, Shirley LA, Bekaii-Saab T, Chen CS. Regulation of oncogenic KRAS signaling via a novel KRAS-integrin-linked kinase-hnRNPA1 regulatory loop in human pancreatic cancer cells. Oncogene. 2015 Nov 30.

Cichowski K, Jacks T. NF1 tumor suppressor gene function: narrowing the GAP. Cell. 2001 Feb 23;104(4):593-604.

Clarke PR, Zhang C. Ran GTPase: a master regulator of nuclear structure and function during the eukaryotic cell division cycle? Trends Cell Biol. 2001 Sep;11(9):366-71.

Clarke S. Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues. Annu Rev Biochem. 1992;61:355-86.

Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. Biochem J. 1997 Aug 15;326 (Pt 1):1-16.

Cohen R, Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Faivre S, de Gramont A, Raymond E. Targeting cancer cell metabolism in pancreatic adenocarcinoma. Oncotarget. 2015 Jul 10;6(19):16832-47.

Cohen RB, Jones SF, Aggarwal C, von Mehren M, Cheng J, Spigel DR, Greco FA, Mariani M, Rocchetti M, Ceruti R, Comis S, Laffranchi B, Moll J, Burris HA. A phase I dose-escalation study of danusertib (PHA-739358) administered as a 24-hour infusion with and without granulocyte colony-stimulating factor in a 14-day cycle in patients with advanced solid tumors. Clin Cancer Res. 2009 Nov 1;15(21):6694-701.

Coleman WB, Throneburg DB, Grisham JW, Smith GJ. Overexpression of c-K-ras, c-N-ras and transforming growth factor beta co-segregate with tumorigenicity in morphologically transformed C3H 10T1/2 cell lines. Carcinogenesis. 1994 May;15(5):1005-12.

Collins MA, Brisset JC, Zhang Y, Bednar F, Pierre J, Heist KA, Galbán CJ, Galbán S, di Magliano MP. Metastatic pancreatic cancer is dependent on oncogenic Kras in mice. PLoS One. 2012;7(12):e49707.

Cooper WA, Lam DC, O'Toole SA, Minna JD. Molecular biology of lung cancer. J Thorac Dis. 2013 Oct;5 Suppl 5:S479-90.

Copeland NG, Cooper GM. Transfection by exogenous and endogenous murine retrovírus DNAs. Cell 16:347-356, 1979.

Corcoran RB, Cheng KA, Hata AN, Faber AC, Ebi H, Coffee EM, Greninger P, Brown RD, Godfrey JT, Cohoon TJ, Song Y, Lifshits E, Hung KE, Shioda T, Dias-Santagata D, Singh A, Settleman J, Benes CH, Mino-Kenudson M, Wong KK, Engelman JA. Synthetic lethal interaction of combined BCL-XL and MEK inhibition promotes tumor regressions in KRAS mutant cancer models. Cancer Cell. 2013 Jan 14;23(1):121-8.

Corral T, Jiménez M, Hernández-Muñoz I, Pérez de Castro I, Pellicer A. NF1 modulates the effects of Ras oncogenes: evidence of other NF1 function besides its GAP activity. J Cell Physiol. 2003 Nov;197(2):214-24.

Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. Science. 2002 Mar 29;295(5564):2387-92.

Cowley S, Paterson H, Kemp P, Marshall CJ. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. Cell. 1994 Jun 17;77(6):841-52.

Cox AD, Der CJ, Philips MR. Targeting RAS Membrane Association: Back to the Future for Anti-RAS Drug Discovery? Clin Cancer Res. 2015 Apr 15;21(8):1819-27.

Cox AD, Fesik SW, Kimmelman AC, Luo J, Der CJ. Drugging the undruggable RAS: Mission possible? Nat Rev Drug Discov. 2014 Nov;13(11):828-51.

Crane R, Kloepfer A, Ruderman JV. Requirements for the destruction of human Aurora-A. J Cell Sci. 2004 Dec 1;117(Pt 25):5975-83.

Cuiffo B, Ren R. Palmitoylation of oncogenic NRAS is essential for leukemogenesis. Blood. 2010 Apr 29;115(17):3598-605.

Cunningham CC, Holmlund JT, Geary RS, Kwoh TJ, Dorr A, Johnston JF, Monia B, Nemunaitis J. A Phase I trial of H-ras antisense oligonucleotide ISIS 2503 administered as a continuous intravenous infusion in patients with advanced carcinoma. Cancer. 2001 Sep 1;92(5):1265-71.

D'Adamo DR, Novick S, Kahn JM, Leonardi P, Pellicer A. rsc: a novel oncogene with structural and functional homology with the gene family of exchange factors for Ral. Oncogene. 1997 Mar 20;14(11):1295-305.

D'Addario G, Früh M, Reck M, Baumann P, Klepetko W, Felip E; ESMO Guidelines Working Group. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2010 May;21 Suppl 5:v116-9.

D'Assoro AB, Lingle WL, Salisbury JL. Centrosome amplification and the development of cancer. Oncogene. 2002 Sep 9;21(40):6146-53.

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature. 2002 Jun 27;417(6892):949-54.

Davies MA. Targeted therapies for brain metastases. Adv Pharmacol. 2012;65:109-42.

Davis SL, Robertson KM, Pitts TM, Tentler JJ, Bradshaw-Pierce EL, Klauck PJ, Bagby SM, Hyatt SL, Selby HM, Spreafico A, Ecsedy JA, Arcaroli JJ, Messersmith WA, Tan AC, Eckhardt SG. Combined inhibition of MEK and Aurora A kinase in KRAS/PIK3CA double-mutant colorectal cancer models. Front Pharmacol. 2015 Jun 16;6:120.

de Bruyn KM, de Rooij J, Wolthuis RM, Rehmann H, Wesenbeek J, Cool RH, Wittinghofer AH, Bos JL. RalGEF2, a pleckstrin homology domain containing guanine nucleotide exchange factor for Ral. J Biol Chem. 2000 Sep 22;275(38):29761-6.

Delaval B, Ferrand A, Conte N, Larroque C, Hernandez-Verdun D, Prigent C, Birnbaum D. Aurora B -TACC1 protein complex in cytokinesis. Oncogene. 2004 Jun 3;23(26):4516-22.

den Hollander J1, Rimpi S, Doherty JR, Rudelius M, Buck A, Hoellein A, Kremer M, Graf N, Scheerer M, Hall MA, Goga A, von Bubnoff N, Duyster J, Peschel C, Cleveland JL, Nilsson JA, Keller U. Aurora kinases A and B are up-regulated by Myc and are essential for maintenance of the malignant state. Blood. 2010 Sep 2;116(9):1498-505.

Deng Y, Wang L, Tan S, Kim GP, Dou R, Chen D, Cai Y, Fu X, Wang L, Zhu J, Wang J. KRAS as a predictor of poor prognosis and benefit from postoperative FOLFOX chemotherapy in patients with stage II and III colorectal cancer. Mol Oncol. 2015 Aug;9(7):1341-7

Der CJ, Cooper GM. Altered gene products are associated with activation of cellular rasK genes in human lung and colon carcinomas. Cell. 1983 Jan;32(1):201-8.

Der CJ, Krontiris TG, Cooper GM. Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982 Jun;79(11):3637-40.

Der CJ. The ras family of oncogenes. Cancer Treat Res. 1989;47:73-119.

Deramaudt TB, Takaoka M, Upadhyay R, Bowser MJ, Porter J, Lee A, Rhoades B, Johnstone CN, Weissleder R, Hingorani SR, Mahmood U, Rustgi AK. N-cadherin and keratinocyte growth factor receptor mediate the functional interplay between Ki-RASG12V and p53V143A in promoting pancreatic cell migration, invasion, and tissue architecture disruption. Mol Cell Biol. 2006 Jun;26(11):4185-200.

Dergham ST, Dugan MC, Kucway R, Du W, Kamarauskiene DS, Vaitkevicius VK, Crissman JD, Sarkar FH. Prevalence and clinical significance of combined K-ras mutation and p53 aberration in pancreatic adenocarcinoma. Int J Pancreatol. 1997 Apr;21(2):127-43.

Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. Cancer Metastasis Ver. 2006 Mar;25(1):9-34.

Devy L, Huang L, Naa L, Yanamandra N, Pieters H, Frans N, Chang E, Tao Q, Vanhove M, Lejeune A, van Gool R, Sexton DJ, Kuang G, Rank D, Hogan S, Pazmany C, Ma YL, Schoonbroodt S, Nixon AE, Ladner RC, Hoet R, Henderikx P, Tenhoor C, Rabbani SA, Valentino ML, Wood CR, Dransfield DT. Selective inhibition of matrix metalloproteinase-14 blocks tumor growth, invasion, and angiogenesis. Cancer Res. 2009 Feb 15;69(4):1517-26.

di Magliano MP, Logsdon CD. Roles for KRAS in pancreatic tumor development and progression. Gastroenterology. 2013 Jun;144(6):1220-9.

Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, McLellan MD, Cibulskis K, Sougnez C, Greulich H, Muzny DM, Morgan MB, Fulton L, Fulton RS, Zhang Q, Wendl MC, Lawrence MS, Larson DE, Chen K, Dooling DJ, Sabo A, Hawes AC, Shen H, Jhangiani SN, Lewis LR, Hall O, Zhu Y, Mathew T, Ren Y, Yao J, Scherer SE, Clerc K, Metcalf GA, Ng B, Milosavljevic A, Gonzalez-Garay ML, Osborne JR, Meyer R, Shi X, Tang Y, Koboldt DC, Lin L, Abbott R, Miner TL, Pohl C, Fewell G, Haipek C, Schmidt H, Dunford-Shore BH, Kraja A, Crosby SD, Sawyer CS, Vickery T, Sander S, Robinson J, Winckler W, Baldwin J, Chirieac LR, Dutt A, Fennell T, Hanna M, Johnson BE, Onofrio RC, Thomas RK, Tonon G, Weir BA, Zhao X, Ziaugra L, Zody MC, Giordano T, Orringer MB, Roth JA, Spitz MR, Wistuba II, Ozenberger B, Good PJ, Chang AC, Beer DG, Watson MA, Ladanyi M, Broderick S, Yoshizawa A, Travis WD, Pao W, Province MA, Weinstock GM, Varmus HE, Gabriel SB, Lander ES, Gibbs RA, Meyerson M, Wilson RK. Eriksen M, Mackay J, Ross H. The Tobacco Atlas. 4th edition Atlanta, GA: American Cancer Society; 2012.

Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. Nature. 2008 Oct 23;455(7216):1069-75.

Ditchfield C, Johnson VL, Tighe A, Ellston R, Haworth C, Johnson T, Mortlock A, Keen N, Taylor SS. Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. J Cell Biol. 2003 Apr 28;161(2):267-80.

Do TV, Xiao F, Bickel LE, Klein-Szanto AJ, Pathak HB, Hua X, Howe C, O'Brien SW, Maglaty M, Ecsedy JA, Litwin S, Golemis EA, Schilder RJ, Godwin AK, Connolly DC. Aurora kinase A mediates epithelial ovarian cancer cell migration and adhesion. Oncogene. 2014 Jan 30;33(5):539-49.

Do TV, Xiao F, Bickel LE, Klein-Szanto AJ, Pathak HB, Hua X, Howe C, O'Brien SW, Maglaty M, Ecsedy JA, Litwin S, Golemis EA, Schilder RJ, Godwin AK, Connolly DC. Aurora kinase A mediates epithelial ovarian cancer cell migration and adhesion. Oncogene. 2014 Jan 30;33(5):539-49.

dos Santos EO, Carneiro-Lobo TC, Aoki MN, Levantini E, Bassères DS. Aurora kinase targeting in lung cancer reduces KRAS-induced transformation. Mol Cancer. 2016 Feb 3;15(1):12.

dos Santos EO. Investigação das quinases Aurora A e Aurora B como potenciais alvos terapêuticos para o câncer de pulmão induzido por KRAS. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 2013.

Downward J, Graves JD, Warne PH, Rayter S, Cantrell DA. Stimulation of p21ras upon T-cell activation. Nature. 1990 Aug 23;346(6286):719-23.

Downward J. PI 3-kinase, Akt and cell survival. Semin Cell Dev Biol. 2004 Apr;15(2):177-82.

Du J, Hannon GJ. Suppression of p160ROCK bypasses cell cycle arrest after Aurora-A/STK15 depletion. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jun 15;101(24):8975-80.

Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. Science. 1997 Jan 31;275(5300):661-5.

Dutertre S, Cazales M, Quaranta M, Froment C, Trabut V, Dozier C, Mirey G, Bouché JP, Theis-Febvre N, Schmitt E, Monsarrat B, Prigent C, Ducommun B. Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. J Cell Sci. 2004 May 15;117(Pt 12):2523-31.

Dutertre S, Descamps S, Prigent C. On the role of aurora-A in centrosome function. Oncogene. 2002 Sep 9;21(40):6175-83.

Duursma AM, Agami R. Ras interference as cancer therapy. Semin Cancer Biol. 2003 Aug;13(4):267-73.

Dykes DC, Brandt-Rauf P, Luster SM, Chung D, Friedman FK, Pincus MR. Activated conformations of the ras-gene-encoded p21 protein. 1. An energy-refined structure for the normal p21 protein complexed with GDP. J Biomol Struct Dyn. 1992 Jun;9(6):1025-44.

Dykes DC, Brandt-Rauf P, Luster SM, Friedman FK, Pincus MR. Activated conformations of the ras-gene-encoded p21 protein. 2. Comparison of the computed and high-resolution x-ray crystallographic structures of Gly-12 p21. J Biomol Struct Dyn. 1993 Apr;10(5):905-18.

Ebinu JO, Bottorff DA, Chan EY, Stang SL, Dunn RJ, Stone JC. RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. Science. 1998 May 15;280(5366):1082-6.

Ellis CA, Clark G. The importance of being K-Ras. Cell Signal. 2000 Jul;12(7):425-34.

Emdad L, Sarkar D, Su ZZ, Boukerche H, Bar-Eli M, Fisher PB. Progression elevated gene-3 (PEG-3) induces pleiotropic effects on tumor progression: modulation of genomic stability and invasion. J Cell Physiol. 2005 Jan;202(1):135-46.

End DW, Smets G, Todd AV, Applegate TL, Fuery CJ, Angibaud P, Venet M, Sanz G, Poignet H, Skrzat S, Devine A, Wouters W, Bowden C. Characterization of the antitumor effects of the selective farnesyl protein transferase inhibitor R115777 in vivo and in vitro. Cancer Res. 2001 Jan 1;61(1):131-7.

Engelman JA, Chen L, Tan X, Crosby K, Guimaraes AR, Upadhyay R, Maira M, McNamara K, Perera SA, Song Y, Chirieac LR, Kaur R, Lightbown A, Simendinger J, Li T, Padera RF, García-Echeverría C, Weissleder R, Mahmood U, Cantley LC, Wong KK. Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. Nat Med. 2008 Dec;14(12):1351-6.

Erdem L, Giovannetti E, Leon LG, Honeywell R, Peters GJ. Polymorphisms to predict outcome to the tyrosine kinase inhibitors gefitinib, erlotinib, sorafenib and sunitinib. Curr Top Med Chem. 2012;12(15):1649-59.

Ermolayev V, Mohajerani P, Ale A, Sarantopoulos A, Aichler M, Kayser G, Walch A, Ntziachristos V. Early recognition of lung cancer by integrin targeted imaging in K-ras mouse model. Int J Cancer. 2015 Sep 1;137(5):1107-18.

Esparza J, Vilardell C, Calvo J, Juan M, Vives J, Urbano-Márquez A, Yagüe J, Cid MC. Fibronectin upregulates gelatinase B (MMP-9) and induces coordinated expression of gelatinase A (MMP-2) and its activator

MT1-MMP (MMP-14) by human T lymphocyte cell lines. A process repressed through RAS/MAP kinase signaling pathways. Blood. 1999 Oct 15;94(8):2754-66.

Esser D, Bauer B, Wolthuis RM, Wittinghofer A, Cool RH, Bayer P. Structure determination of the Ras-binding domain of the Ral-specific guanine nucleotide exchange factor Rlf. Biochemistry. 1998 Sep 29;37(39):13453-62.

Eyers PA, Erikson E, Chen LG, Maller JL. A novel mechanism for activation of the protein kinase Aurora A. Curr Biol. 2003 Apr 15;13(8):691-7.

Farnsworth CL, Freshney NW, Rosen LB, Ghosh A, Greenberg ME, Feig LA. Calcium activation of Ras mediated by neuronal exchange factor Ras-GRF. Nature. 1995 Aug 10;376(6540):524-7.

Fatrai S, van Gosliga D, Han L, Daenen SM, Vellenga E, Schuringa JJ. KRAS(G12V) enhances proliferation and initiates myelomonocytic differentiation in human stem/progenitor cells via intrinsic and extrinsic pathways. J Biol Chem. 2011 Feb 25;286(8):6061-70.

Ferreira JG, Pereira AJ, Akhmanova A, Maiato H. Aurora B spatially regulates EB3 phosphorylation to coordinate daughter cell adhesion with cytokinesis. J Cell Biol. 2013 May 27;201(5):709-24.

Finney R, Herrera D. Ras-Raf complexes: analyses of complexes formed in vivo. Methods Enzymol. 1995;255:310-23.

Fischle W, Tseng BS, Dormann HL, Ueberheide BM, Garcia BA, Shabanowitz J, Hunt DF, Funabiki H, Allis CD. Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. Nature. 2005 Dec 22;438(7071):1116-22.

Fisher GH, Wellen SL, Klimstra D, Lenczowski JM, Tichelaar JW, Lizak MJ, Whitsett JA, Koretsky A, Varmus HE. Induction and apoptotic regression of lung adenocarcinomas by regulation of a K-Ras transgene in the presence and absence of tumor suppressor genes. Genes Dev. 2001 Dec 15;15(24):3249-62.

Flaswinkel H, Barner M, Reth M. The tyrosine activation motif as a target of protein tyrosine kinases and SH2 domains. Semin Immunol. 1995 Feb;7(1):21-7.

Fleming JB, Shen GL, Holloway SE, Davis M, Brekken RA. Molecular consequences of silencing mutant K-ras in pancreatic cancer cells: justification for K-ras-directed therapy. Mol Cancer Res. 2005 Jul;3(7):413-23.

Franke TF, Yang SI, Chan TO, Datta K, Kazlauskas A, Morrison DK, Kaplan DR, Tsichlis PN. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. Cell. 1995 Jun 2;81(5):727-36.

Friday BB, Adjei AA. K-ras as a target for cancer therapy. Biochim Biophys Acta. 2005 Nov 25;1756(2):127-44.

Fu J, Bian M, Jiang Q, Zhang C. Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. Mol Cancer Res. 2007 Jan;5(1):1-10.

Furlan SN, Watkins B, Tkachev V, Flynn R, Cooley S, Ramakrishnan S, Singh K, Giver C, Hamby K, Stempora L, Garrett A, Chen J, Betz KM, Ziegler CG, Tharp GK, Bosinger SE, Promislow DE, Miller JS, Waller EK, Blazar BR, Kean LS. Transcriptome analysis of GVHD reveals aurora kinase A as a targetable pathway for disease prevention. Sci Transl Med. 2015 Nov 25;7(315):315ra191.

Furukawa T, Sunamura M, Horii A. Molecular mechanisms of pancreatic carcinogenesis. Cancer Sci. 2006 Jan;97(1):1-7.

Galiana C, Lozano JC, Bancel B, Nakazawa H, Yamasaki H. High frequency of Ki-ras amplification and p53 gene mutations in adenocarcinomas of the human esophagus. Mol Carcinog. 1995 Dec;14(4):286-93.

Galluzzi L, Pietrocola F, Bravo-San Pedro JM, Amaravadi RK, Baehrecke EH, Cecconi F, Codogno P, Debnath J, Gewirtz DA, Karantza V, Kimmelman A, Kumar S, Levine B, Maiuri MC, Martin SJ, Penninger J, Piacentini M, Rubinsztein DC, Simon HU, Simonsen A, Thorburn AM, Velasco G, Ryan KM, Kroemer G. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. EMBO J. 2015 Apr 1;34(7):856-80.

Gana-Weisz M, Haklai R, Marciano D, Egozi Y, Ben-Baruch G, Kloog Y. The Ras antagonist S-farnesylthiosalicylic acid induces inhibition of MAPK activation. Biochem Biophys Res Commun. 1997 Oct 29;239(3):900-4.

Gao SG, Dong XY, Wang LJ, He J. The study on the chromosome aneuploidy in human lung cancer. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 2007 Jun 26;87(24):1701-3.

Gascoigne KE, Taylor SS. How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? J Cell Sci. 2009 Aug 1;122(Pt 15):2579-85.

Gautschi O, Heighway J, Mack PC, Purnell PR, Lara PN Jr, Gandara DR. Aurora kinases as anticancer drug targets. Clin Cancer Res. 2008 Mar 15;14(6):1639-48.

Georges RN, Mukhopadhyay T, Zhang Y, Yen N, Roth JA. Prevention of orthotopic human lung cancer growth by intratracheal instillation of a retroviral antisense K-ras construct. Cancer Res. 1993 Apr 15;53(8):1743-6.

Gerber DE, Minna JD. ALK inhibition for non-small cell lung cancer: from discovery to therapy in record time. Cancer Cell. 2010 Dec 14;18(6):548-51.

Geuna E, Milani A, Martinello R, Aversa C, Valabrega G, Scaltriti M, Montemurro F. Buparlisib, an oral pan-PI3K inhibitor for the treatment of breast cancer. Expert Opin Investig Drugs. 2015 Mar;24(3):421-31.

Ghobrial IM, Adjei AA. Inhibitors of the ras oncogene as therapeutic targets. Hematol Oncol Clin North Am. 2002 Oct;16(5):1065-88.

Ghosh S, Moore S, Bell RM, Dush M. Functional analysis of a phosphatidic acid binding domain in human Raf-1 kinase: mutations in the phosphatidate binding domain lead to tail and trunk abnormalities in developing zebrafish embryos. J Biol Chem. 2003 Nov 14;278(46):45690-6.

Giet R, Glover DM. Drosophila aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. J Cell Biol. 2001 Feb 19;152(4):669-82.

Giet R, McLean D, Descamps S, Lee MJ, Raff JW, Prigent C, Glover DM. Drosophila Aurora A kinase is required to localize D-TACC to centrosomes and to regulate astral microtubules. J Cell Biol. 2002 Feb 4;156(3):437-51.

Giet R, Uzbekov R, Cubizolles F, Le Guellec K, Prigent C. The Xenopus laevis aurora-related protein kinase pEg2 associates with and phosphorylates the kinesin-related protein XlEg5. J Biol Chem. 1999 May 21;274(21):15005-13.

Giubettini M, Asteriti IA, Scrofani J, De Luca M, Lindon C, Lavia P, Guarguaglini G. Control of Aurora-A stability through interaction with TPX2. J Cell Sci. 2011 Jan 1;124(Pt 1):113-22.

Goepfert TM, Adigun YE, Zhong L, Gay J, Medina D, Brinkley WR. Centrosome amplification and overexpression of aurora A are early events in rat mammary carcinogenesis. Cancer Res. 2002 Jul 15;62(14):4115-22.

Goldberg SB, Supko JG, Neal JW, Muzikansky A, Digumarthy S, Fidias P, Temel JS, Heist RS, Shaw AT, McCarthy PO, Lynch TJ, Sharma S, Settleman JE, Sequist LV. A phase I study of erlotinib and hydroxychloroquine in advanced non-small-cell lung cancer. J Thorac Oncol. 2012 Oct;7(10):1602-8.

Gong D, Pomerening JR, Myers JW, Gustavsson C, Jones JT, Hahn AT, Meyer T, Ferrell JE Jr. Cyclin A2 regulates nuclear-envelope breakdown and the nuclear accumulation of cyclin B1. Curr Biol. 2007 Jan 9;17(1):85-91.

Gong L, Wu D, Zou J, Chen J, Chen L, Chen Y, Ni C, Yuan H. Prognostic impact of serum and tissue MMP-9 in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. Oncotarget. 2016 Feb 23.

González-García A, Pritchard CA, Paterson HF, Mavria G, Stamp G, Marshall CJ. RalGDS is required for tumor formation in a model of skin carcinogenesis. Cancer Cell. 2005 Mar;7(3):219-26.

Gorbsky GJ. Mitosis: MCAK under the aura of Aurora B. Curr Biol. 2004 May 4;14(9):R346-8.

Goto H, Yasui Y, Kawajiri A, Nigg EA, Terada Y, Tatsuka M, Nagata K, Inagaki M. Aurora-B regulates the cleavage furrow-specific vimentin phosphorylation in the cytokinetic process. J Biol Chem. 2003 Mar 7;278(10):8526-30.

Goto H, Yasui Y, Nigg EA, Inagaki M. Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation. Genes Cells. 2002 Jan;7(1):11-7.

Goydos JS, Mann B, Kim HJ, Gabriel EM, Alsina J, Germino FJ, Shih W, Gorski DH. Detection of B-RAF and N-RAS mutations in human melanoma. J Am Coll Surg. 2005 Mar;200(3):362-70.

Grady WM, Markowitz SD. Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2002;3:101-28.

Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumors. Nature. 1996 Jan 4;379(6560):88-91.

Grant BJ, Lukman S, Hocker HJ, Sayyah J, Brown JH, McCammon JA, Gorfe AA. Novel allosteric sites on Ras for lead generation. PLoS One. 2011;6(10):e25711.

Gray GD, Hernandez OM, Hebel D, Root M, Pow-Sang JM, Wickstrom E. Antisense DNA inhibition of tumor growth induced by c-Ha-ras oncogene in nude mice. Cancer Res. 1993 Feb 1;53(3):577-80.

Gritsko TM, Coppola D, Paciga JE, Yang L, Sun M, Shelley SA, Fiorica JV, Nicosia SV, Cheng JQ. Activation and overexpression of centrosome kinase BTAK/Aurora-A in human ovarian cancer. Clin Cancer Res. 2003 Apr;9(4):1420-6.

Gu J, Gong Y, Huang M, Lu C, Spitz MR, Wu X. Polymorphisms of STK15 (Aurora-A) gene and lung cancer risk in Caucasians. Carcinogenesis. 2007 Feb;28(2):350-5. Epub 2006 Aug 21.

Guan X. Cancer metastases: challenges and opportunities. Acta Pharm Sin B. 2015 Sep;5(5):402-18.

Guin S, Ru Y, Wynes MW, Mishra R, Lu X, Owens C, Barn AE, Vasu VT, Hirsch FR, Kern JA, Theodorescu D. Contributions of KRAS and RAL in non-small-cell lung cancer growth and progression. J Thorac Oncol. 2013 Dec;8(12):1492-501.

Gunning WT, Kramer PM, Lubet RA, Steele VE, End DW, Wouters W, Pereira MA. Chemoprevention of benzo(a)pyrene-induced lung tumors in mice by the farnesyltransferase inhibitor R115777. Clin Cancer Res. 2003 May;9(5):1927-30.

Guo JY, Chen HY, Mathew R, Fan J, Strohecker AM, Karsli-Uzunbas G, Kamphorst JJ, Chen G, Lemons JM, Karantza V, Coller HA, Dipaola RS, Gelinas C, Rabinowitz JD, White E. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. Genes Dev. 2011 Mar 1;25(5):460-70.

Gupta S, Ramjaun AR, Haiko P, Wang Y, Warne PH, Nicke B, Nye E, Stamp G, Alitalo K, Downward J. Binding of ras to phosphoinositide 3-kinase p110alpha is required for ras-driven tumorigenesis in mice. Cell. 2007 Jun 1;129(5):957-68.

Guse A, Mishima M, Glotzer M. Phosphorylation of ZEN-4/MKLP1 by aurora B regulates completion of cytokinesis. Curr Biol. 2005 Apr 26;15(8):778-86.

Gustafson LM, Gleich LL, Fukasawa K, Chadwell J, Miller MA, Stambrook PJ, Gluckman JL. Centrosome hyperamplification in head and neck squamous cell carcinoma: a potential phenotypic marker of tumor aggressiveness. Laryngoscope. 2000 Nov;110(11):1798-801.

Györffy B, Stelniec-Klotz I, Sigler C, Kasack K, Redmer T, Qian Y, Schäfer R. Effects of RAL signal transduction in KRAS- and BRAF-mutated cells and prognostic potential of the RAL signature in colorectal cancer. Oncotarget. 2015 May 30;6(15):13334-46.

Hachet V, Canard C, Gönczy P. Centrosomes promote timely mitotic entry in C. elegans embryos. Dev Cell. 2007 Apr;12(4):531-41.

Hadj-Slimane R, Pamonsinlapatham P, Herbeuval JP, Garbay C, Lepelletier Y, Raynaud F. RasV12 induces Survivin/AuroraB pathway conferring tumor cell apoptosis resistance. Cell Signal. 2010 Aug;22(8):1214-21.

Haigis KM, Kendall KR, Wang Y, Cheung A, Haigis MC, Glickman JN, Niwa-Kawakita M, Sweet-Cordero A, Sebolt-Leopold J, Shannon KM, Settleman J, Giovannini M, Jacks T. Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. Nat Genet. 2008 May;40(5):600-8.

Haklai R, Elad-Sfadia G, Egozi Y, Kloog Y. Orally administered FTS (salirasib) inhibits human pancreatic tumor growth in nude mice. Cancer Chemother Pharmacol. 2008 Jan;61(1):89-96. Epub 2007 Mar 20.

Hall A. The ras gene family. Oxf Surv Eukaryot Genes. 1984;1:111-44.

Haluska P, Dy GK, Adjei AA. Farnesyl transferase inhibitors as anticancer agents. Eur J Cancer. 2002 Sep;38(13):1685-700.

Hamidi H, Lu M, Chau K, Anderson L, Fejzo M, Ginther C, Linnartz R, Zubel A, Slamon DJ, Finn RS. KRAS mutational subtypes and copy number predict in vitro response of human pancreatic cancer cell lines to MEK inhibition. Br J Cancer. 2014 Oct 28;111(9):1788-801.

Hannak E, Kirkham M, Hyman AA, Oegema K. Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in Caenorhabditis elegans. J Cell Biol. 2001 Dec 24;155(7):1109-16.

Hannon GJ. RNA interference. Nature. 2002 Jul 11;418(6894):244-51.

Hardwicke MA, Oleykowski CA, Plant R, Wang J, Liao Q, Moss K, Newlander K, Adams JL, Dhanak D, Yang J, Lai Z, Sutton D, Patrick D. GSK1070916, a potent Aurora B/C kinase inhibitor with broad antitumor activity in tissue culture cells and human tumor xenograft models. Mol Cancer Ther. 2009 Jul;8(7):1808-17.

Hartsink-Segers SA, Zwaan CM, Exalto C, Luijendijk MW, Calvert VS, Petricoin EF, Evans WE, Reinhardt D, de Haas V, Hedtjärn M, Hansen BR, Koch T, Caron HN, Pieters R, Den Boer ML. Aurora kinases in childhood acute leukemia: the promise of aurora B as therapeutic target. Leukemia. 2013 Mar;27(3):560-8.

Harvey JJ. An unidentified virus which causes the rapid production of tumors in mice. Nature. 1964 Dec 12;204:1104-5.

Hatzivassiliou G, Haling JR, Chen H, Song K, Price S, Heald R, Hewitt JF, Zak M, Peck A, Orr C, Merchant M, Hoeflich KP, Chan J, Luoh SM, Anderson DJ, Ludlam MJ, Wiesmann C, Ultsch M, Friedman LS, Malek S, Belvin M. Mechanism of MEK inhibition determines efficacy in mutant KRAS- versus BRAF-driven cancers. Nature. 2013 Sep 12;501(7466):232-6.

Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, Brandhuber BJ, Anderson DJ, Alvarado R, Ludlam MJ, Stokoe D, Gloor SL, Vigers G, Morales T, Aliagas I, Liu B, Sideris S, Hoeflich KP, Jaiswal BS, Seshagiri S, Koeppen H, Belvin M,

Friedman LS, Malek S. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. Nature. 2010 Mar 18;464(7287):431-5.

Hauf S, Cole RW, LaTerra S, Zimmer C, Schnapp G, Walter R, Heckel A, van Meel J, Rieder CL, Peters JM. The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. J Cell Biol. 2003 Apr 28;161(2):281-94.

Hawkins PT, Eguinoa A, Qiu RG, Stokoe D, Cooke FT, Walters R, Wennström S, Claesson-Welsh L, Evans T, Symons M, et al. PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide 3-kinase. Curr Biol. 1995 Apr 1;5(4):393-403.

Hayama S, Daigo Y, Yamabuki T, Hirata D, Kato T, Miyamoto M, Ito T, Tsuchiya E, Kondo S, Nakamura Y. Phosphorylation and activation of cell division cycle associated 8 by aurora kinase B plays a significant role in human lung carcinogenesis. Cancer Res. 2007 May 1;67(9):4113-22.

He H, Zheng L, Sun YP, Zhang GW, Yue ZG. Steroidal saponins from Paris polyphylla suppress adhesion, migration and invasion of human lung cancer A549 cells via down-regulating MMP-2 and MMP-9. Asian Pac J Cancer Prev. 2014;15(24):10911-6.

He JY, Xi WH, Zhu LB, Long XH, Chen XY, Liu JM, Luo QF, Zhu XP, Liu ZL. Knockdown of Aurora-B alters osteosarcoma cell malignant phenotype via decreasing phosphorylation of VCP and NF-κB signaling. Tumour Biol. 2015 May;36(5):3895-902.

He W, Zhang MG, Wang XJ, Zhong S, Shao Y, Zhu Y, Shen ZJ. AURKA suppression induces DU145 apoptosis and sensitizes DU145 to docetaxel treatment. Am J Transl Res. 2013 Apr 19;5(3):359-67.

Heidorn SJ, Milagre C, Whittaker S, Nourry A, Niculescu-Duvas I, Dhomen N, Hussain J, Reis-Filho JS, Springer CJ, Pritchard C, Marais R. Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. Cell. 2010 Jan 22;140(2):209-21.

Heinicke T, Radziwill G, Nawrath M, Rommel C, Pavlovic J, Moelling K. Retroviral gene transfer of dominant negative raf-1 mutants suppresses ha-ras-induced transformation and delays tumor formation. Cancer Gene Ther. 2000 May;7(5):697-706.

Heldin CH. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. Cell. 1995 Jan 27;80(2):213-23.

Henning SW, Cantrell DA. GTPases in antigen receptor signalling. Curr Opin Immunol. 1998 Jun;10(3):322-9.

Herrmann C, Block C, Geisen C, Haas K, Weber C, Winde G, Möröy T, Müller O. Sulindac sulfide inhibits Ras signaling. Oncogene. 1998 Oct 8;17(14):1769-76.

Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH, Rustgi AK, Chang S, Tuveson DA. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. Cancer Cell. 2005 May;7(5):469-83.

Hirota T, Kunitoku N, Sasayama T, Marumoto T, Zhang D, Nitta M, Hatakeyama K, Saya H. Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. Cell. 2003 Sep 5;114(5):585-98.

Hirota T, Lipp JJ, Toh BH, Peters JM. Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. Nature. 2005 Dec 22;438(7071):1176-80.

Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imielinski M, Theurillat JP, Nickerson E, Auclair D, Li L, Place C, Dicara D, Ramos AH, Lawrence MS, Cibulskis K, Sivachenko A, Voet D, Saksena G, Stransky N, Onofrio RC, Winckler W, Ardlie K, Wagle N, Wargo J, Chong K, Morton DL, Stemke-Hale K, Chen G, Noble M, Meyerson M, Ladbury JE, Davies MA, Gershenwald JE, Wagner SN, Hoon DS, Schadendorf D, Lander ES, Gabriel SB, Getz G, Garraway LA, Chin L. A landscape of driver mutations in melanoma. Cell. 2012 Jul 20;150(2):251-63.

Holmlund JT, Monia BP, Kwoh TJ, Dorr FA. Toward antisense oligonucleotide therapy for cancer: ISIS compounds in clinical development. Curr Opin Mol Ther. 1999 Jun;1(3):372-85.

Holstein SA, Hohl RJ. Is there a future for prenyltransferase inhibitors in cancer therapy? Curr Opin Pharmacol. 2012 Dec;12(6):704-9.

Honda K, Mihara H, Kato Y, Yamaguchi A, Tanaka H, Yasuda H, Furukawa K, Urano T. Degradation of human Aurora2 protein kinase by the anaphase-promoting complex-ubiquitin-proteasome pathway. Oncogene. 2000 Jun 1;19(24):2812-9.

Honda R, Körner R, Nigg EA. Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis. Mol Biol Cell. 2003 Aug;14(8):3325-41.

Houghton AM. Matrix metalloproteinases in destructive lung disease. Matrix Biol. 2015 May-Jul;44-46:167-74.

Hsu JY, Sun ZW, Li X, Reuben M, Tatchell K, Bishop DK, Grushcow JM, Brame CJ, Caldwell JA, Hunt DF, Lin R, Smith MM, Allis CD. Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. Cell. 2000 Aug 4;102(3):279-91.

Hu HY, Sun H, Zou DB, Sun L, Zhang L, Jia YL. Expression of nuclear factor-kappaB in bone marrow cells from patients with acute leukemia and its relationship with P21, MMP-2 and MMP-9. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. 2003 Jun;11(3):243-5.

Huang JW, Chen CL, Chuang NN. Trap RACK1 with Ras to mobilize Src signaling at syndecan-2/p120-GAP upon transformation with oncogenic ras. Biochem Biophys Res Commun. 2005 May 20;330(4):1087-94.

Huang YF, Chang MD, Shieh SY. TTK/hMps1 mediates the p53-dependent postmitotic checkpoint by phosphorylating p53 at Thr18. Mol Cell Biol. 2009;29:2935–44.

Hunter A, Hendrikse A, Renan M, Abratt R. Does the tumor microenvironment influence radiation-induced apoptosis? Apoptosis. 2006 Oct;11(10):1727-35.

Hutterer A, Berdnik D, Wirtz-Peitz F, Zigman M, Schleiffer A, Knoblich JA. Mitotic activation of the kinase Aurora-A requires its binding partner Bora. Dev Cell. 2006 Aug;11(2):147-57.

IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Vol. 100E Personal Habits and Indoor Combustions 2012.

Ichinokawa H, Ishii G, Nagai K, Kawase A, Yoshida J, Nishimura M, Hishida T, Ogasawara N, Tsuchihara K, Ochiai A. Distinct clinicopathologic characteristics of lung mucinous adenocarcinoma with KRAS mutation. Hum Pathol. 2013 Dec;44(12):2636-42.

Imielinski M, Berger AH, Hammerman PS, Hernandez B, Pugh TJ, Hodis E, Cho J, Suh J, Capelletti M, Sivachenko A, Sougnez C, Auclair D, Lawrence MS, Stojanov P, Cibulskis K, Choi K, de Waal L, Sharifnia T, Brooks A, Greulich H, Banerji S, Zander T, Seidel D, Leenders F, Ansén S, Ludwig C, Engel-Riedel W, Stoelben E, Wolf J, Goparju C, Thompson K, Winckler W, Kwiatkowski D, Johnson BE, Jänne PA, Miller VA, Pao W, Travis WD, Pass HI, Gabriel SB, Lander ES, Thomas RK, Garraway LA, Getz G, Meyerson M. Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. Cell. 2012 Sep 14;150(6):1107-20.

Infante J, Dee EC, Cohen RB. Phase I study of the safety, phamacokinetics (PK), and pharmacodynamics (PD) of MLN8237, a selective Aurora A kinase inhibitor, in the United States. Eur J Cancer Suppl. 2008 Aug 3. 6:90-1.

Ishii N, Harada N, Joseph EW, Ohara K, Miura T, Sakamoto H, Matsuda Y, Tomii Y, Tachibana-Kondo Y, Iikura H, Aoki T, Shimma N, Arisawa M, Sowa Y, Poulikakos PI, Rosen N, Aoki Y, Sakai T. Enhanced inhibition of ERK signaling by a novel allosteric MEK inhibitor, CH5126766, that suppresses feedback reactivation of RAF activity. Cancer Res. 2013 Jul 1;73(13):4050-60.

J Cell Sci. 1998 Mar;111 (Pt 5):557-72.

Jabłońska-Trypuć A, Matejczyk M, Rosochacki S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. J Enzyme Inhib Med Chem. 2016 Mar 30:1-7.

Jackson EL, Willis N, Mercer K, Bronson RT, Crowley D, Montoya R, Jacks T, Tuveson DA. Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. Genes Dev. 2001 Dec 15;15(24):3243-8.

Jackson JH, Li JW, Buss JE, Der CJ, Cochrane CG. Polylysine domain of K-ras 4B protein is crucial for malignant transformation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Dec 20;91(26):12730-4.

Jaffee EM, Hruban RH, Canto M, Kern SE. Focus on pancreas cancer. Cancer Cell. 2002 Jul;2(1):25-8.

Jainchill JL, Aaronson SA, Todaro GJ. Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. J Virol. 1969 Nov;4(5):549-53.

Janeček M, Rossmann M, Sharma P, Emery A, Huggins DJ, Stockwell SR, Stokes JE, Tan YS, Almeida EG, Hardwick B, Narvaez AJ, Hyvönen M, Spring DR, McKenzie GJ, Venkitaraman AR. Allosteric modulation of AURKA kinase activity by a small-molecule inhibitor of its protein-protein interaction with TPX2. Sci Rep. 2016 Jun 24;6:28528.

Jasinski P, Zwolak P, Terai K, Vogel RI, Borja-Cacho D, Dudek AZ. MT477 acts in tumor cells as an AURKA inhibitor and strongly induces NRF-2 signaling. Anticancer Res. 2011 Apr;31(4):1181-7.

Jha P. Avoidable global cancer deaths and total deaths from smoking. Nat Rev Cancer. 2009 Sep;9(9):655-64.

Ji H, Ramsey MR, Hayes DN, Fan C, McNamara K, Kozlowski P, Torrice C, Wu MC, Shimamura T, Perera SA, Liang MC, Cai D, Naumov GN, Bao L, Contreras CM, Li D, Chen L, Krishnamurthy J, Koivunen J, Chirieac LR, Padera RF, Bronson RT, Lindeman NI, Christiani DC, Lin X, Shapiro GI, Jänne PA, Johnson BE,

Meyerson M, Kwiatkowski DJ, Castrillon DH, Bardeesy N, Sharpless NE, Wong KK. LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis. Nature. 2007 Aug 16;448(7155):807-10.

Jiang Z, Jiang J, Yang H, Ge Z, Wang Q, Zhang L, Wu C, Wang J. Silencing of Aurora kinase A by RNA interference inhibits tumor growth in human osteosarcoma cells by inducing apoptosis and G2/M cell cycle arrest. Oncol Rep. 2014 Mar;31(3):1249-54.

Jin S, Wang X, Tong T, Zhang D, Shi J, Chen J, Zhan Q. Aurora-A enhances malignant development of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) by phosphorylating β-catenin. Mol Oncol. 2015 Jan;9(1):249-59.

Jingyan F, Angenendt P. Allosteric modulation of AURKA kinase activity by a small-molecule inhibitor of its protein-protein interaction with TPX2. Sci Rep. 2013. Jun 24;6:28528.

Johnson BE, Heymach JV. Farnesyl transferase inhibitors for patients with lung cancer. Clin Cancer Res. 2004 Jun 15;10(12 Pt 2):4254s-4257s.

Johnson EO, Chang KH, Ghosh S, Venkatesh C, Giger K, Low PS, Shah K. LIMK2 is a crucial regulator and effector of Aurora-A-kinase-mediated malignancy. J Cell Sci. 2012 Mar 1;125(Pt 5):1204-16.

Johnson LM, James KM, Chamberlain MD, Anderson DH. Identification of key residues in the A-Raf kinase important for phosphoinositide lipid binding specificity. Biochemistry. 2005 Mar 8;44(9):3432-40.

Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Kamiyama H, Jimeno A, Hong SM, Fu B, Lin MT, Calhoun ES, Kamiyama M, Walter K, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Hartigan J, Smith DR, Hidalgo M, Leach SD, Klein AP, Jaffee EM, Goggins M, Maitra A, Iacobuzio-Donahue C, Eshleman JR, Kern SE, Hruban RH, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. Science. 2008 Sep 26;321(5897):1801-6.

Jung CK, Jung JH, Lee KY, Kang CS, Kim M, Ko YH, Oh CS. Centrosome abnormalities in non-small cell lung cancer: correlations with DNA aneuploidy and expression of cell cycle regulatory proteins. Pathol Res Pract. 2007;203(12):839-47.

Kan Z, Jaiswal BS, Stinson J, Janakiraman V, Bhatt D, Stern HM, Yue P, Haverty PM, Bourgon R, Zheng J, Moorhead M, Chaudhuri S, Tomsho LP, Peters BA, Pujara K, Cordes S, Davis DP, Carlton VE, Yuan W, Li L, Wang W, Eigenbrot C, Kaminker JS, Eberhard DA, Waring P, Schuster SC, Modrusan Z, Zhang Z, Stokoe D, de Sauvage FJ, Faham M, Seshagiri S. Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. Nature. 2010 Aug 12;466(7308):869-73.

Kanda A, Kawai H, Suto S, Kitajima S, Sato S, Takata T, Tatsuka M. Aurora-B/AIM-1 kinase activity is involved in Ras-mediated cell transformation. Oncogene. 2005 Nov 10;24(49):7266-72.

Kanki Y, Kohro T, Jiang S, et al. Epigenetically coordinated GATA2 binding is necessary for endothelium-specific endomucin expression. The EMBO Journal. 2011;30(13):2582-2595.

Karaguni IM, Glüsenkamp KH, Langerak A, Geisen C, Ullrich V, Winde G, Möröy T, Müller O. New indene-derivatives with anti-proliferative properties. Bioorg Med Chem Lett. 2002 Feb 25;12(4):709-13.

Karaguni IM, Herter P, Debruyne P, Chtarbova S, Kasprzynski A, Herbrand U, Ahmadian MR, Glüsenkamp KH, Winde G, Mareel M, Möröy T, Müller O. The new sulindac derivative IND 12 reverses Ras-induced cell transformation. Cancer Res. 2002 Mar 15;62(6):1718-23.

Kashatus DF. Ral GTPases in tumorigenesis: emerging from the shadows. Exp Cell Res. 2013 Sep 10;319(15):2337-42.

Katayama H, Ota T, Jisaki F, Ueda Y, Tanaka T, Odashima S, Suzuki F, Terada Y, Tatsuka M. Mitotic kinase expression and colorectal cancer progression. J Natl Cancer Inst. 1999 Jul 7;91(13):1160-2.

Katayama H, Zhou H, Li Q, Tatsuka M, Sen S. Interaction and feedback regulation between STK15/BTAK/Aurora-A kinase and protein phosphatase 1 through mitotic cell division cycle. J Biol Chem. 2001 Dec 7;276(49):46219-24.

Katayama R, Shaw AT, Khan TM, Mino-Kenudson M, Solomon BJ, Halmos B, Jessop NA, Wain JC, Yeo AT, Benes C, Drew L, Saeh JC, Crosby K, Sequist LV, Iafrate AJ, Engelman JA. Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung Cancers. Sci Transl Med. 2012 Feb 8;4(120):120ra17.

Kato K, Cox AD, Hisaka MM, Graham SM, Buss JE, Der CJ. Isoprenoid addition to Ras protein is the critical modification for its membrane association and transforming activity. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Jul 15;89(14):6403-7.

Katsha A, Soutto M, Sehdev V, Peng D, Washington MK, Piazuelo MB, Tantawy MN, Manning HC, Lu P, Shyr Y, Ecsedy J, Belkhiri A, El-Rifai W. Aurora kinase A promotes inflammation and tumorigenesis in mice and human gastric neoplasia. Gastroenterology. 2013 Dec;145(6):1312-22.e1-8.

Kauffmann-Zeh A, Rodriguez-Viciana P, Ulrich E, Gilbert C, Coffer P, Downward J, Evan G. Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. Nature. 1997 Feb 6;385(6616):544-8.

Kawajiri A, Yasui Y, Goto H, Tatsuka M, Takahashi M, Nagata K, Inagaki M. Functional significance of the specific sites phosphorylated in desmin at cleavage furrow: Aurora-B may phosphorylate and regulate type III intermediate filaments during cytokinesis coordinatedly with Rho-kinase. Mol Biol Cell. 2003 Apr;14(4):1489-500.

Keen N, Taylor S. Mitotic drivers--inhibitors of the Aurora B Kinase. Cancer Metastasis Rev. 2009 Jun;28(1-2):185-95.

Kent OA, Mendell JT, Rottapel R. Transcriptional Regulation of miR-31 by Oncogenic KRAS Mediates Metastatic Phenotypes by Repressing RASA1. Mol Cancer Res. 2016 Mar;14(3):267-77.

Kim IM, Ackerson T, Ramakrishna S, Tretiakova M, Wang IC, Kalin TV, Major ML, Gusarova GA, Yoder HM, Costa RH, Kalinichenko VV. The Forkhead Box m1 transcription factor stimulates the proliferation of tumor cells during development of lung cancer. Cancer Res. 2006 Feb 15;66(4):2153-61.

Kim J-Y, Welsh EA, Oguz U, et al. Dissection of TBK1 signaling via phosphoproteomics in lung cancer cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2013;110(30):12414-12419.

Kim SA, Inamura K, Yamauchi M, Nishihara R, Mima K, Sukawa Y, Li T, Yasunari M, Morikawa T, Fitzgerald KC, Fuchs CS, Wu K, Chan AT, Zhang X, Ogino S, Qian ZR. Loss of CDH1 (E-cadherin) expression is associated with infiltrative tumour growth and lymph node metastasis. Br J Cancer. 2016 Jan 19;114(2):199-206.

Kimura M, Matsuda Y, Yoshioka T, Okano Y. Cell cycle-dependent expression and centrosome localization of a third human aurora/Ipl1-related protein kinase, AIK3. J Biol Chem. 1999 Mar 12;274(11):7334-40.

Kimura M, Matsuda Y, Yoshioka T, Sumi N, Okano Y. Identification and characterization of STK12/Aik2: a human gene related to aurora of Drosophila and yeast IPL1. Cytogenet Cell Genet. 1998;82(3-4):147-52.

Kinbara K, Goldfinger LE, Hansen M, Chou FL, Ginsberg MH. Ras GTPases: integrins' friends or foes? Nat Rev Mol Cell Biol. 2003 Oct;4(10):767-76.

Kinoshita K, Noetzel TL, Pelletier L, Mechtler K, Drechsel DN, Schwager A, Lee M, Raff JW, Hyman AA. Aurora A phosphorylation of TACC3/maskin is required for centrosome-dependent microtubule assembly in mitosis. J Cell Biol. 2005 Sep 26;170(7):1047-55.

Kirsten WH, Schauf V, McCoy J. Properties of a murine sarcoma virus. Bibl Haematol. 1970;(36):246-9.

Kollareddy M, Dzubak P, Zheleva D, Hajduch M. Aurora kinases: structure, functions and their association with cancer. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2008 Jun;152(1):27-33.

Konstantinidou G, Ramadori G, Torti F, Kangasniemi K, Ramirez RE, Cai Y, Behrens C, Dellinger MT, Brekken RA, Wistuba II, Heguy A, Teruya-Feldstein J, Scaglioni PP. RHOA-FAK is a required signaling axis for the maintenance of KRAS-driven lung adenocarcinomas. Cancer Discov. 2013 Apr;3(4):444-57.

Kops GJ, Weaver BA, Cleveland DW. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. Nat Rev Cancer. 2005 Oct;5(10):773-85.

Kosik A, Bekier ME, Katusin JD, Kaur H, Zhou X, Diakonova M, Chadee DN, Taylor WR. Investigating the role of Aurora kinases in RAS signaling. J Cell Biochem. 2009 Jan 1;106(1):33-41.

Krämer A, Neben K, Ho AD. Centrosome replication, genomic instability and cancer. Leukemia. 2002 May;16(5):767-75.

Kranenburg O, Gebbink MF, Voest EE. Stimulation of angiogenesis by Ras proteins. Biochim Biophys Acta. 2004 Mar 4;1654(1):23-37.

Krantz SB, Shields MA, Dangi-Garimella S, Cheon EC, Barron MR, Hwang RF, Rao MS, Grippo PJ, Bentrem DJ, Munshi HG. MT1-MMP cooperates with Kras(G12D) to promote pancreatic fibrosis through increased TGF-β signaling. Mol Cancer Res. 2011 Oct;9(10):1294-304.

Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, Evans P, Bacchiocchi A, McCusker JP, Cheng E, Davis MJ, Goh G, Choi M, Ariyan S, Narayan D, Dutton-Regester K, Capatana A, Holman EC, Bosenberg M, Sznol M, Kluger HM, Brash DE, Stern DF, Materin MA, Lo RS, Mane S, Ma S, Kidd KK, Hayward NK, Lifton RP, Schlessinger J, Boggon TJ, Halaban R. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. Nat Genet. 2012 Sep;44(9):1006-14.

Kressner U, Bjørheim J, Westring S, Wahlberg SS, Påhlman L, Glimelius B, Lindmark G, Lindblom A, Børresen-Dale AL. Ki-ras mutations and prognosis in colorectal cancer. Eur J Cancer. 1998 Mar;34(4):518-21.

Kufer TA, Silljé HH, Körner R, Gruss OJ, Meraldi P, Nigg EA. Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle. J Cell Biol. 2002 Aug 19;158(4):617-23.

Kumar MS, Hancock DC, Molina-Arcas M, Steckel M, East P, Diefenbacher M, Armenteros-Monterroso E, Lassailly F, Matthews N, Nye E, Stamp G, Behrens A, Downward J. The GATA2 transcriptional network is requisite for RAS oncogene-driven non-small cell lung cancer. Cell. 2012 Apr 27;149(3):642-55.

Kunitoku N, Sasayama T, Marumoto T, Zhang D, Honda S, Kobayashi O, Hatakeyama K, Ushio Y, Saya H, Hirota T. CENP-A phosphorylation by Aurora-A in prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function. Dev Cell. 2003 Dec;5(6):853-64.

Kwong LN, Costello JC, Liu H, Jiang S, Helms TL, Langsdorf AE, Jakubosky D, Genovese G, Muller FL, Jeong JH, Bender RP, Chu GC, Flaherty KT, Wargo JA, Collins JJ, Chin L. Oncogenic NRAS signaling differentially regulates survival and proliferation in melanoma. Nat Med. 2012 Oct;18(10):1503-10.

Laheru D, Shah P, Rajeshkumar NV, McAllister F, Taylor G, Goldsweig H, Le DT, Donehower R, Jimeno A, Linden S, Zhao M, Song D, Rudek MA, Hidalgo M. Integrated preclinical and clinical development of S-trans, trans-Farnesylthiosalicylic Acid (FTS, Salirasib) in pancreatic cancer. Invest New Drugs. 2012 Dec;30(6):2391-9.

Lam WK, White NW, Chan-Yeung MM. Lung cancer epidemiology and risk factors in Asia and Africa. Int J Tuberc Lung Dis. 2004 Sep;8(9):1045-57.

Lan W, Zhang X, Kline-Smith SL, Rosasco SE, Barrett-Wilt GA, Shabanowitz J, Hunt DF, Walczak CE, Stukenberg PT. Aurora B phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity. Curr Biol. 2004 Feb 17;14(4):273-86.

Land H, Parada LF, Weinberg RA. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. Nature. 1983 Aug 18-24;304(5927):596-602.

Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS, Sougnez C, Stewart C, Sivachenko A, Wang L, Wan Y, Zhang W, Shukla SA, Vartanov A, Fernandes SM, Saksena G, Cibulskis K, Tesar B, Gabriel S, Hacohen N, Meyerson M, Lander ES, Neuberg D, Brown JR, Getz G, Wu CJ. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. Cell. 2013 Feb 14;152(4):714-26.

Landen CN Jr, Lin YG, Immaneni A, Deavers MT, Merritt WM, Spannuth WA, Bodurka DC, Gershenson DM, Brinkley WR, Sood AK. Overexpression of the centrosomal protein Aurora-A kinase is associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients. Clin Cancer Res. 2007 Jul 15;13(14):4098-104.

Lara-Gonzalez P, Westhorpe FG, Taylor SS. The spindle assembly checkpoint. Curr Biol. 2012 Nov 20;22(22):R966-80.

Lau HY, Ramanujulu PM, Guo D, Yang T, Wirawan M, Casey PJ, Go ML, Wang M. An improved isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase inhibitor induces cancer cell death and attenuates tumor growth in vivo. Cancer Biol Ther. 2014 Sep;15(9):1280-91.

Le Moulec S, Loriot Y, Soria JC. Targeting KRAS pathway in NSCLC therapy. Bull Cancer. 2009 Dec;96 Suppl:S69-74.

Ledwith BJ, Manam S, Kraynak AR, Nichols WW, Bradley MO. Antisense-fos RNA causes partial reversion of the transformed phenotypes induced by the c-Ha-ras oncogene. Mol Cell Biol. 1990 Apr;10(4):1545-55.

Lee E, Keam B, Kim DW, Kim TM, Lee SH, Chung DH, Heo DS. Erlotinib versus gefitinib for control of leptomeningeal carcinomatosis in non-small-cell lung cancer. J Thorac Oncol. 2013 Aug;8(8):1069-74.

Lee MJ, Gergely F, Jeffers K, Peak-Chew SY, Raff JW. Msps/XMAP215 interacts with the centrosomal protein D-TACC to regulate microtubule behaviour. Nat Cell Biol. 2001 Jul;3(7):643-9.

Lee MM, Chen YY, Liu PY, Hsu S, Sheu MJ. Pipoxolan inhibits CL1-5 lung cancer cells migration and invasion through inhibition of MMP-9 and MMP-2. Chem Biol Interact. 2015 Jul 5;236:19-30.

Lee SY, Kim EY, Kim KH, Lee KA. Bcl2l10, a new Tpx2 binding partner, is a master regulator of Aurora kinase A in mouse oocytes. Cell Cycle. 2016 Oct 18:1-10.

Lemaître V, D'Armiento J. Matrix metalloproteinases in development and disease. Birth Defects Res C Embryo Today. 2006 Mar;78(1):1-10.

Lemieux E, Cagnol S, Beaudry K, Carrier J, Rivard N. Oncogenic KRAS signalling promotes the Wnt/β-catenin pathway through LRP6 in colorectal cancer. Oncogene. 2015 Sep 17;34(38):4914-27.

Leung LS, Neal JW, Wakelee HA, Sequist LV, Marmor MF. Rapid Onset of Retinal Toxicity From High-Dose Hydroxychloroquine Given for Cancer Therapy. Am J Ophthalmol. 2015 Oct;160(4):799-805.e1.

Li D, Zhu J, Firozi PF, Abbruzzese JL, Evans DB, Cleary K, Friess H, Sen S. Overexpression of oncogenic STK15/BTAK/Aurora A kinase in human pancreatic cancer. Clin Cancer Res. 2003 Mar;9(3):991-7.

Li H, Yang AL, Chung YT, Zhang W, Liao J, Yang GY. Sulindac inhibits pancreatic carcinogenesis in LSL-KrasG12D-LSL-Trp53R172H-Pdx-1-Cre mice via suppressing aldo-keto reductase family 1B10 (AKR1B10). Carcinogenesis. 2013 Sep;34(9):2090-8.

Li M, Fang X, Baker DJ, Guo L, Gao X, Wei Z, et al. The ATM-p53 pathway suppresses aneuploidy-induced tumorigenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107:14188–93.

Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? Trends Biochem Sci. 2016 Jan 5. pii: S0968-0004(15)00241-8.

Liebmann C. Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. Cell Signal. 2001 Nov;13(11):777-85.

Lim KH, Baines AT, Fiordalisi JJ, Shipitsin M, Feig LA, Cox AD, Der CJ, Counter CM. Activation of RalA is critical for Ras-induced tumorigenesis of human cells. Cancer Cell. 2005 Jun;7(6):533-45.

Lim KH, Brady DC, Kashatus DF, Ancrille BB, Der CJ, Cox AD, Counter CM. Aurora-A phosphorylates, activates, and relocalizes the small GTPase RalA. Mol Cell Biol. 2010 Jan;30(2):508-23

Lim KH, Counter CM. Reduction in the requirement of oncogenic Ras signaling to activation of PI3K/AKT pathway during tumor maintenance. Cancer Cell. 2005 Nov;8(5):381-92.

Lin DM, Ma Y, Xiao T, Guo SP, Han NJ, Su K, Yi SZ, Fang J, Cheng SJ, Gao YN. TPX2 expression and its significance in squamous cell carcinoma of lung. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi. 2006 Sep;35(9):540-4.

Lin YS, Su LJ, Yu CT, Wong FH, Yeh HH, Chen SL, Wu JC, Lin WJ, Shiue YL, Liu HS, Hsu SL, Lai JM, Huang CY. Gene expression profiles of the aurora family kinases. Gene Expr. 2006;13(1):15-26.

Lin Z, Zhang C, Zhang M, Xu D, Fang Y, Zhou Z, Chen X, Qin N, Zhang X. Targeting cadherin-17 inactivates Ras/Raf/MEK/ERK signaling and inhibits cell proliferation in gastric cancer. PLoS One. 2014 Jan 20;9(1):e85296.

Lindqvist A, Källström H, Lundgren A, Barsoum E, Rosenthal CK. Cdc25B cooperates with Cdc25A to induce mitosis but has a unique role in activating cyclin B1-Cdk1 at the centrosome. J Cell Biol. 2005 Oct 10;171(1):35-45.

Lindqvist A, Rodríguez-Bravo V, Medema RH. The decision to entter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic network. J Cell Biol. 2009 Apr 20;185(2):193-202.

Lingle WL, Lutz WH, Ingle JN, Maihle NJ, Salisbury JL. Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implications for genomic stability and cell polarity. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Mar 17;95(6):2950-5.

Lingle WL, Salisbury JL. Altered centrosome structure is associated with abnormal mitoses in human breast tumors. Am J Pathol. 1999 Dec;155(6):1941-51.

Lito P, Rosen N, Solit DB. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. Nat Med. 2013 Nov;19(11):1401-9.

Liu HC, Zhang GH, Liu YH, Wang P, Ma JF, Su LS, Li SL, Zhang L, Liu JW. TPX2 siRNA regulates growth and invasion of esophageal cancer cells. Biomed Pharmacother. 2014 Sep;68(7):833-9.

Liu J, Ji S, Liang C, Qin Y, Jin K, Liang D, Xu W, Shi S, Zhang B, Liu L, Liu C, Xu J, Ni Q, Yu X. Critical role of oncogenic KRAS in pancreatic cancer (Review). Mol Med Rep. 2016 Jun;13(6):943-9.

Liu Q, Ruderman JV. Aurora A, mitotic entry, and spindle bipolarity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Apr 11;103(15):5811-6.

Liu X, Li Z, Song Y, Wang R, Han L, Wang Q, Jiang K, Kang C, Zhang Q. AURKA induces EMT by regulating histone modification through Wnt/β-catenin and PI3K/Akt signaling pathway in gastric cancer. Oncotarget. 2016 Apr 21.

Liu X. PARP inhibition as a prototype for synthetic lethal screens. Methods Mol Biol. 2013;986:123-37.

Liu XE, Sun XD. Inhibiting K-ras signaling reserves the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells and its mechanisms. Hepatogastroenterology. 2013 Jul-Aug;60(125):1169-73.

Liu Y, Hawkins OE, Su Y, Vilgelm AE, Sobolik T, Thu YM, Kantrow S, Splittgerber RC, Short S, Amiri KI, Ecsedy JA, Sosman JA, Kelley MC, Richmond A. Targeting aurora kinases limits tumour growth through DNA damage-mediated senescence and blockade of NF-κB impairs this drug-induced senescence. EMBO Mol Med. 2013 Jan;5(1):149-66.

Lobell RB, Liu D, Buser CA, Davide JP, DePuy E, Hamilton K, Koblan KS, Lee Y, Mosser S, Motzel SL, Abbruzzese JL, Fuchs CS, Rowinsky EK, Rubin EH, Sharma S, Deutsch PJ, Mazina KE, Morrison BW, Wildonger L, Yao SL, Kohl NE. Preclinical and clinical pharmacodynamic assessment of L-778,123, a dual inhibitor of farnesyl:protein transferase and geranylgeranyl:protein transferase type-I. Mol Cancer Ther. 2002 Jul;1(9):747-58.

Lock R, Roy S, Kenific CM, Su JS, Salas E, Ronen SM, Debnath J. Autophagy facilitates glycolysis during Ras-mediated oncogenic transformation. Mol Biol Cell. 2011 Jan 15;22(2):165-78.

Lohr JG, Stojanov P, Carter SL, Cruz-Gordillo P, Lawrence MS, Auclair D, Sougnez C, Knoechel B, Gould J, Saksena G, Cibulskis K, McKenna A, Chapman MA, Straussman R, Levy J, Perkins LM, Keats JJ, Schumacher SE, Rosenberg M; Multiple Myeloma Research Consortium, Getz G, Golub TR.

Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. Cancer Cell. 2014 Jan 13;25(1):91-101.

Loirand G, Sauzeau V, Pacaud P. Small G proteins in the cardiovascular system: physiological and pathological aspects. Physiol Rev. 2013 Oct;93(4):1659-720.

Lord RV, Brabender J, Gandara D, Alberola V, Camps C, Domine M, Cardenal F, Sánchez JM, Gumerlock PH, Tarón M, Sánchez JJ, Danenberg KD, Danenberg PV, Rosell R. Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 2002 Jul;8(7):2286-91.

Lowenberg B, Muss P, Ossenkoppele G, Rousselot P, Cahn JY, Ifrah N, Martinelli G. Phase I/II study to access safety, efficacy, and phamacokinetics of barasertib (AZD1152) in patients with advanced acute myeloid leukemia. Blood. 2011 Oct 1. 118:6030-36.

Lu Y, Liu Y, Jiang J, Xi Z, Zhong, N, Shi S, Wang J, Wei X. Knocking down the expression of Aurora-A gene inhibits cell proliferation and induces G2/M phase arrest in human small cell lung cancer cells. Oncol Rep. 2014 Jul;32(1):243-9.

Lundberg AS, Randell SH, Stewart SA, Elenbaas B, Hartwell KA, Brooks MW, Fleming MD, Olsen JC, Miller SW, Weinberg RA, Hahn WC. Immortalization and transformation of primary human airway epithelial cells by gene transfer. Oncogene. 2002 Jul 4;21(29):4577-86.

Lv J, Wang J, Chang S, Liu M, Pang X. The greedy nature of mutant RAS: a boon for drug discovery targeting cancer metabolism? Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2016 Jan;48(1):17-26.

Ma Y, Cao H, Lou S, Shao X, Lv W, Qi X, Liu Y, Ying M, He Q, Yang X. Sequential treatment with Aurora B inhibitors enhances cisplatin-mediated apoptosis via c-Myc. J Mol Med (Berl). 2015 Apr;93(4):427-38.

Ma Y, Lin D, Sun W, Xiao T, Yuan J, Han N, Guo S, Feng X, Su K, Mao Y, Cheng S, Gao Y. Expression of targeting protein for xklp2 associated with both malignant transformation of respiratory epithelium and progression of squamous cell lung cancer. Clin Cancer Res. 2006 Feb 15;12(4):1121-7.

Ma YX, Li XZ. Effect of aurora kinase B inhibitor AZD1152 in the treatment of cisplatin-resistant ovarian carcinoma. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. 2013 Jan;48(1):46-50.

Ma Z, Qiu X, Wang D, Li Y, Zhang B, Yuan T, Wei J, Zhao B, Zhao X, Lou J, Jin Y, Jin Y. MiR-181a-5p inhibits cell proliferation and migration by targeting Kras in non-small cell lung cancer A549 cells. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2015 Aug;47(8):630-8.

Macias-Perez I, Borza C, Chen X, Yan X, Ibanez R, Mernaugh G, Matrisian LM, Zent R, Pozzi A. Loss of integrin alpha1beta1 ameliorates Kras-induced lung cancer. Cancer Res. 2008 Aug 1;68(15):6127-35.

Macůrek L, Lindqvist A, Lim D, Lampson MA, Klompmaker R, Freire R, Clouin C, Taylor SS, Yaffe MB, Medema RH. Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. Nature. 2008 Sep 4;455(7209):119-23.

Maekawa M, Nishida E, Tanoue T. Identification of the Anti-proliferative protein Tob as a MAPK substrate. J Biol Chem. 2002 Oct 4;277(40):37783-7.

Mahankali M, Henkels KM, Speranza F, Gomez-Cambronero J. A non-mitotic role for Aurora kianse A as direct activator of cell migration upon interaction with PLD, FAK and Src. J Cell Sci. 2015 Feb 1;128(3):516-26.

Maimaiti Y, Jie T, Jing Z, Changwen W, Pan Y, Chen C, Tao H. Aurora kinase A induces papillary thyroid cancer lymph node metastasis by promoting cofilin-1 activity. Biochem Biophys Res Commun. 2016 Apr 22;473(1):212-8.

Majem M, Pallarès C. An update on molecularly targeted therapies in second- and third-line treatment in non-small cell lung cancer: focus on EGFR inhibitors and anti-angiogenic agents. Clin Transl Oncol. 2013 May;15(5):343-57.

Majmudar JD, Hodges-Loaiza HB, Hahne K, Donelson JL, Song J, Shrestha L, Harrison ML, Hrycyna CA, Gibbs RA. Amide-modified prenylcysteine based Icmt inhibitors: Structure-activity relationships, kinetic analysis and cellular characterization. Bioorg Med Chem. 2012 Jan 1;20(1):283-95.

Male H, Patel V, Jacob MA, Borrego-Diaz E, Wang K, Young DA, Wise AL, Huang C, Van Veldhuizen P, O'Brien-Ladner A, Williamson SK, Taylor SA, Tawfik O, Esfandyari T, Farassati F. Inhibition of RalA signaling pathway in treatment of non-small cell lung cancer. Lung Cancer. 2012 Aug;77(2):252-9.

Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. Nat Rev Cancer. 2003 Jun;3(6):459-65.

Malvezzi M, Bosetti C, Rosso T, Bertuccio P, Chatenoud L, Levi F, Romano C, Negri E, La Vecchia C. Lung cancer mortality in European men: trends and predictions. Lung Cancer. 2013 May;80(2):138-45.

Manandhar SP, Hildebrandt ER, Schmidt WK. Small-molecule inhibitors of the Rce1p CaaX protease. J Biomol Screen. 2007 Oct;12(7):983-93.

Mandrioli D, Belpoggi F, Silbergeld EK, Perry MJ. Aneuploidy: a common and early evidence-based biomarker for carcinogens and reproductive toxicants. Environ Health. 2016 Oct 12;15(1):97.

Manfredi MG, Ecsedy JA, Chakravarty A, Silverman L, Zhang M, Hoar KM, Stroud SG, Chen W, Shinde V, Huck JJ, Wysong DR, Janowick DA, Hyer ML, Leroy PJ, Gershman RE, Silva MD, Germanos MS, Bolen JB, Claiborne CF, Sells TB. Characterization of Alisertib (MLN8237), an investigational small-molecule inhibitor of aurora A kinase using novel in vivo pharmacodynamic assays. Clin Cancer Res. 2011 Dec 15;17(24):7614-24.

Manfredi MG, Ecsedy JA, Meetze KA, Balani SK, Burenkova O, Chen W, Galvin KM, Hoar KM, Huck JJ, LeRoy PJ, Ray ET, Sells TB, Stringer B, Stroud SG, Vos TJ, Weatherhead GS, Wysong DR, Zhang M, Bolen JB, Claiborne CF. Antitumor activity of MLN8054, an orally active small-molecule inhibitor of Aurora A kinase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Mar 6;104(10):4106-11.

Marais R, Light Y, Paterson HF, Marshall CJ. Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. EMBO J. 1995 Jul 3;14(13):3136-45.

Marampon F, Gravina GL, Popov VM, Scarsella L, Festuccia C, La Verghetta ME, Parente S, Cerasani M, Bruera G, Ficorella C, Ricevuto E, Tombolini V, Di Cesare E, Zani BM. Close correlation between MEK/ERK and Aurora-B signaling pathways in sustaining tumorigenic potential and radioresistance of gynecological cancer cell lines. Int J Oncol. 2014 Jan;44(1):285-94.

Margarit SM, Sondermann H, Hall BE, Nagar B, Hoelz A, Pirruccello M, Bar-Sagi D, Kuriyan J. Structural evidence for feedback activation by Ras.GTP of the Ras-specific nucleotide exchange factor SOS. Cell. 2003 Mar 7;112(5):685-95.

Marumoto T, Hirota T, Morisaki T, Kunitoku N, Zhang D, Ichikawa Y, Sasayama T, Kuninaka S, Mimori T, Tamaki N, Kimura M, Okano Y, Saya H. Roles of aurora-A kinase in mitotic entry and G2 checkpoint in mammalian cells. Genes Cells. 2002 Nov;7(11):1173-82.

Marumoto T, Honda S, Hara T, Nitta M, Hirota T, Kohmura E, Saya H. Aurora-A kinase maintains the fidelity of early and late mitotic events in HeLa cells. J Biol Chem. 2003 Dec 19;278(51):51786-95.

Mascaux C, Iannino N, Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Dusart M, Haller A, Lothaire P, Meert AP, Noel S, Lafitte JJ, Sculier JP. The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. Br J Cancer. 2005 Jan 17;92(1):131-9.

Massacesi C, Di Tomaso E, Urban P, Germa C, Quadt C, Trandafir L, Aimone P, Fretault N, Dharan B, Tavorath R, Hirawat S. PI3K inhibitors as new cancer therapeutics: implications for clinical trial design. Onco Targets Ther. 2016 Jan 7;9:203-10.

Mattingly RR, Sorisky A, Brann MR, Macara IG. Muscarinic receptors transform NIH 3T3 cells through a Ras-dependent signalling pathway inhibited by the Ras-GTPase-activating protein SH3 domain. Mol Cell Biol. 1994 Dec;14(12):7943-52.

Maurer T, Garrenton LS, Oh A, Pitts K, Anderson DJ, Skelton NJ, Fauber BP, Pan B, Malek S, Stokoe D, Ludlam MJ, Bowman KK, Wu J, Giannetti AM, Starovasnik MA, Mellman I, Jackson PK, Rudolph J, Wang W, Fang G. Small-molecule ligands bind to a distinct pocket in Ras and inhibit SOS-mediated nucleotide exchange activity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Apr 3;109(14):5299-304.

McCleland ML, Adler AS, Deming L, Cosino E, Lee L, Blackwood EM, Solon M, Tao J, Li L, Shames D, Jackson E, Forrest WF, Firestein R. Lactate dehydrogenase B is required for the growth of KRAS-dependent lung adenocarcinomas. Clin Cancer Res. 2013 Feb 15;19(4):773-84.

Meraldi P, Honda R, Nigg EA. Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53-/- cells. EMBO J. 2002 Feb 15;21(4):483-92.

Meraldi P, Nigg EA. The centrosome cycle. FEBS Lett. 2002 Jun 19;521(1-3):9-13.

Minoshima Y, Kawashima T, Hirose K, Tonozuka Y, Kawajiri A, Bao YC, Deng X, Tatsuka M, Narumiya S, May WS Jr, Nosaka T, Semba K, Inoue T, Satoh T, Inagaki M, Kitamura T. Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis. Dev Cell. 2003 Apr;4(4):549-60.

Mitsuuchi Y, Testa JR. Cytogenetics and molecular genetics of lung cancer. Am J Med Genet. 2002 Oct 30;115(3):183-8.

Miura Y, Ohnami S, Yoshida K, Ohashi M, Nakano M, Ohnami S, Fukuhara M, Yanagi K, Matsushita A, Uchida E, Asaka M, Yoshida T, Aoki K. Intraperitoneal injection of adenovirus expressing antisense K-ras RNA suppresses peritoneal dissemination of hamster syngeneic pancreatic cancer without systemic toxicity. Cancer Lett. 2005 Jan 31;218(1):53-62.

Mobahat M, Narendran A, Riabowol K. Survivin as a Preferential Target for Cancer Therapy. International Journal of Molecular Sciences. 2014;15(2):2494-2516.

Moerkerk P, Arends JW, van Driel M, de Bruïne A, de Goeij A, ten Kate J. Type and number of Ki-ras point mutations relate to stage of human colorectal cancer. Cancer Res. 1994 Jul 1;54(13):3376-8.

Mohammed I, Hampton SE, Ashall L, Hildebrandt ER, Kutlik RA, Manandhar SP, Floyd BJ, Smith HE, Dozier JK, Distefano MD, Schmidt WK, Dore TM. 8-Hydroxyquinoline-based inhibitors of the Rce1 protease disrupt Ras membrane localization in human cells. Bioorg Med Chem. 2016 Jan 15;24(2):160-78.

Moores SL, Schaber MD, Mosser SD, Rands E, O'Hara MB, Garsky VM, Marshall MS, Pompliano DL, Gibbs JB. Sequence dependence of protein isoprenylation. J Biol Chem. 1991 Aug 5;266(22):14603-10.

Morabito A, Costanzo R, Rachiglio AM, Pasquale R, Sandomenico C, Franco R, Montanino A, De Lutio E, Rocco G, Normanno N. Activity of gefitinib in a non-small-cell lung cancer patient with both activating and resistance EGFR mutations. J Thorac Oncol. 2013 Jul;8(7):e59-60.

Morgan-Lappe SE, Tucker LA, Huang X, Zhang Q, Sarthy AV, Zakula D, Vernetti L, Schurdak M, Wang J, Fesik SW. Identification of Ras-related nuclear protein, targeting protein for xenopus kinesin-like protein 2, and stearoyl-CoA desaturase 1 as promising cancer targets from an RNAi-based screen. Cancer Res. 2007 May 1;67(9):4390-8.

Morioka S, Broglie P, Omori E, et al. TAK1 kinase switches cell fate from apoptosis to necrosis following TNF stimulation. The Journal of Cell Biology. 2014;204(4):607-623.

Morrow CJ, Tighe A, Johnson VL, Scott MI, Ditchfield C, Taylor SS. Bub1 and aurora B cooperate to maintain BubR1-mediated inhibition of APC/CCdc20. J Cell Sci. 2005 Aug 15;118(Pt 16):3639-52.

Mortazavi F, Lu J, Phan R, Lewis M, Trinidad K, Aljilani A, Pezeshkpour G, Tamanoi F. Significance of KRAS/PAK1/Crk pathway in non-small cell lung cancer oncogenesis. BMC Cancer. 2015 May 9;15:381.

Murata-Hori M, Wang YL. The kinase activity of aurora B is required for kinetochore-microtubule interactions during mitosis. Curr Biol. 2002 Jun 4;12(11):894-9.

Neel NF, Martin TD, Stratford JK, Zand TP, Reiner DJ, Der CJ. The RalGEF-Ral Effector Signaling Network: The Road Less Traveled for Anti-Ras Drug Discovery. Genes Cancer. 2011 Mar;2(3):275-87.

Newbold R. Cancer: mutant ras proteins and cell transformation. Nature. 1984 Aug 23-29;310(5979):628-9.

Ngalame NN, Tokar EJ, Person RJ, Waalkes MP. Silencing KRAS overexpression in arsenic-transformed prostate epithelial and stem cells partially mitigates malignant phenotype. Toxicol Sci. 2014 Dec;142(2):489-96.

Nguyen HG, Chinnappan D, Urano T, Ravid K. Mechanism of Aurora-B degradation and its dependency on intact KEN and A-boxes: identification of an aneuploidy-promoting property. Mol Cell Biol. 2005 Jun;25(12):4977-92.

Nigg EA. Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? Nat Rev Cancer. 2002 Nov;2(11):815-25.

Nigg EA. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001 Jan;2(1):21-32.

Nikonova AS, Astsaturov I, Serebriiskii IG, Dunbrack RL Jr, Golemis EA. Aurora A kinase (AURKA) in normal and pathological cell division. Cell Mol Life Sci. 2013 Feb;70(4):661-87.

Nitta M, Tsuiki H, Arima Y, Harada K, Nishizaki T, Sasaki K, Mimori T, Ushio Y, Saya H. Hyperploidy induced by drugs that inhibit formation of microtubule promotes chromosome instability. Genes Cells. 2002 Feb;7(2):151-62.

Niu NK, Wang ZL, Pan ST, Ding HQ, Au GH, He ZX, Zhou ZW, Xiao G, Yang YX, Zhang X, Yang T, Chen XW, Qiu JX, Zhou SF. Pro-apoptotic and pro-autophagic effects of the Aurora kinase A inhibitor alisertib (MLN8237) on human osteosarcoma U-2 OS and MG-63 cells through the activation of mitochondria-mediated pathway and inhibition of p38 MAPK/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. Drug Des Devel Ther. 2015 Mar 12;9:1555-84.

Noh EM, Lee YR, Hong OY, Jung SH, Youn HJ, Kim JS. Aurora kinases are essential for PKC-induced invasion and matrix metalloproteinase-9 expression in MCF-7 breast cancer cells. Oncol Rep. 2015 Aug;34(2):803-10.

Norman P. Tipifarnib (Janssen Pharmaceutica). Curr Opin Investig Drugs. 2002 Feb;3(2):313-9.

Nowakowski J, Cronin CN, McRee DE, Knuth MW, Nelson CG, Pavletich NP, Rogers J, Sang BC, Scheibe DN, Swanson RV, Thompson DA. Structures of the cancer-related Aurora-A, FAK, and EphA2 protein kinases from nanovolume crystallography. Structure. 2002 Dec;10(12):1659-67.

Oberholzer PA, Kee D, Dziunycz P, Sucker A, Kamsukom N, Jones R, Roden C, Chalk CJ, Ardlie K, Palescandolo E, Piris A, MacConaill LE, Robert C, Hofbauer GF, McArthur GA, Schadendorf D, Garraway LA. RAS mutations are associated with the development of cutaneous squamous cell tumors in patients treated with RAF inhibitors. J Clin Oncol. 2012 Jan 20;30(3):316-21.

Ohba T, Toyokawa G, Kometani T, Nosaki K, Hirai F, Yamaguchi M, Hamatake M, Seto T, Ichinose Y, Sugio K. Mutations of the EGFR and K-ras genes in resected stage I lung adenocarcinoma and their clinical significance. Surg Today. 2014 Mar;44(3):478-86.

Ohi R, Sapra T, Howard J, Mitchison TJ. Differentiation of cytoplasmic and meiotic spindle assembly MCAK functions by Aurora B-dependent phosphorylation. Mol Biol Cell. 2004 Jun;15(6):2895-906.

Oji Y, Miyoshi S, Maeda H, Hayashi S, Tamaki H, Nakatsuka S, Yao M, Takahashi E, Nakano Y, Hirabayashi H, Shintani Y, Oka Y, Tsuboi A, Hosen N, Asada M, Fujioka T, Murakami M, Kanato K, Motomura M, Kim EH, Kawakami M, Ikegame K, Ogawa H, Aozasa K, Kawase I, Sugiyama H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in de novo lung cancers. Int J Cancer. 2002 Jul 20;100(3):297-303.

Okada R, Naito M, Hattori Y, Seiki T, Wakai K, Nanri H, Watanabe M, Suzuki S, Kairupan TS, Takashima N, Mikami H, Ohnaka K, Watanabe Y, Katsuura-Kamano S, Kubo M, Hamajima N, Tanaka H; Japan Multi-institutional Collaborative Cohort Study Group. Matrix metalloproteinase 9 gene polymorphisms are associated with a multiple family history of gastric cancer. Gastric Cancer. 2016 Apr 6.

Okamoto K, Zaanan A, Kawakami H, Huang S, Sinicrope FA. Reversal of Mutant KRAS-Mediated Apoptosis Resistance by Concurrent Noxa/Bik Induction and Bcl-2/Bcl-xL Antagonism in Colon Cancer Cells. Mol Cancer Res. 2015 Apr;13(4):659-69. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0476. Epub 2014 Dec 29.

Ostrem JM, Peters U, Sos ML, Wells JA, Shokat KM. K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. Nature. 2013 Nov 28;503(7477):548-51.

Ota T, Suto S, Katayama H, Han ZB, Suzuki F, Maeda M, Tanino M, Terada Y, Tatsuka M. Increased mitotic phosphorylation of histone H3 attributable to AIM-1/Aurora-B overexpression contributes to chromosome number instability. Cancer Res. 2002 Sep 15;62(18):5168-77.

Ou YH, Torres M, Ram R, Formstecher E, Roland C, Cheng T, Brekken R, Wurz R, Tasker A, Polverino T, Tan SL, White MA. TBK1 directly engages Akt/PKB survival signaling to support oncogenic transformation. Mol Cell. 2011 Feb 18;41(4):458-70.

Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. Science. 2004 Jun 4;304(5676):1497-500.

Pai EF, Kabsch W, Krengel U, Holmes KC, John J, Wittinghofer A. Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. Nature. 1989 Sep 21;341(6239):209-14.

Pai EF, Krengel U, Petsko GA, Goody RS, Kabsch W, Wittinghofer A. Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 A resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. EMBO J. 1990 Aug;9(8):2351-9.

Palorini R, Cammarata FP, Balestrieri C, Monestiroli A, Vasso M, Gelfi C, Alberghina L, Chiaradonna F. Glucose starvation induces cell death in K-ras-transformed cells by interfering with the hexosamine biosynthesis pathway and activating the unfolded protein response. Cell Death Dis. 2013 Jul 18;4:e732.

Parada LF, Land H, Weinberg RA, Wolf D, Rotter V. Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. Nature. 1984 Dec 13-19;312(5995):649-51.

Parada LF, Tabin CJ, Shih C, Weinberg RA. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. Nature. 1982 Jun 10;297(5866):474-8.

Parise LV, Lee J, Juliano RL. New aspects of integrin signaling in cancer. Semin Cancer Biol. 2000 Dec;10(6):407-14.

Park S, Kim ES, Noh DY, Hwang KT, Moon A. H-Ras-specific upregulation of granulocyte colony-stimulating factor promotes human breast cell invasion via matrix metalloproteinase-2. Cytokine. 2011 Jul;55(1):126-33.

Pascolo S. Time to use a dose of Chloroquine as an adjuvant to anti-cancer chemotherapies. Eur J Pharmacol. 2016 Jan 15;771:139-44.

Patel AV, Eaves D, Jessen WJ, Rizvi TA, Ecsedy JA, Qian MG, Aronow BJ, Perentesis JP, Serra E, Cripe TP, Miller SJ, Ratner N. Ras-driven transcriptome analysis identifies aurora kinase A as a potential malignant peripheral nerve sheath tumor therapeutic target. Clin Cancer Res. 2012 Sep 15;18(18):5020-30.

Patel PH, Chadalavada RS, Chaganti RS, Motzer RJ. Targeting von Hippel-Lindau pathway in renal cell carcinoma. Clin Cancer Res. 2006 Dec 15;12(24):7215-20.

Patgiri A, Yadav KK, Arora PS, Bar-Sagi D. An orthosteric inhibitor of the Ras-Sos interaction. Nat Chem Biol. 2011 Jul 17;7(9):585-7.

Patra KC, Wang Q, Bhaskar PT, Miller L, Wang Z, Wheaton W, Chandel N, Laakso M, Muller WJ, Allen EL, Jha AK, Smolen GA, Clasquin MF, Robey RB, Hay N. Hexokinase 2 is required for tumor initiation and

maintenance and its systemic deletion is therapeutic in mouse models of cancer. Cancer Cell. 2013 Aug 12;24(2):213-28.

Paul JM, Templeton SD, Baharani A, Freywald A, Vizeacoumar FJ. Building high-resolution synthetic lethal networks: a 'Google map' of the cancer cell. Trends Mol Med. 2014 Dec;20(12):704-15.

Peifer M, Fernández-Cuesta L, Sos ML, George J, Seidel D, Kasper LH, Plenker D, Leenders F, Sun R, Zander T, Menon R, Koker M, Dahmen I, Müller C, Di Cerbo V, Schildhaus HU, Altmüller J, Baessmann I, Becker C, de Wilde B, Vandesompele J, Böhm D, Ansén S, Gabler F, Wilkening I, Heynck S, Heuckmann JM, Lu X, Carter SL, Cibulskis K, Banerji S, Getz G, Park KS, Rauh D, Grütter C, Fischer M, Pasqualucci L, Wright G, Wainer Z, Russell P, Petersen I, Chen Y, Stoelben E, Ludwig C, Schnabel P, Hoffmann H, Muley T, Brockmann M, Engel-Riedel W, Muscarella LA, Fazio VM, Groen H, Timens W, Sietsma H, Thunnissen E, Smit E, Heideman DA, Snijders PJ, Cappuzzo F, Ligorio C, Damiani S, Field J, Solberg S, Brustugun OT, Lund-Iversen M, Sänger J, Clement JH, Soltermann A, Moch H, Weder W, Solomon B, Soria JC, Validire P, Besse B, Brambilla E, Brambilla C, Lantuejoul S, Lorimier P, Schneider PM, Hallek M, Pao W, Meyerson M, Sage J, Shendure J, Schneider R, Büttner R, Wolf J, Nürnberg P, Perner S, Heukamp LC, Brindle PK, Haas S, Thomas RK. Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer. Nat Genet. 2012 Oct;44(10):1104-10.

Peri F, Airoldi C, Colombo S, Martegani E, van Neuren AS, Stein M, Marinzi C, Nicotra F. Design, synthesis and biological evaluation of sugar-derived Ras inhibitors. Chembiochem. 2005 Oct;6(10):1839-48.

Peschard P, McCarthy A, Leblanc-Dominguez V, Yeo M, Guichard S, Stamp G, Marshall CJ. Genetic deletion of RALA and RALB small GTPases reveals redundant functions in development and tumorigenesis. Curr Biol. 2012 Nov 6;22(21):2063-8.

Pietro C, Stam RW, Agraz-Doblas A, Ballerini P, Camos M, Castaño J, Marschalek R, Bursen A, Varela I, Bueno C, Menendez P. Activated KRAS cooperates with MLLAF4 to promote extramedullary engraftment and migration of cord blood CD34+ HSPC but is insuficiente to initiate leukemia. Cancer Res. 2016 Feb 2. Pii: cancers.2769.2015.

Pihan GA, Purohit A, Wallace J, Knecht H, Woda B, Quesenberry P, Doxsey SJ. Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. Cancer Res. 1998 Sep 1;58(17):3974-85.

Pihan GA, Purohit A, Wallace J, Malhotra R, Liotta L, Doxsey SJ. Centrosome defects can account for cellular and genetic changes that characterize prostate cancer progression. Cancer Res. 2001 Mar 1;61(5):2212-9.

Porcelli L, Guida G, Quatrale AE, Cocco T, Sidella L, Maida I, Iacobazzi RM, Ferretta A, Stolfa DA, Strippoli S, Guida S, Tommasi S, Guida M, Azzariri A. Aurora kinase B inhibition reduces the proliferation of metastatic melanoma cells and enhances the response to chemotherapy. J Transl Med. 2015 Jan 27;13:26.

Portier N, Audhya A, Maddox PS, Green RA, Dammermann A, Desai A, Oegema K. A microtubule-independent role for centrosomes and aurora a in nuclear envelope breakdown. Dev Cell. 2007 Apr;12(4):515-29.

Poulikakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, Rosen N. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. Nature. 2010 Mar 18;464(7287):427-30.

Prendergast GC, Davide JP, deSolms SJ, Giuliani EA, Graham SL, Gibbs JB, Oliff A, Kohl NE. Farnesyltransferase inhibition causes morphological reversion of ras-transformed cells by a complex mechanism that involves regulation of the actin cytoskeleton. Mol Cell Biol. 1994 Jun;14(6):4193-202.

Prieto C, Stam RW, Agraz-Doblas A, Ballerini P, Camos M, Castaño J, Marschalek R, Bursen A, Varela I, Bueno C, Menendez P. Activated KRAS cooperates with MLLAF4 to promote extramedullary engraftment and migration of cord blood CD34+ HSPC but is insufficient to initiate leukemia. Cancer Res. 2016 Feb 2. pii: canres.2769.2015.

Pugacheva EN, Golemis EA. The focal adhesion scaffolding protein HEF1 regulates activation of the Aurora-A and Nek2 kinases at the centrosome. Nat Cell Biol. 2005 Oct;7(10):937-46.

Puig P, Urgell E, Capellá G, Sancho FJ, Pujol J, Boadas J, Farré A, Lluís F, González-Sastre F, Mora J. A highly sensitive method for K-ras mutation detection is useful in diagnosis of gastrointestinal cancer. Int J Cancer. 2000 Jan 1;85(1):73-7.

Puyol M, Martín A, Dubus P, Mulero F, Pizcueta P, Khan G, Guerra C, Santamaría D, Barbacid M. A synthetic lethal interaction between K-Ras oncogenes and Cdk4 unveils a therapeutic strategy for non-small cell lung carcinoma. Cancer Cell. 2010 Jul 13;18(1):63-73.

Puzovic V, Brcic I, Ranogajec I, Jakic-Razumovic J. Prognostic values of ETS-1, MMP-2 and MMP-9 expression and co-expression in breast cancer patients. Neoplasma. 2014;61(4):439-46.

Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. Nat Rev Cancer. 2011 Oct 13;11(11):761-74.

Qi G, Ogawa I, Kudo Y, Miyauchi M, Siriwardena BS, Shimamoto F, Tatsuka M, Takata T. Aurora-B expression and its correlation with cell proliferation and metastasis in oral cancer. Virchows Arch. 2007 Mar;450(3):297-302.

Qian Z, LaRochelle JR, Jiang B, Lian W, Hard RL, Selner NG, Luechapanichkul R, Barrios AM, Pei D. Early endosomal escape of a cyclic cell-penetrating peptide allows effective cytosolic cargo delivery. Biochemistry. 2014 Jun 24;53(24):4034-46.

Qian Z, Liu T, Liu YY, Briesewitz R, Barrios AM, Jhiang SM, Pei D. Efficient delivery of cyclic peptides into mammalian cells with short sequence motifs. ACS Chem Biol. 2013 Feb 15;8(2):423-31.

Quilliam LA, Huff SY, Rabun KM, Wei W, Park W, Broek D, Der CJ. Membrane-targeting potentiates guanine nucleotide exchange factor CDC25 and SOS1 activation of Ras transforming activity. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Aug 30;91(18):8512-6.

Rachagani S, Senapati S, Chakraborty S, Ponnusamy MP, Kumar S, Smith LM, Jain M, Batra SK. Activated KrasG^{12}D is associated with invasion and metastasis of pancreatic cancer cells through inhibition of E-cadherin. Br J Cancer. 2011 Mar 15;104(6):1038-48.

Raimondi AR, Vitale-Cross L, Amornphimoltham P, Gutkind JS, Molinolo A. Rapid development of salivary gland carcinomas upon conditional expression of K-ras driven by the cytokeratin 5 promoter. Am J Pathol. 2006 May;168(5):1654-65.

Ramalingam SS, Owonikoko TK, Khuri FR. Lung cancer: New biological insights and recent therapeutic advances. CA Cancer J Clin. 2011 Mar-Apr;61(2):91-112.

Ramos P, Karnezis AN, Craig DW, Sekulic A, Russell ML, Hendricks WP, Corneveaux JJ, Barrett MT, Shumansky K, Yang Y, Shah SP, Prentice LM, Marra MA, Kiefer J, Zismann VL, McEachron TA, Salhia B, Prat J, D'Angelo E, Clarke BA, Pressey JG, Farley JH, Anthony SP, Roden RB, Cunliffe HE, Huntsman DG, Trent JM. Small cell carcinoma of the ovary, hypercalcemic type, displays frequent inactivating germline and somatic mutations in SMARCA4. Nat Genet. 2014 May;46(5):427-9.

Rangwala R, Leone R, Chang YC, Fecher LA, Schuchter LM, Kramer A, Tan KS, Heitjan DF, Rodgers G, Gallagher M, Piao S, Troxel AB, Evans TL, DeMichele AM, Nathanson KL, O'Dwyer PJ, Kaiser J, Pontiggia L, Davis LE, Amaravadi RK. Phase I trial of hydroxychloroquine with dose-intense temozolomide in patients with advanced solid tumors and melanoma. Autophagy. 2014 Aug;10(8):1369-79.

Rao S, Cunningham D, de Gramont A, Scheithauer W, Smakal M, Humblet Y, Kourteva G, Iveson T, Andre T, Dostalova J, Illes A, Belly R, Perez-Ruixo JJ, Park YC, Palmer PA. Phase III double-blind placebo-controlled study of farnesyl transferase inhibitor R115777 in patients with refractory advanced colorectal cancer. J Clin Oncol. 2004 Oct 1;22(19):3950-7.

Rauen KA. HRAS and the Costello syndrome. Clin Genet. 2007 Feb;71(2):101-8.

Razidlo GL, Magnine C, Sletten AC, Hurley RM, Almada LL, Fernandez-Zapico ME, Ji B, McNiven MA. Targeting pancreatic cancer metastasis by inhibition of Vav1, a driver of tumor cell invasion. Cancer Res. 2015 Jul 15;75(14):2907-15.

Regala RP, Justilien V, Walsh MP, Weems C, Khoor A, Murray NR, Fields AP. Matrix metalloproteinase-10 promotes Kras-mediated bronchio-alveolar stem cell expansion and lung cancer formation. PLoS One. 2011;6(10):e26439.

Reichardt W, Jung V, Brunner C, Klein A, Wemmert S, Romeike BF, Zang KD, Urbschat S. The putative serine/threonine kinase gene STK15 on chromosome 20q13.2 is amplified in human gliomas. Oncol Rep. 2003 Sep-Oct;10(5):1275-9.

Reifenberger J, Knobbe CB, Sterzinger AA, Blaschke B, Schulte KW, Ruzicka T, Reifenberger G. Frequent alterations of Ras signaling pathway genes in sporadic malignant melanomas. Int J Cancer. 2004 Apr 10;109(3):377-84.

Resh MD. Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins. Subcell Biochem. 2004;37:217-32.

Ribeiro KB, da Silva Zanetti J, Ribeiro-Silva A, Rapatoni L, de Oliveira HF, da Cunha Tirapelli DP, Garcia SB, Feres O, da Rocha JJ, Peria FM. KRAS mutations assiciated with CD44/CD166 immunoexpression as predictors of worse outcome in metastatic colon cancer. Cancer Biomark. 2016 Mar 4;16(4):513-21.

Rochlitz CF, Scott GK, Dodson JM, Liu E, Dollbaum C, Smith HS, Benz CC. Incidence of activating ras oncogene mutations associated with primary and metastatic human breast cancer. Cancer Res. 1989 Jan 15;49(2):357-60.

Rodenhuis S, Slebos RJ. Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer. Cancer Res. 1992 May 1;52(9 Suppl):2665s-2669s.

Rodriguez-Viciana P, Marte BM, Warne PH, Downward J. Phosphatidylinositol 3' kinase: one of the effectors of Ras. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1996 Feb 29;351(1336):225-31; discussion 231-2.

Roghi C1, Giet R, Uzbekov R, Morin N, Chartrain I, Le Guellec R, Couturier A, Dorée M, Philippe M, Prigent C.

Roskoski R Jr. A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. Pharmacol Res. 2015 Oct;100:1-23.

Roux PP, Ballif BA, Anjum R, Gygi SP, Blenis J. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Sep 14;101(37):13489-94.

Ruchaud S, Carmena M, Earnshaw WC. Chromosomal passengers: conducting cell division. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007 Oct;8(10):798-812.

Rui Y, Wang C, Zhou Z, Yu Y. K-Ras mutation and prognosis of colorectal cancer: a meta-analysis. Hepatogastroenterology. 2015 Jan-Feb;62(137):19-24.

Russell M, Lange-Carter CA, Johnson GL. Direct interaction between Ras and the kinase domain of mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MEKK1). J Biol Chem. 1995 May 19;270(20):11757-60.

Rutledge SD, Cimini D. Consequences of aneuploidy in sickness and in health. Curr Opin Cell Biol. 2016 Jun;40:41-6.

Sak A, Stuschke M, Groneberg M, Kübler D, Pöttgen C, Eberhardt WE. Inhibiting the aurora B kinase potently suppresses repopulation during fractionated irradiation of human lung cancer cell lines. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2012 Oct 1;84(2):492-9.

Salem N, Kamal I, Al-Maghrabi J, Abuzenadah A, Peer-Zada AA, Qari Y, Al-Ahwal M, Al-Qahtani M, Buhmeida A. High expression of matrix metalloproteinases: MMP-2 and MMP-9 predicts poor survival outcome in colorectal carcinoma. Future Oncol. 2016 Feb;12(3):323-31.

Salgia R, Skarin AT. Molecular abnormalities in lung cancer. J Clin Oncol. 1998 Mar;16(3):1207-17.

Sampath SC, Ohi R, Leismann O, Salic A, Pozniakovski A, Funabiki H. The chromosomal passenger complex is required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly. Cell. 2004 Jul 23;118(2):187-202.

Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, Lilenbaum R, Johnson DH. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. N Engl J Med. 2006 Dec 14;355(24):2542-50.

Santamaria A, Wang B, Elowe S, et al. The Plk1-dependent Phosphoproteome of the Early Mitotic Spindle. Molecular & Cellular Proteomics : MCP. 2011;10(1):M110.004457.

Sasai K, Katayama H, Stenoien DL, Fujii S, Honda R, Kimura M, Okano Y, Tatsuka M, Suzuki F, Nigg EA, Earnshaw WC, Brinkley WR, Sen S. Aurora-C kinase is a novel chromosomal passenger protein that can complement Aurora-B kinase function in mitotic cells. Cell Motil Cytoskeleton. 2004 Dec;59(4):249-63.

Satinover DL, Leach CA, Stukenberg PT, Brautigan DL. Activation of Aurora-A kinase by protein phosphatase inhibitor-2, a bifunctional signaling protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jun 8;101(23):8625-30.

Satoh T, Endo M, Nakafuku M, Nakamura S, Kaziro Y. Platelet-derived growth factor stimulates formation of active p21ras.GTP complex in Swiss mouse 3T3 cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Aug;87(15):5993-7.

Satow R, Hirano T, Batori R, Nakamura T, Murayama Y, Fukami K. Phospholipase Cδ1 induces E-cadherin expression and suppresses malignancy in colorectal cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Sep 16;111(37):13505-10.

Schaber MD, O'Hara MB, Garsky VM, Mosser SC, Bergstrom JD, Moores SL, Marshall MS, Friedman PA, Dixon RA, Gibbs JB. Polyisoprenylation of Ras in vitro by a farnesyl-protein transferase. J Biol Chem. 1990 Sep 5;265(25):14701-4.

Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W, Wiesmüller L, Lautwein A, Schmitz F, Wittinghofer A. The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. Science. 1997 Jul 18;277(5324):333-8.

Schick U, Kyula J, Barker H, Patel R, Zaidi S, Gregory C, Hafsi H, Roulstone V, Deutsch E, McLaughlin M, Harrington K. Trametinib radiosensitises RAS- and BRAF-mutated melanoma by perturbing cell cycle and inducing senescence. Radiother Oncol. 2015 Nov;117(2):364-75.

Schlesinger TK, Fanger GR, Yujiri T, Johnson GL. The TAO of MEKK. Front Biosci. 1998 Nov 15;3:D1181-6.

Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Cell. 2000 Oct 13;103(2):211-25.

Schumacher JM, Golden A, Donovan PJ. AIR-2: An Aurora/Ipl1-related protein kinase associated with chromosomes and midbody microtubules is required for polar body extrusion and cytokinesis in Caenorhabditis elegans embryos. J Cell Biol. 1998 Dec 14;143(6):1635-46.

Schütz A, Röser K, Klitzsch J, Lieder F, Aberger F, Gruber W, Mueller KM, Pupyshev A, Moriggl R, Friedrich K. Lung Adenocarcinomas and Lung Cancer Cell Lines Show Association of MMP-1 Expression With STAT3 Activation. Transl Oncol. 2015 Apr;8(2):97-105.

Sebti SM. Blocked pathways: FTIs shut down oncogene signals. Oncologist. 2003;8 Suppl 3:30-8.

Seki A, Coppinger JA, Jang CY, Yates JR, Fang G. Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. Science. 2008 Jun 20;320(5883):1655-8.

Sen S, Zhou H, White RA. A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines. Oncogene. 1997 May 8;14(18):2195-200.

Sepp-Lorenzino L, Ma Z, Rands E, Kohl NE, Gibbs JB, Oliff A, Rosen N. A peptidomimetic inhibitor of farnesyl:protein transferase blocks the anchorage-dependent and -independent growth of human tumor cell lines. Cancer Res. 1995 Nov 15;55(22):5302-9.

Seshagiri S, Stawiski EW, Durinck S, Modrusan Z, Storm EE, Conboy CB, Chaudhuri S, Guan Y, Janakiraman V, Jaiswal BS, Guillory J, Ha C, Dijkgraaf GJ, Stinson J, Gnad F, Huntley MA, Degenhardt JD, Haverty PM, Bourgon R, Wang W, Koeppen H, Gentleman R, Starr TK, Zhang Z, Largaespada DA, Wu TD, de Sauvage FJ. Recurrent R-spondin fusions in colon cancer. Nature. 2012 Aug 30;488(7413):660-4.

Sessa F, Mapelli M, Ciferri C, Tarricone C, Areces LB, Schneider TR, Stukenberg PT, Musacchio A. Mechanism of Aurora B activation by INCENP and inhibition by hesperadin. Mol Cell. 2005 Apr 29;18(3):379-91.

Settleman J, Albright CF, Foster LC, Weinberg RA. Association between GTPase activators for Rho and Ras families. Nature. 1992 Sep 10;359(6391):153-4.

Settleman J, Narasimhan V, Foster LC, Weinberg RA. Molecular cloning of cDNAs encoding the GAP-associated protein p190: implications for a signaling pathway from ras to the nucleus. Cell. 1992 May 1;69(3):539-49.

Severson AF, Hamill DR, Carter JC, Schumacher J, Bowerman B. The aurora-related kinase AIR-2 recruits ZEN-4/CeMKLP1 to the mitotic spindle at metaphase and is required for cytokinesis. Curr Biol. 2000 Oct 5;10(19):1162-71.

Shah A, Mangaonkar A. Idelalisib: A Novel PI3Kδ Inhibitor for Chronic Lymphocytic Leukemia. Ann Pharmacother. 2015 Oct;49(10):1162-70.

Shah SP, Roth A, Goya R, Oloumi A, Ha G, Zhao Y, Turashvili G, Ding J, Tse K, Haffari G, Bashashati A, Prentice LM, Khattra J, Burleigh A, Yap D, Bernard V, McPherson A, Shumansky K, Crisan A, Giuliany R, Heravi-Moussavi A, Rosner J, Lai D, Birol I, Varhol R, Tam A, Dhalla N, Zeng T, Ma K, Chan SK, Griffith M, Moradian A, Cheng SW, Morin GB, Watson P, Gelmon K, Chia S, Chin SF, Curtis C, Rueda OM, Pharoah PD, Damaraju S, Mackey J, Hoon K, Harkins T, Tadigotla V, Sigaroudinia M, Gascard P, Tlsty T, Costello JF, Meyer IM, Eaves CJ, Wasserman WW, Jones S, Huntsman D, Hirst M, Caldas C, Marra MA, Aparicio S. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. Nature. 2012 Apr 4;486(7403):395-9.

Sharma SV, Haber DA, Settleman J. Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. Nat Rev Cancer. 2010 Apr;10(4):241-53.

Shelledy L, Roman D. Vemurafenib: First-in-Class BRAF-Mutated Inhibitor for the Treatment of Unresectable or Metastatic Melanoma. J Adv Pract Oncol. 2015 Jul-Aug;6(4):361-5.

Sheng Y, Li W, Zhu F, Liu K, Chen H, Yao K, Reddy K, Lim do Y, Oi N, Li H, Peng C, Ma WY, Bode AM, Dong Z, Dong Z. 3,6,2',4',5'-Pentahydroxyflavone, an orally bioavailable multiple protein kinase inhibitor, overcomes gefitinib resistance in non-small cell lung cancer. J Biol Chem. 2014 Oct 10;289(41):28192-201.

Shi M, Shi H, Ji J, Cai Q, Chen X, Yu Y, Liu B, Zhu Z, Zhang J. Cetuximab inhibits gastric cancer growth in vivo, independent of KRAS status. Curr Cancer Drug Targets. 2014;14(2):217-24.

Shibata D, Almoguera C, Forrester K, Dunitz J, Martin SE, Cosgrove MM, Perucho M, Arnheim N. Detection of c-K-ras mutations in fine needle aspirates from human pancreatic adenocarcinomas. Cancer Res. 1990 Feb 15;50(4):1279-83.

Shih TY, Hattori S, Clanton DJ, Ulsh LS, Chen ZQ, Lautenberger JA, Papas TS. Structure and function of p21 ras proteins. Gene Amplif Anal. 1986;4:53-72.

Shih TY, Papageorge AG, Stokes PE, Weeks MO, Scolnick EM. Guanine nucleotide-binding and autophosphorylating activities associated with the p21src protein of Harvey murine sarcoma virus. Nature. 1980 Oct 23;287(5784):686-91.

Shima F, Yoshikawa Y, Matsumoto S, Kataoka T. Discovery of small-molecule Ras inhibitors that display antitumor activity by interfering with Ras·GTP-effector interaction. Enzymes. 2013;34 Pt. B:1-23.

Shima F, Yoshikawa Y, Ye M, Araki M, Matsumoto S, Liao J, Hu L, Sugimoto T, Ijiri Y, Takeda A, Nishiyama Y, Sato C, Muraoka S, Tamura A, Osoda T, Tsuda K, Miyakawa T, Fukunishi H, Shimada J, Kumasaka T, Yamamoto M, Kataoka T. In silico discovery of small-molecule Ras inhibitors that display antitumor activity by blocking the Ras-effector interaction. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 May 14;110(20):8182-7.

Shimizu K, Goldfarb M, Suard Y, Perucho M, Li Y, Kamata T, Feramisco J, Stavnezer E, Fogh J, Wigler MH. Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1983 Apr;80(8):2112-6.

Shirakawa R, Horiuchi H. Ral GTPases: crucial mediators of exocytosis and tumourigenesis. J Biochem. 2015 May;157(5):285-99.

Shirasawa S, Furuse M, Yokoyama N, Sasazuki T. Altered growth of human colon cancer cell lines disrupted at activated Ki-ras. Science. 1993 Apr 2;260(5104):85-8.

Shu LP, Zhou ZW, Zi D, He ZX, Zhou SF. A SILAC-based proteomics elicits the molecular interactome of alisertib (MLN8237) in human erythroleukemia K562 cells. Am J Transl Res. 2015 Nov 15;7(11):2442-61.

Sibilia M, Kroismayr R, Lichtenberger BM, Natarajan A, Hecking M, Holcmann M. The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis. Differentiation. 2007 Nov;75(9):770-87.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. CA Cancer J Clin. 2013 Jan;63(1):11-30.

Simon G, Sharma A, Li X, Hazelton T, Walsh F, Williams C, Chiappori A, Haura E, Tanvetyanon T, Antonia S, Cantor A, Bepler G. Feasibility and efficacy of molecular analysis-directed individualized therapy in advanced non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol. 2007 Jul 1;25(19):2741-6.

Simon MA, Dodson GS, Rubin GM. An SH3-SH2-SH3 protein is required for p21Ras1 activation and binds to sevenless and Sos proteins in vitro. Cell. 1993 Apr 9;73(1):169-77.

Singh A, Greninger P, Rhodes D, Koopman L, Violette S, Bardeesy N, Settleman J. A gene expression signature associated with "K-Ras addiction" reveals regulators of EMT and tumor cell survival. Cancer Cell. 2009 Jun 2;15(6):489-500.

Singh D, Srivastava SK, Chaudhuri TK, Upadhyay G. Multifaceted role of matrix metalloproteinases (MMPs). Front Mol Biosci. 2015 May 13;2:19.

Smith L, Plug A, Thayer M. Delayed replication timing leads to delayed mitotic chromosome condensation and chromosomal instability of chromosome translocations. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Nov 6;98(23):13300-5.

Smith MR, DeGudicibus SJ, Stacey DW. Requirement for c-ras proteins during viral oncogene transformation. Nature. 1986 Apr 10-16;320(6062):540-3.

Smith SL, Bowers NL, Betticher DC, Gautschi O, Ratschiller D, Hoban PR, Booton R, Santibáñez-Koref MF, Heighway J. Overexpression of aurora B kinase (AURKB) in primary non-small cell lung carcinoma is frequent, generally driven from one allele, and correlates with the level of genetic instability. Br J Cancer. 2005 Sep 19;93(6):719-29.

Sondermann H, Soisson SM, Boykevisch S, Yang SS, Bar-Sagi D, Kuriyan J. Structural analysis of autoinhibition in the Ras activator Son of sevenless. Cell. 2004 Oct 29;119(3):393-405.

Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. J Cell Mol Med. 2005 Jan-Mar;9(1):59-71.

Sorrentino R, Libertini S, Pallante PL, Troncone G, Palombini L, Bavetsias V, Spalletti-Cernia D, Laccetti P, Linardopoulos S, Chieffi P, Fusco A, Portella G. Aurora B overexpression associates with the thyroid carcinoma undifferentiated phenotype and is required for thyroid carcinoma cell proliferation. J Clin Endocrinol Metab. 2005 Feb;90(2):928-35.

Spiegel AM. Signal transduction by guanine nucleotide binding proteins. Mol Cell Endocrinol. 1987 Jan;49(1):1-16.

Stacey DW. Cyclin D1 serves as a cell cycle regulatory switch in actively proliferating cells. Curr Opin Cell Biol. 2003 Apr;15(2):158-63.

Staffas A, Karlsson C, Persson M, Palmqvist L, Bergo MO. Wild-type KRAS inhibits oncogenic KRAS-induced T-ALL in mice. Leukemia. 2015 May;29(5):1032-40.

Steckel M, Molina-Arcas M, Weigelt B, Marani M, Warne PH, Kuznetsov H, Kelly G, Saunders B, Howell M, Downward J, Hancock DC. Determination of synthetic lethal interactions in KRAS oncogene-dependent cancer cells reveals novel therapeutic targeting strategies. Cell Res. 2012 Aug;22(8):1227-45.

Stewart ML, Tamayo P, Wilson S, Chang YM, Kim JM, Khabele D, Shamji AF, Schreiber SL. KRAS genomic status predicts the sensitivity of ovarian cancer cells to decitabine. Cancer Res. 2015 Jul 15;75(14):2897-906.

Stinchcombe TE, Johnson GL. MEK inhibition in non-small cell lung cancer. Lung Cancer. 2014 Nov;86(2):121-5.

Storchova Z, Kuffer C. The consequences of tetraploidy and aneuploidy. J Cell Sci. 2008 Dec 1;121(Pt 23):3859-66.

Storchova Z, Pellman D. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. Nat Rev Mol Cell Biol. 2004 Jan;5(1):45-54.

Stryke D, Kawamoto M, Huang CC, Johns SJ, King LA, Harper CA, Meng EC, Lee RE, Yee A, L'Italien L, Chuang PT, Young SG, Skarnes WC, Babbitt PC, Ferrin TE. BayGenomics: a resource of insertional mutations in mouse embryonic stem cells. Nucleic Acids Res. 2003 Jan 1;31(1):278-81.

Su F, Viros A, Milagre C, Trunzer K, Bollag G, Spleiss O, Reis-Filho JS, Kong X, Koya RC, Flaherty KT, Chapman PB, Kim MJ, Hayward R, Martin M, Yang H, Wang Q, Hilton H, Hang JS, Noe J, Lambros M, Geyer F, Dhomen N, Niculescu-Duvaz I, Zambon A, Niculescu-Duvaz D, Preece N, Robert L, Otte NJ, Mok S, Kee D, Ma Y, Zhang C, Habets G, Burton EA, Wong B, Nguyen H, Kockx M, Andries L, Lestini B, Nolop KB, Lee RJ, Joe AK, Troy JL, Gonzalez R, Hutson TE, Puzanov I, Chmielowski B, Springer CJ, McArthur GA, Sosman JA, Lo RS, Ribas A, Marais R. RAS mutations in cutaneous squamous-cell carcinomas in patients treated with BRAF inhibitors. N Engl J Med. 2012 Jan 19;366(3):207-15.

Sun J, Qian Y, Hamilton AD, Sebti SM. Both farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I inhibitors are required for inhibition of oncogenic K-Ras prenylation but each alone is sufficient to suppress human tumor growth in nude mouse xenografts. Oncogene. 1998 Mar;16(11):1467-73.

Sun J, Qian Y, Hamilton AD, Sebti SM. Ras CAAX peptidomimetic FTI 276 selectively blocks tumor growth in nude mice of a human lung carcinoma with K-Ras mutation and p53 deletion. Cancer Res. 1995 Oct 1;55(19):4243-7.

Sun JM, Yang LN, Xu H, Chang B, Wang HY, Yang G. Inhibition of Aurora A promotes chemosensitivity via inducing cell cycle arrest and apoptosis in cervical cancer cells. Am J Cancer Res. 2015 Feb 15;5(3):1133-45.

Sun Q, Burke JP, Phan J, Burns MC, Olejniczak ET, Waterson AG, Lee T, Rossanese OW, Fesik SW. Discovery of small molecules that bind to K-Ras and inhibit Sos-mediated activation. Angew Chem Int Ed Engl. 2012 Jun 18;51(25):6140-3.

Sunaga N, Shames DS, Girard L, et al. Knockdown of Oncogenic KRAS in Non-Small Cell Lung Cancers Suppresses Tumor Growth and Sensitizes Tumor Cells to Targeted Therapy. Molecular cancer therapeutics. 2011;10(2):336-346.

Symonds JM, Ohm AM, Tan AC, Reyland ME. PKCδ regulates integrin αVβ3 expression and transformed growth of K-ras dependent lung cancer cells. Oncotarget. 2016 Feb 21.

Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. Physiol Rev. 2001 Jan;81(1):153-208.

Takeshita M, Koga T, Takayama K, Ijichi K, Yano T, Maehara Y, Nakanishi Y, Sueishi K. Aurora-B overexpression is correlated with aneuploidy and poor prognosis in non-small cell lung cancer. Lung Cancer. 2013 Apr;80(1):85-90.

Tan N, Wong M, Nannini MA, Hong R, Lee LB, Price S, Williams K, Savy PP, Yue P, Sampath D, Settleman J, Fairbrother WJ, Belmont LD. Bcl-2/Bcl-xL inhibition increases the efficacy of MEK inhibition alone and in combination with PI3 kinase inhibition in lung and pancreatic tumor models. Mol Cancer Ther. 2013 Jun;12(6):853-64.

Tan YK, Wee TC, Koh WP, Wang YT, Eng P, Tan WC, Seow A. Survival among Chinese women with lung cancer in Singapore: a comparison by stage, histology and smoking status. Lung Cancer. 2003 Jun;40(3):237-46.

Tanaka H, Nakashiro K, Iwamoto K, Tokuzen N, Fujita Y, Shirakawa R, Oka R, Goda H, Hamakawa H. Targeting Aurora kinase A suppresses the growth of human oral squamous cell carcinoma cells in vitro and in vivo. Oral Oncol. 2013 Jun;49(6):551-9.

Tartaglia M, Gelb BD. Noonan syndrome and related disorders: genetics and pathogenesis. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2005;6:45-68.

Tatsuka M, Katayama H, Ota T, Tanaka T, Odashima S, Suzuki F, Terada Y. Multinuclearity and increased ploidy caused by overexpression of the aurora- and Ipl1-like midbody-associated protein mitotic kinase in human cancer cells. Cancer Res. 1998 Nov 1;58(21):4811-6.

Tatsuka M, Sato S, Kitajima S, Suto S, Kawai H, Miyauchi M, Ogawa I, Maeda M, Ota T, Takata T. Overexpression of Aurora-A potentiates HRAS-mediated oncogenic transformation and is implicated in oral carcinogenesis. Oncogene. 2005 Feb 3;24(6):1122-7.

Taveras AG, Remiszewski SW, Doll RJ, Cesarz D, Huang EC, Kirschmeier P, Pramanik BN, Snow ME, Wang YS, del Rosario JD, Vibulbhan B, Bauer BB, Brown JE, Carr D, Catino J, Evans CA, Girijavallabhan V, Heimark L, James L, Liberles S, Nash C, Perkins L, Senior MM, Tsarbopoulos A, Webber SE. Ras oncoprotein inhibitors: the discovery of potent, ras nucleotide exchange inhibitors and the structural determination of a drug-protein complex. Bioorg Med Chem. 1997 Jan;5(1):125-33.

Tchatchou S, Wirtenberger M, Hemminki K, Sutter C, Meindl A, Wappenschmidt B, Kiechle M, Bugert P, Schmutzler RK, Bartram CR, Burwinkel B. Aurora kinases A and B and familial breast cancer risk. Cancer Lett. 2007 Mar 18;247(2):266-72.

Terada Y, Uetake Y, Kuriyama R. Interaction of Aurora-A and centrosomin at the microtubule-nucleating site in Drosophila and mammalian cells. J Cell Biol. 2003 Sep 1;162(5):757-63.

The Xenopus protein kinase pEg2 associates with the centrosome in a cell cycle-dependent manner, binds to the spindle microtubules and is involved in bipolar mitotic spindle assembly.

Thorgeirsson UP, Turpeenniemi-Hujanen T, Williams JE, Westin EH, Heilman CA, Talmadge JE, Liotta LA. NIH/3T3 cells transfected with human tumor DNA containing activated ras oncogenes express the metastatic phenotype in nude mice. Mol Cell Biol. 1985 Jan;5(1):259-62.

Thun M, Peto R, Boreham J, Lopez AD. Stages of the cigarette epidemic on entering its second century. Tob Control. 2012 Mar;21(2):96-101.

Tonon G, Wong KK, Maulik G, Brennan C, Feng B, Zhang Y, Khatry DB, Protopopov A, You MJ, Aguirre AJ, Martin ES, Yang Z, Ji H, Chin L, Depinho RA. High-resolution genomic profiles of human lung cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jul 5;102(27):9625-30.

Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. International variation in lung cancer mortality rates and trends among women. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2014 Jun;23(6):1025-36.

Tran KA, Cheng MY, Mitra A, Ogawa H, Shi VY, Olney LP, Kloxin AM, Maverakis E. MEK inhibitors and their potential in the treatment of advanced melanoma: the advantages of combination therapy. Drug Des Devel Ther. 2015 Dec 21;10:43-52.

Traynor AM, Hewitt M, Liu G, Flaherty KT, Clark J, Freedman SJ, Scott BB, Leighton AM, Watson PA, Zhao B, O'DWyer PJ, Wilding G. Phase I dose escalation study of MK-0457, a novel Aurora kinase inhibitor, in adult patients with advanced solid tumors. Cancer Chemother Pharmacol. 2011 Feb;67(2):305-14.

Trinh TB, Upadhyaya P, Qian Z, Pei D. Discovery of a Direct Ras Inhibitor by Screening a Combinatorial Library of Cell-Permeable Bicyclic Peptides. ACS Comb Sci. 2016 Jan 11;18(1):75-85.

Trueblood CE, Boyartchuk VL, Picologlou EA, Rozema D, Poulter CD, Rine J. The CaaX proteases, Afc1p and Rce1p, have overlapping but distinct substrate specificities. Mol Cell Biol. 2000 Jun;20(12):4381-92.

Tsai MY, Wiese C, Cao K, Martin O, Donovan P, Ruderman J, Prigent C, Zheng Y. A Ran signalling pathway mediated by the mitotic kinase Aurora A in spindle assembly. Nat Cell Biol. 2003 Mar;5(3):242-8.

Tseng TC, Chen SH, Hsu YP, Tang TK. Protein kinase profile of sperm and eggs: cloning and characterization of two novel testis-specific protein kinases (AIE1, AIE2) related to yeast and fly chromosome segregation regulators. DNA Cell Biol. 1998 Oct;17(10):823-33.

Tsou JH, Chang KC, Chang-Liao PY, Yang ST, Lee CT, Chen YP, Lee YC, Lin BW, Lee JC, Shen MR, Chuang CK, Chang WC, Wang JM, Hung LY. Aberrantly expressed AURKC enhances the transformation and tumourigenicity of epithelial cells. J Pathol. 2011 Oct;225(2):243-54.

Tsuchiya M, Katagiri N, Kuroda T, Kishimoto H, Nishimura K, Kumazawa T, et al. Critical role of the nucleolus in activation of the p53-dependent postmitotic checkpoint. Biochem Biophys Res Commun. 2011;407:378–82.

Tuveson DA, Shaw AT, Willis NA, Silver DP, Jackson EL, Chang S, Mercer KL, Grochow R, Hock H, Crowley D, Hingorani SR, Zaks T, King C, Jacobetz MA, Wang L, Bronson RT, Orkin SH, DePinho RA, Jacks T. Endogenous oncogenic K-ras(G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects. Cancer Cell. 2004 Apr;5(4):375-87.

Uitdehaag JC, de Roos JA, van Doornmalen AM, Prinsen MB, Spijkers-Hagelstein JA, de Vetter JR, de Man J, Buijsman RC, Zaman GJ. Selective Targeting of CTNBB1-, KRAS- or MYC-Driven Cell Growth by Combinations of Existing Drugs. PLoS One. 2015 May 27;10(5):e0125021.

Urano T, Emkey R, Feig LA. Ral-GTPases mediate a distinct downstream signaling pathway from Ras that facilitates cellular transformation. EMBO J. 1996 Feb 15;15(4):810-6.

Vader G, Lens SM. The Aurora kinase family in cell division and cancer. Biochim Biophys Acta. 2008 Sep;1786(1):60-72.

van Biesen T, Hawes BE, Luttrell DK, Krueger KM, Touhara K, Porfiri E, Sakaue M, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Receptor-tyrosine-kinase- and G beta gamma-mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. Nature. 1995 Aug 31;376(6543):781-4.

Van Cutsem E, van de Velde H, Karasek P, Oettle H, Vervenne WL, Szawlowski A, Schoffski P, Post S, Verslype C, Neumann H, Safran H, Humblet Y, Perez Ruixo J, Ma Y, Von Hoff D. Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer. J Clin Oncol. 2004 Apr 15;22(8):1430-8.

van Vugt MA, Brás A, Medema RH. Polo-like kinase-1 controls recovery from a G2 DNA damage-induced arrest in mammalian cells. Mol Cell. 2004 Sep 10;15(5):799-811.

van Weeren PC, de Bruyn KM, de Vries-Smits AM, van Lint J, Burgering BM. Essential role for protein kinase B (PKB) in insulin-induced glycogen synthase kinase 3 inactivation. Characterization of dominant-negative mutant of PKB. J Biol Chem. 1998 May 22;273(21):13150-6.

Vanhaesebroeck B, Leevers SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ, Waterfield MD. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. Annu Rev Biochem. 2001;70:535-602.

Vasan N, Boyer JL, Herbst RS. A RAS renaissance: emerging targeted therapies for KRAS-mutated non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 2014 Aug 1;20(15):3921-30.

Vennepureddy A, Thumallapally N, Motilal Nehru V, Atallah JP, Terjanian T. Novel Drugs and Combination Therapies for the Treatment of Metastatic Melanoma. J Clin Med Res. 2016 Feb;8(2):63-75.

Vetter IR, Wittinghofer A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. Science. 2001 Nov 9;294(5545):1299-304.

Vicent S, Chen R, Sayles LC, et al. Wilms tumor 1 (WT1) regulates KRAS-driven oncogenesis and senescence in mouse and human models.The Journal of Clinical Investigation. 2010;120(11):3940-3952.

Vigil D, Cherfils J, Rossman KL, Der CJ. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? Nat Rev Cancer. 2010 Dec;10(12):842-57.

Vigil D, Martin TD, Williams F, Yeh JJ, Campbell SL, Der CJ. Aberrant overexpression of the Rgl2 Ral small GTPase-specific guanine nucleotide exchange factor promotes pancreatic cancer growth through Ral-dependent and Ral-independent mechanisms. J Biol Chem. 2010 Nov 5;285(45):34729-40.

Vigneron S, Prieto S, Bernis C, Labbé JC, Castro A, Lorca T. Kinetochore localization of spindle checkpoint proteins: who controls whom? Mol Biol Cell. 2004 Oct;15(10):4584-96.

Vischioni B, Oudejans JJ, Vos W, Rodriguez JA, Giaccone G. Frequent overexpression of aurora B kinase, a novel drug target, in non-small cell lung carcinoma patients. Mol Cancer Ther. 2006 Nov;5(11):2905-13.

Vitale-Cross L, Amornphimoltham P, Fisher G, Molinolo AA, Gutkind JS. Conditional expression of K-ras in an epithelial compartment that includes the stem cells is sufficient to promote squamous cell carcinogenesis. Cancer Res. 2004 Dec 15;64(24):8804-7.

Vo U, Vajpai N, Flavell L, Bobby R, Breeze AL, Embrey KJ, Golovanov AP. Monitoring Ras Interactions with the Nucleotide Exchange Factor Sos using Site-specific NMR Reporter Signals and Intrinsic Fluorescence. J Biol Chem. 2015 Nov 12. pii: jbc.M115.691238.

Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. Science. 2013 Mar 29;339(6127):1546-58.

Voice JK, Klemke RL, Le A, Jackson JH. Four human ras homologs differ in their abilities to activate Raf-1, induce transformation, and stimulate cell motility. J Biol Chem. 1999 Jun 11;274(24):17164-70.

Wadsworth P. TPX2. Curr Biol. 2015 Dec 21;25(24):R1156-8.

Wahlstrom AM, Cutts BA, Karlsson C, Andersson KM, Liu M, Sjogren AK, Swolin B, Young SG, Bergo MO. Rce1 deficiency accelerates the development of K-RAS-induced myeloproliferative disease. Blood. 2007 Jan 15;109(2):763-8.

Wahlstrom AM, Cutts BA, Liu M, Lindskog A, Karlsson C, Sjogren AK, Andersson KM, Young SG, Bergo MO. Inactivating Icmt ameliorates K-RAS-induced myeloproliferative disease. Blood. 2008 Aug 15;112(4):1357-65.

Wan Y, Huang A, Yang Y, Xie G, Chen X, Hu J, Chen X, Yang L, Li J, Chen L, Jiang Y, Zhao X, Wei Y, Deng H. A vector-based short hairpin RNA targeting Aurora A inhibits breast cancer growth. Int J Oncol. 2010 May;36(5):1121-8.

Wang J, Yi S, Zhou J, Zhang Y, Guo F. The NF-κB subunit RelB regulates the migration and invasion abilities and the radio-sensitivity of prostate cancer cells. Int J Oncol. 2016 Apr 25.

Wang JY, Lian ST, Chen YF, Yang YC, Chen LT, Lee KT, Huang TJ, Lin SR. Unique K-ras mutational pattern in pancreatic adenocarcinoma from Taiwanese patients. Cancer Lett. 2002 Jun 28;180(2):153-8.

Wang K, Terai K, Peng W, Rouyanian A, Liu J, Roby KF, Wise AL, Ezzeldin M, Larson J, Woo RA, Lialyte K, Farassati F. The role of RalA in biology and therapy of ovarian cancer. Oncotarget. 2013 Dec 10.

Wang K, Yuen ST, Xu J, Lee SP, Yan HH, Shi ST, Siu HC, Deng S, Chu KM, Law S, Chan KH, Chan AS, Tsui WY, Ho SL, Chan AK, Man JL, Foglizzo V, Ng MK, Chan AS, Ching YP, Cheng GH, Xie T, Fernandez J, Li VS, Clevers H, Rejto PA, Mao M, Leung SY. Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. Nat Genet. 2014 Jun;46(6):573-82.

Wang R, Ke ZF, Wang F, Zhang WH, Wang YF, Li SH, Wang LT. GOLPH3 overexpression is closely correlated with poor prognosis in human non-small cell lung cancer and mediates its metastasis through upregulating MMP-2 and MMP-9. Cell Physiol Biochem. 2015;35(3):969-82.

Wang S, Wang Z2. Meta-analysis of epidermal growth factor receptor and KRAS gene status between primary and corresponding metastatic tumours of non-small cell lung cancer. Clin Oncol (R Coll Radiol). 2015 Jan;27(1):30-9.

Wang W, Fang G, Rudolph J. Ras inhibition via direct Ras binding--is there a path forward? Bioorg Med Chem Lett. 2012 Sep 15;22(18):5766-76.

Wang XQ, Li H, Van Putten V, Winn RA, Heasley LE, Nemenoff RA. Oncogenic K-Ras regulates proliferation and cell junctions in lung epithelial cells through induction of cyclooxygenase-2 and activation of metalloproteinase-9. Mol Biol Cell. 2009 Feb;20(3):791-800.

Waqar SN, Gopalan PK, Williams K, Devarakonda S, Govindan R. A phase I trial of sunitinib and rapamycin in patients with advanced non-small cell lung cancer. Chemotherapy. 2013;59(1):8-13.

Warner SL, Munoz RM, Stafford P, Koller E, Hurley LH, Von Hoff DD, Han H. Comparing Aurora A and Aurora B as molecular targets for growth inhibition of pancreatic cancer cells. Mol Cancer Ther. 2006 Oct;5(10):2450-8.

Watzinger F, Lion T. Ras family. Atlas Gent Cytogenet Oncol Haematol. 1999. Available at: http://atlasgeneticsoncology.org/Deep/Ras.html.

Wei Y, Mizzen CA, Cook RG, Gorovsky MA, Allis CD. Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in Tetrahymena. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Jun 23;95(13):7480-4.

Wei Y, Yu L, Bowen J, Gorovsky MA, Allis CD. Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. Cell. 1999 Apr 2;97(1):99-109.

Weiss FU, Daub H, Ullrich A. Novel mechanisms of RTK signal generation. Curr Opin Genet Dev. 1997 Feb;7(1):80-6.

Westerman KA, Leboulch P. Reversible immortalization of mammalian cells mediated by retroviral transfer and site-specific recombination. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Aug 20;93(17):8971-6.

White E. Exploiting the bad eating habits of Ras-driven cancers. Genes Dev. 2013 Oct 1;27(19):2065-71.

Whyte DB, Kirschmeier P, Hockenberry TN, Nunez-Oliva I, James L, Catino JJ, Bishop WR, Pai JK. K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein transferase inhibitors. J Biol Chem. 1997 May 30;272(22):14459-64.

Wigelt B, Peterse JL, van't Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. Nature Ver. 2005:591-602.

Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M, Cao Y, Shujath J, Gawlak S, Eveleigh D, Rowley B, Liu L, Adnane L, Lynch M, Auclair D, Taylor I, Gedrich R, Voznesensky A, Riedl B, Post LE, Bollag G, Trail PA. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. Cancer Res. 2004 Oct 1;64(19):7099-109.

Wilkinson RW, Odedra R, Heaton SP, Wedge SR, Keen NJ, Crafter C, Foster JR, Brady MC, Bigley A, Brown E, Byth KF, Barrass NC, Mundt KE, Foote KM, Heron NM, Jung FH, Mortlock AA, Boyle FT, Green S. AZD1152, a selective inhibitor of Aurora B kinase, inhibits human tumor xenograft growth by inducing apoptosis. Clin Cancer Res. 2007 Jun 15;13(12):3682-8.

Winter-Vann AM, Baron RA, Wong W, dela Cruz J, York JD, Gooden DM, Bergo MO, Young SG, Toone EJ, Casey PJ. A small-molecule inhibitor of isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase with antitumor activity in cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Mar 22;102(12):4336-41.

Wislez M, Spencer ML, Izzo JG, Juroske DM, Balhara K, Cody DD, Price RE, Hittelman WN, Wistuba II, Kurie JM. Inhibition of mammalian target of rapamycin reverses alveolar epithelial neoplasia induced by oncogenic K-ras. Cancer Res. 2005 Apr 15;65(8):3226-35.

Witkowski L, Carrot-Zhang J, Albrecht S, Fahiminiya S, Hamel N, Tomiak E, Grynspan D, Saloustros E, Nadaf J, Rivera B, Gilpin C, Castellsagué E, Silva-Smith R, Plourde F, Wu M, Saskin A, Arseneault M, Karabakhtsian RG, Reilly EA, Ueland FR, Margiolaki A, Pavlakis K, Castellino SM, Lamovec J, Mackay HJ, Roth LM, Ulbright TM, Bender TA, Georgoulias V, Longy M, Berchuck A, Tischkowitz M, Nagel I, Siebert R, Stewart CJ, Arseneau J, McCluggage WG, Clarke BA, Riazalhosseini Y, Hasselblatt M, Majewski J, Foulkes WD28. Germline and somatic SMARCA4 mutations characterize small cell carcinoma of the ovary, hypercalcemic type. Nat Genet. 2014 May;46(5):438-43.

Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjöblom T, Leary RJ, Shen D, Boca SM, Barber T, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Dezso Z, Ustyanksky V, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Karchin R, Wilson PA, Kaminker JS, Zhang Z, Croshaw R, Willis J, Dawson D, Shipitsin M, Willson JK, Sukumar S, Polyak K, Park BH, Pethiyagoda CL, Pant PV, Ballinger DG, Sparks AB, Hartigan J, Smith DR, Suh E, Papadopoulos N, Buckhaults P, Markowitz SD, Parmigiani G, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. Science. 2007 Nov 16;318(5853):1108-13.

Wu J, Yang L, Shan Y, Cai C, Wang S, Zhang H. AURKA promotes cell migration and invasion of head and neck squamous cell carcinoma through regulation of the AURKA/Akt/FAK signaling pathway. Oncol Lett. 2016 Mar;11(3):1889-1894.

Wu JC, Chen TY, Yu CT, Tsai SJ, Hsu JM, Tang MJ, Chou CK, Lin WJ, Yuan CJ, Huang CY. Identification of V23RalA-Ser194 as a critical mediator for Aurora-A-induced cellular motility and transforming by small pool expression screening. J Biol Chem. 2005 Mar 11;280(10):9013-22.

Xiang T, Xia X, Yan W. Expression of Matrix Metalloproteinases-2/-9 is Associated With Microvessel Density in Pancreatic Cancer. Am J Ther. 2016 Feb 5.

Xing Z, Gao S, Duan Y, Han H, Li L, Yang Y, Li Q. Delivery of DNAzyme targeting aurora kinase A to inhibit the proliferation and migration of human prostate cancer. Int J Nanomedicine. 2015 Sep 9;10:5715-27.

Xu HT, Ma L, Qi FJ, Liu Y, Yu JH, Dai SD, Zhu JJ, Wang EH. Expression of serine threonine kinase 15 is associated with poor differentiation in lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. Pathol Int. 2006 Jul;56(7):375-80.

Xu J, Hedberg C, Dekker FJ, Li Q, Haigis KM, Hwang E, Waldmann H, Shannon K. Inhibiting the palmitoylation/depalmitoylation cycle selectively reduces the growth of hematopoietic cells expressing oncogenic Nras. Blood. 2012 Jan 26;119(4):1032-5.

Xu J, Huang L, Li J. DNA aneuploidy and breast cancer: a meta-analysis of 141,163 cases. Oncotarget. 2016 Aug 9.

Xu J, Yue CF, Zhou WH, Qian YM, Zhang Y, Wang SW, Liu AW, Liu Q. Aurora-A contributes to cisplatin resistance and lymphati metastasis in non-small cell lung cancer and predicts poor prognosis. J Transl Med. 2014 Jul 31;12:200.

Xu Y, Liu H, Chen J, Zhou Q. Acquired resistance of lung adenocarcinoma to EGFR-tyrosine kinase inhibitors gefitinib and erlotinib. Cancer Biol Ther. 2010 Apr 15;9(8):572-82.

Yamada T, Tsuda M, Wagatsuma T, Fujioka Y, Fujioka M, Satoh AO, Horiuchi K, Nishide S, Nanbo A, Totsuka Y, Haga H, Tanaka S, Shindoh M, Ohba Y. Receptor activator of NF-κB ligand induces cell adhesion and integrin α2 expression via NF-κB in head and neck cancers. Sci Rep. 2016 Mar 24;6:23545.

Yamanashi Y, Baltimore D. Identification of the Abl- and rasGAP-associated 62 kDa protein as a docking protein, Dok. Cell. 1997 Jan 24;88(2):205-11.

Yan C, Jones DN, Theodorescu D. Drugging the Ral GTPase. Small GTPases. 2015;6(3):157-9.

Yan L, Li S, Xu C, Zhao X, Hao B, Li H, Qiao B. Target protein for Xklp2 (TPX2), a microtubule-related protein, contributes to malignant phenotype in bladder carcinoma. Tumour Biol. 2013 Dec;34(6):4089-100.

Yang G, Mercado-Uribe I, Multani AS, Sen S, Shih IeM, Wong KK, Gershenson DM, Liu J. RAS promotes tumorigenesis through genomic instability induced by imbalanced expression of Aurora-A and BRCA2 in midbody during cytokinesis. Int J Cancer. 2013 Jul 15;133(2):275-85.

Yang H, He L, Kruk P, Nicosia SV, Cheng JQ. Aurora-A induces cell survival and chemoresistance by activation of Akt through a p53-dependent manner in ovarian cancer cells. Int J Cancer. 2006 Nov 15;119(10):2304-12.

Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy. Nat Cell Biol. 2010 Sep;12(9):814-22.

Ying H, Kimmelman AC, Lyssiotis CA, Hua S, Chu GC, Fletcher-Sananikone E, Locasale JW, Son J, Zhang H, Coloff JL, Yan H, Wang W, Chen S, Viale A, Zheng H, Paik JH, Lim C, Guimaraes AR, Martin ES, Chang J, Hezel AF, Perry SR, Hu J, Gan B, Xiao Y, Asara JM, Weissleder R, Wang YA, Chin L, Cantley LC, DePinho RA. Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. Cell. 2012 Apr 27;149(3):656-70.

Yokoyama T, Goto H, Izawa I, Mizutani H, Inagaki M. Aurora-B and Rho-kinase/ROCK, the two cleavage furrow kinases, independently regulate the progression of cytokinesis: possible existence of a novel cleavage furrow kinase phosphorylates ezrin/radixin/moesin (ERM). Genes Cells. 2005 Feb;10(2):127-37.

Yoon YK, Kim HP, Han SW, Oh do Y, Im SA, Bang YJ, Kim TY. KRAS mutant lung cancer cells are differentially responsive to MEK inhibitor due to AKT or STAT3 activation: implication for combinatorial approach. Mol Carcinog. 2010 Apr;49(4):353-62.

Youlden DR, Cramb SM, Baade PD. The International Epidemiology of Lung Cancer: geographical distribution and secular trends. J Thorac Oncol. 2008 Aug;3(8):819-31.

Yu JJ, Zhou LD, Zhao TT, Bai W, Zhou J, Zhang W. Knockdown of Aurora-B inhibits the growth of non-small cell lung cancer A549 cells. Oncol Lett. 2015 Sep;10(3):1642-1648.

Yu Y, Luk F, Yang JL, Walsh WR. Ras/Raf/MEK/ERK pathway is associated with lung metastasis of osteosarcoma in an orthotopic mouse model. Anticancer Res. 2011 Apr;31(4):1147-52.

Zaanan A, Okamoto K, Kawakami H, Khazaie K, Huang S, Sinicrope FA. The Mutant KRAS Gene Up-regulates BCL-XL Protein via STAT3 to Confer Apoptosis Resistance That Is Reversed by BIM Protein Induction and BCL-XL Antagonism. J Biol Chem. 2015 Sep 25;290(39):23838-49.

Zeitlin SG, Shelby RD, Sullivan KF. CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis. J Cell Biol. 2001 Dec 24;155(7):1147-57.

Zeng WF, Navaratne K, Prayson RA, Weil RJ. Aurora B expression correlates with aggressive behaviour in glioblastoma multiforme. J Clin Pathol. 2007 Feb;60(2):218-21.

Zhang H, Chen X, Liu B, Zhou L. Effects of stable knockdown of Aurora kinase A on proliferation, migration, chromosomal instability, and expression of focal adhesion kinase and matrix metalloproteinase-2 in HEp-2 cells. Mol Cell Biochem. 2011 Nov;357(1-2):95-106.

Zhang H, Chen XH, Cai CP, Wang SL, Liu BY, Zhou L. Suppression of Aurora-A by RNA interference inhibits laryngeal cancer Hep-2 cell growth. Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi. 2012 Jan;47(1):58-63.

Zhang J, Wan L, Dai X, Sun Y, Wei W. Functional characterization of Anaphase Promoting Complex/Cyclosome (APC/C) E3 ubiquitin ligases in tumorigenesis. Biochimica et biophysica acta. 2014;1845(2):277-293.

Zhang Y, Mukhopadhyay T, Donehower LA, Georges RN, Roth JA. Retroviral vector-mediated transduction of K-ras antisense RNA into human lung cancer cells inhibits expression of the malignant phenotype. Hum Gene Ther. 1993 Aug;4(4):451-60.

Zhao H, Liu P, Zhang R, Wu M, Li D, Zhao X, Zhang C, Jiao B, Chen B, Chen Z, Ren R. Roles of palmitoylation and the KIKK membrane-targeting motif in leukemogenesis by oncogenic KRAS4A. J Hematol Oncol. 2015 Dec 30;8(1):132.

Zheng W, Tayyari F, Gowda GA, Raftery D, McLamore ES, Porterfield DM, Donkin SS, Bequette B, Teegarden D. Altered glucose metabolism in Harvey-ras transformed MCF10A cells. Mol Carcinog. 2015 Feb;54(2):111-20.

Zhou H, Kuang J, Zhong L, Kuo WL, Gray JW, Sahin A, Brinkley BR, Sen S. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. Nat Genet. 1998 Oct;20(2):189-93.

Zhou LD, Xion X, Long XH, Liu ZL, Huang SH, Zhang W. RNA interference-mediated knockdown of Aurora-B alters the metastatic behavior of A549 cells via modulation of the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway. Oncol Lett. 2014 Nov;8(5):2063-68.

Zhou N, Singh K, Mir MC, Parker Y, Lindner D, Dreicer R, Ecsedy JA, Zhang Z, Teh BT, Almasan A, Hansel DE. The investigational Aurora kinase A inhibitor MLN8237 induces defects in cell viability and cell-cycle progression in malignant bladder cancer cells in vitro and in vivo. Clin Cancer Res. 2013 Apr 1;19(7):1717-28.

Zhou WQ, Zhang LJ, Yang HZ, Feng ZQ, Li Y. The anti-tumor activity and molecular mechanisms of an Aurora kinase inhibitor ZLJ213 in suppressing colon cancer growth. Yao Xue Xue Bao. 2015 Jul;50(7):854-60.

Zhu LB, Jiang J, Zhu XP, Wang TF, Chen XY, Luo QF, Shu Y, Liu ZL, Huang SH. Knockdown of Aurora-B inhibits osteosarcoma cell invasion and migration via modulating PI3K/Akt/NF-κB signaling pathway. Int J Clin Exp Pathol. 2014 Jun 15;7(7):3984-91.

Zorba A, Buosi V, Kutter S, Kern N, Pontiggia F, Cho YJ, Kern D. Molecular mechanism of Aurora A kinase autophosphorylation and its allosteric activation by TPX2. Elife. 2014 May 27;3:e02667.

Zuber J, Tchernitsa OI, Hinzmann B, Schmitz AC, Grips M, Hellriegel M, Sers C, Rosenthal A, Schäfer R. A genome-wide survey of RAS transformation targets. Nat Genet. 2000 Feb;24(2):144-52.

8. SÚMULA CURRICULAR

Edmilson Ozorio dos Santos
Brasileiro, 30.

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2013 - 2017. **Doutorado em Ciências Biológicas (Bioquímica).**
Instituto de Química, Universidade de São Paulo, USP.
Orientador: Daniela Sanchez Bassères.

2015 - 2016. **Doutorado Sanduíche no Exterior.**
Consiglio Nazionale delle Ricerche, Università di Roma "La Sapienza", Itália.
Orientador: Dra. Giulia Guarguaglini.

2011 - 2013. **Mestrado em Ciências Biológicas (Bioquímica).**
Instituto de Química, Universidade de São Paulo, USP.
Orientador: Daniela Sanchez Bassères.

2005 - 2010. **Graduação em Ciências Farmacêuticas e Bioquímicas.**
Faculdades Oswaldo Cruz, FOC.

DEMAIS ATIVIDADES ACADÊMICAS

Monitorias em cursos de Pós-Graduação.

2015. IQ-USP. X Curso de Inverno. Temas avançados em Bioquímica e Biologia Molecular.
2013. IQ-USP. VIII Curso de Inverno. Temas avançados em Bioquímica e Biologia Molecular.
2012. IQ-USP. VII Curso de Inverno. Temas avançados de Bioquímica e Biologia Molecular.

Monitorias em Cursos de Graduação.

2014. IQ-USP. Bioquímica Experimental.
2014. IQ-USP. X Curso de Verão em Bioquímica e Biologia Molecular.
2013. IQ-USP. Bioquímica Experimental.
2013. IQ-USP. Bioquímica Experimental Avançada.
2012. IQ-USP. Biologia Molecular.

APRESENTAÇÕES DE TRABALHOS

2016. EMBO Workshop: Chromosome Segregation and Aneuploidy. Regulatory mechanisms of the Aurora - A/TPX2 complex: influence on chromosome stability and implications for cancer.

2016. FISV 2016 XIV Congress. Regulatory mechanisms of the Aurora - A/TPX2 complex: influence on chromosome stability and implications for cancer.

2016. IBPM Annual Meeting. From basic research to technology transfer. The Aurora-A/TPX2 complex in chromosome stability, tumorigenesis and anticancer therapy.

2016. SIBBM Seminar. From Single Cell Analysis to Precision Medicine". Aurora - A inhibition for anti - cancer therapies: canonical and innovative approaches.

2015. 23rd International Union for Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) Congress and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology - SBBq. Targeting Aurora A and Aurora B in lung cancer cells reduces KRAS-dependent oncogenicity.

2015. EACR-AACR-SIC Special Conference. Targeting Aurora A and Aurora B in lung cancer cells reduces KRAS-dependent oncogenicity.

2014. 26th EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer. Aurora Kinases: Potential Therapeutic Targets in KRAS-mediated lung cancer.

2014. XVII Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology (SBBC). Aurora kinase targeting in lung cancer cells reduces KRAS-dependent oncogenicity.

2013. Anual Meeting of the American Association for Cancer Research (AACR). Aurora Kinases: Potential Target in KRAS-Induced Lung Cancer.

2012. I Seminário Internacional sobre Indicação Farmacêutica. 2012.

2012. XLI Anual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). Aurora Kinases: Potential Therapeutic Targets in K-Ras-Induced Lung Cancer.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

2016. sos Santos EO, Carneiro-Lobo TC, Aoki MN, Levantini E, Bassères DS. Aurora kinase targeting in lung cancer reduces KRAS-induced transformation. Mol Cancer. 2016 Feb 3;15:12. doi: 10.1186/s12943-016-0494-6.

PROFICIÊNCIA EM IDIOMAS

Inglês (fluente);
Italiano (fluente);
Russo (básico).

dos Santos *et al. Molecular Cancer* (2016) 15:12
DOI 10.1186/s12943-016-0494-6

Molecular Cancer

RESEARCH Open Access

Aurora kinase targeting in lung cancer reduces KRAS-induced transformation

Edmilson Ozorio dos Santos[1], Tatiana Correa Carneiro-Lobo[1], Mateus Nobrega Aoki[1], Elena Levantini[2,3] and Daniela Sanchez Bassères[1*]

Abstract

Background: Activating mutations in KRAS are prevalent in lung cancer and have been causally linked to the oncogenic process. However, therapies targeted to oncogenic RAS have been ineffective to date and identification of KRAS targets that impinge on the oncogenic phenotype is warranted. Based on published studies showing that mitotic kinases Aurora A (AURKA) and B (AURKB) cooperate with oncogenic RAS to promote malignant transformation and that AURKA phosphorylates RAS effector pathway components, the aim of this study was to investigate whether AURKA and AURKB are KRAS targets in lung cancer and whether targeting these kinases might be therapeutically beneficial.

Methods: In order to determine whether oncogenic KRAS induces Aurora kinase expression, we used qPCR and western blotting in three different lung cell-based models of gain- or loss-of-function of KRAS. In order to determine the functional role of these kinases in KRAS-induced transformation, we generated KRAS-positive A549 and H358 cells with stable and inducible shRNA-mediated knockdown of AURKA or AURKB and evaluated transformation in vitro and tumor growth in vivo. In order to validate AURKA and/or AURKB as therapeutically relevant KRAS targets in lung cancer, we treated A549 and H358 cells, as well as two different lung cell based models of gain-of-function of KRAS with a dual Aurora kinase inhibitor and performed functional in vitro assays.

Results: We determined that KRAS positively regulates AURKA and AURKB expression. Furthermore, in KRAS-positive H358 and A549 cell lines, inducible knockdown of AURKA or AURKB, as well as treatment with a dual AURKA/AURKB inhibitor, decreased growth, viability, proliferation, transformation, and induced apoptosis in vitro. In addition, inducible shRNA-mediated knockdown of AURKA in A549 cells decreased tumor growth in vivo. More importantly, dual pharmacological inhibiton of AURKA and AURKB reduced growth, viability, transformation, and induced apoptosis in vitro in an oncogenic KRAS-dependent manner, indicating that Aurora kinase inhibition therapy can specifically target KRAS-transformed cells.

Conclusions: Our results support our hypothesis that Aurora kinases are important KRAS targets in lung cancer and suggest Aurora kinase inhibition as a novel approach for KRAS-induced lung cancer therapy.

Background

Activation of KRAS by mutation is a very common event in human malignancies. In spite of intensive investigation, KRAS-related malignancies currently lack effective therapies. Direct targeting of KRAS by blocking its post-translational prenylation has failed in clinical trials [1]. Targeting KRAS downstream effectors has also been challenging, as KRAS regulates a multitude of effectors that contribute to the oncogenic phenotype [2, 3]. It is likely that successful KRAS targeting will involve combined inhibition of specific key targets. Considering that targeting traditional KRAS effectors has so far had limited success [1, 4], the identification of novel KRAS targets that impinge on the oncogenic phenotype is warranted in order to increase the possibilities of combinatorial therapy design and achieve therapeutic efficacy.

Achieving therapeutic efficacy is particularly important in lung cancer, which is the leading cause of cancer-related deaths [5]. Even though effective targeted therapies

* Correspondence: basseres@iq.usp.br
[1]Department of Biochemistry, Chemistry Institute, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2016 dos Santos et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

have been developed for lung cancer, these therapies benefit a small percentage of patients because they target oncogenic events that are infrequent in lung cancer [6, 7]. KRAS mutations, however, are very common in lung cancer ranging from 30–50 % of patients and are associated with poor prognosis and therapy resistance [8, 9]. Nonetheless, effective targeted therapy options for lung cancer patients with KRAS mutations are currently lacking.

Aurora kinases A and B belong to a new family of serine/threonine kinases, which are essential regulators of mitosis [10, 11] and have been recently implicated in DNA repair [12, 13]. They are also overexpressed in a number of human cancers [14, 15], including lung cancers [16–19]. In addition, both kinases have been implicated in promoting oncogenesis [20–25]. Aurora A expression can transform cells and induce tumor formation in mice [24, 26] and Aurora B overexpression promotes lung carcinogenesis and increased invasiveness in vivo [25]. In addition, these kinases have been shown to promote genetic instability leading to aneuploidy [21, 26–29] and to block p53 function, thereby preventing cell apoptosis [30, 31]. Finally, these kinases have been shown to cooperate with RAS to induce malignant transformation [28, 32–37]. Even though these kinases are being investigated as therapeutic targets, and specific Aurora kinase inhibitors have been developed and are undergoing clinical trials for different malignancies [14, 15, 38], it is not known whether these kinases are KRAS targets in lung oncogenesis, or if targeting these kinases could lead to a therapeutic benefit for lung cancer patients harboring KRAS mutations.

In this study we investigated Aurora A and Aurora B as potential KRAS targets in lung cancer. We show, not only that, in lung cells, KRAS regulates Aurora A and B expression, but also that targeting these kinases in lung cells by different approaches reduces cell growth, proliferation and anchorage-independent growth, while at the same time it induces apoptosis. Interestingly, these effects were more pronounced in the presence of oncogenic $KRAS^{G12V}$, and Aurora inhibition had no effect on normal or tumorigenic cells without KRAS mutations. This suggests that Aurora kinase inhibition therapy can specifically target KRAS transformed cells. Finally, AURKA inhibition by RNA interference reduced lung tumor xenograft growth in vivo. In conclusion, our results support our hypothesis that Aurora kinases are important KRAS targets in lung cancer and suggest Aurora kinase inhibition as a novel and specific approach to be explored for KRAS-induced lung cancer therapy.

Results

Oncogenic KRAS induces Aurora A and Aurora B expression

Because both AURKA and AURKB can cooperate with RAS to promote malignant transformation [28, 32–37], and because AURKA can activate the RAS downstream effector RalA [39], we hypothesized that KRAS could promote Aurora kinase expression, as part of its oncogenic activity. In order to determine whether oncogenic KRAS regulates expression of AURKA or AURKB, we used three cell-based models. Initially, we used an isogenic pair consisting of immortalized primary pulmonary cells transformed or not with oncogenic KRAS [40]. KRAS-transformed SAKRAS cells express higher levels of RAS proteins in comparison with their non-transformed SALEB counterparts, as expected. Interestingly, SAKRAS cells also express higher levels of AURKA and AURKB (Fig. 1a). In order to determine if these increased Aurora kinase levels could reflect increased AURKA and AURKB transcription in SAKRAS cells, we performed RT-qPCR (Additional file 1: Methods) and found that, when

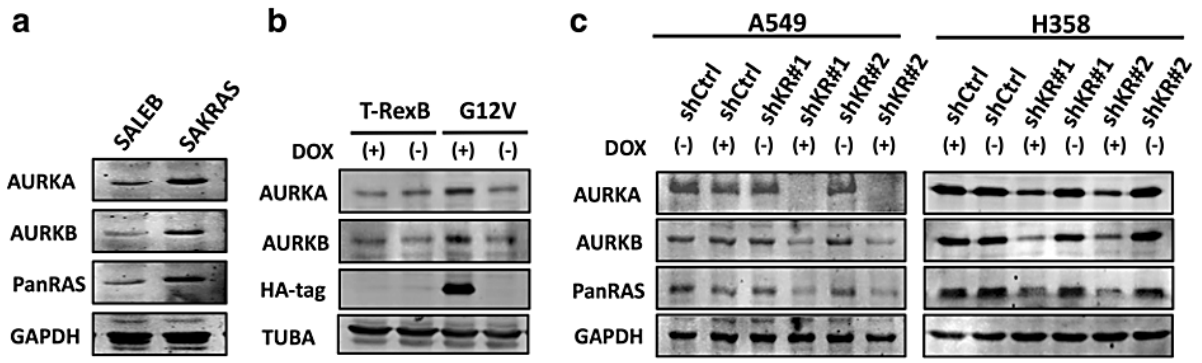


Fig. 1 KRAS induces expression of AURKA and AURKB in lung cells. **a** Protein lysates of SALEB and SAKRAS cells were submitted to western blotting with the indicated antibodies. **b** H1703-TrexB and H1703-G12V lung cancer cells were treated with 2 μg/mL doxycycline (DOX) for 24 h where indicated to induce KRAS expression. Subsequently, protein lysates were prepared and submitted to western blotting with the indicated antibodies. TUBA) anti-α-tubulin. **c** A549 and H358 stable cells with inducible expression of 2 different shRNAs targeting KRAS (shKR#1 and shKR#2) or a non-targeting shRNA (shCtrl) were treated with 2 μg/mL doxycycline (DOX) for 5 days to induce shRNA expression where indicated. Protein lysates were prepared and submitted to western blotting with the indicated antibodies

compared to SALEB cells, SAKRAS cells have, not only a higher expression of KRAS mRNA, but also a higher expression of AURKA and AURKB mRNAs (Additional file 2: Figure S1A). Therefore, these results show a correlation between KRAS and Aurora kinase expression in primary pulmonary cells.

In order to determine if KRAS can induce Aurora kinase expression, we used both gain-of-function and loss-of-function cell based models. For gain-of-function of KRAS, we used HA-tagged $KRAS^{G12V}$-inducible H1703 human lung cancer cells, that express oncogenic $KRAS^{G12V}$ upon doxycycline administration [41]. We observed that induction of $KRAS^{G12V}$ expression with doxycycline in H1703 cells, as assessed by immunoblotting with an anti-HA tag antibody, leads to increased AURKA and AURKB expression (Fig. 1b). These effects on Aurora kinase expression were not observed in doxycycline-treated empty vector control cells (H1703-TrexB cells), which do not express $KRAS^{G12V}$ (Fig. 1b). Similarly to what we observed in SAKRAS cells, induction of $KRAS^{G12V}$ expression in H1703 cells leads to increased AURKA and AURKB mRNA levels (Additional file 2: Figure S1B).

Next, we performed loss-of-function experiments using KRAS mutant H358 and A549 cell lines with doxycycline-inducible expression of shRNAs targeting KRAS. shRNA expression upon doxycycline administration was monitored by fluorescence microscopy for the red fluorescent reporter protein (Additional file 2: Figure S1C). Consistent with our previous results, inhibition of KRAS expression with two different shRNAs in both A549 and H358 cell lines is accompanied by a decrease in AURKA and AURKB expression (Fig. 1c). Again, KRAS, AURKA and AURKB expression is unchanged in A549 and H358 cells induced to express a non-targeting shRNA (Fig. 1c). Finally, this decrease in AURKA and AURKB protein levels is accompanied by a decrease in mRNA levels (Additional file 2: Figure S1D). Taken together, these results confirm that, in lung cells, AURKA and AURKB are KRAS targets, and strongly suggest that KRAS signaling upregulates AURKA and AURKB transcription or promotes AURKA and AURKB mRNA stability.

Targeting Aurora A and Aurora B reduces the oncogenic phenotype of KRAS-positive lung cancer cells

The above results, coupled to the fact the both AURKA and AURKB have been implicated in promoting the malignant phenotype [20–25], led us to hypothesize that AURKA and AURKB contribute to the oncogenic phenotype induced by KRAS. In order to test this hypothesis, we assessed if simultaneous inhibition of AURKA and AURKB activity with Aurora Kinase Inhibitor II (AI II), a dual Aurora kinase pharmacological inhibitor, would affect KRAS-positive lung cell oncogenicity.

Because AI II has higher affinity for AURKB [42, 43], we decided to investigate first if AI II can effectively inhibit AURKA activity under the conditions used in our experiments in order to validate dual inhibition of these kinases. AURKA activity was assessed by the level of autophosphorylation at threonine 288, which is required for AURKA activity [44, 45]. As can be seen in Fig. 2a, AI II inhibits AURKA autophosphorylation in a dose-dependent manner.

Treatment of KRAS-positive cancer cell lines with AI II effectively reduces, in a dose-dependent manner, cell growth (Fig. 2b), as well as the ability to form colonies under adherent conditions (Fig. 2c). This AI II-induced loss of viability was corroborated by MTT reduction-based assays, which show a similar dose-dependent reduction of cell viability (Additional file 3: Figure S2A).

In both cell lines, AI II treatment resulted in an accumulation of annexin V positive cells (Fig. 2d) and induced caspase 3 cleavage (Additional file 3: Figure S2B). In addition, AI II caused a reduction in the number of cells in S phase and caused an accumulation of cells in the G2 phase of the cell cycle (Fig. 2e). These results indicate that Aurora kinase inhibition in KRAS-positive cells not only reduces cell proliferation, but also promotes apoptosis.

One important cell property that is associated with the transformed phenotype is the ability of cells to grow in an anchorage-independent manner. As can be seen in Fig. 2f, AI II reduces, in a dose-dependent manner, the ability of both cell lines to form colonies under non-adherent conditions.

In order to determine the role of each individual Aurora kinase in promoting KRAS-induced oncogenesis, we performed loss-of-function experiments using KRAS mutant H358 and A549 cell lines with doxycycline-inducible expression of shRNAs targeting AURKA or AURKB independently (Additional file 2: Figure S1C and D). Consistent with our previous results, doxycycline administration in both cell lines leads, not only to effective inhibition of AURKA or AURKB expression with two different shRNAs each (Fig. 3a), but also to reduced growth (Fig. 3b) and reduced ability to form colonies under adherent conditions (Fig. 3c). Again, loss of viability was confirmed by MTT reduction-based assays (Additional file 3: Figure S2C). As expected, these effects are not seen in A549 and H358 cells induced to express a non-targeting shRNA control upon doxycycline administration.

Similar to what we observed with AI II treatment, shRNA-mediated knockdown of AURKA and AURKB was accompanied by a reduction of the ability of these cells to progress through the cell cycle, leading to accumulation at G2 (Fig. 3d), as well as increased levels of cleaved caspase 3 (Fig. 3e). Finally, AURKA or AURKB knockdown in these cells also reduced anchorage-independent growth (Fig. 3f).

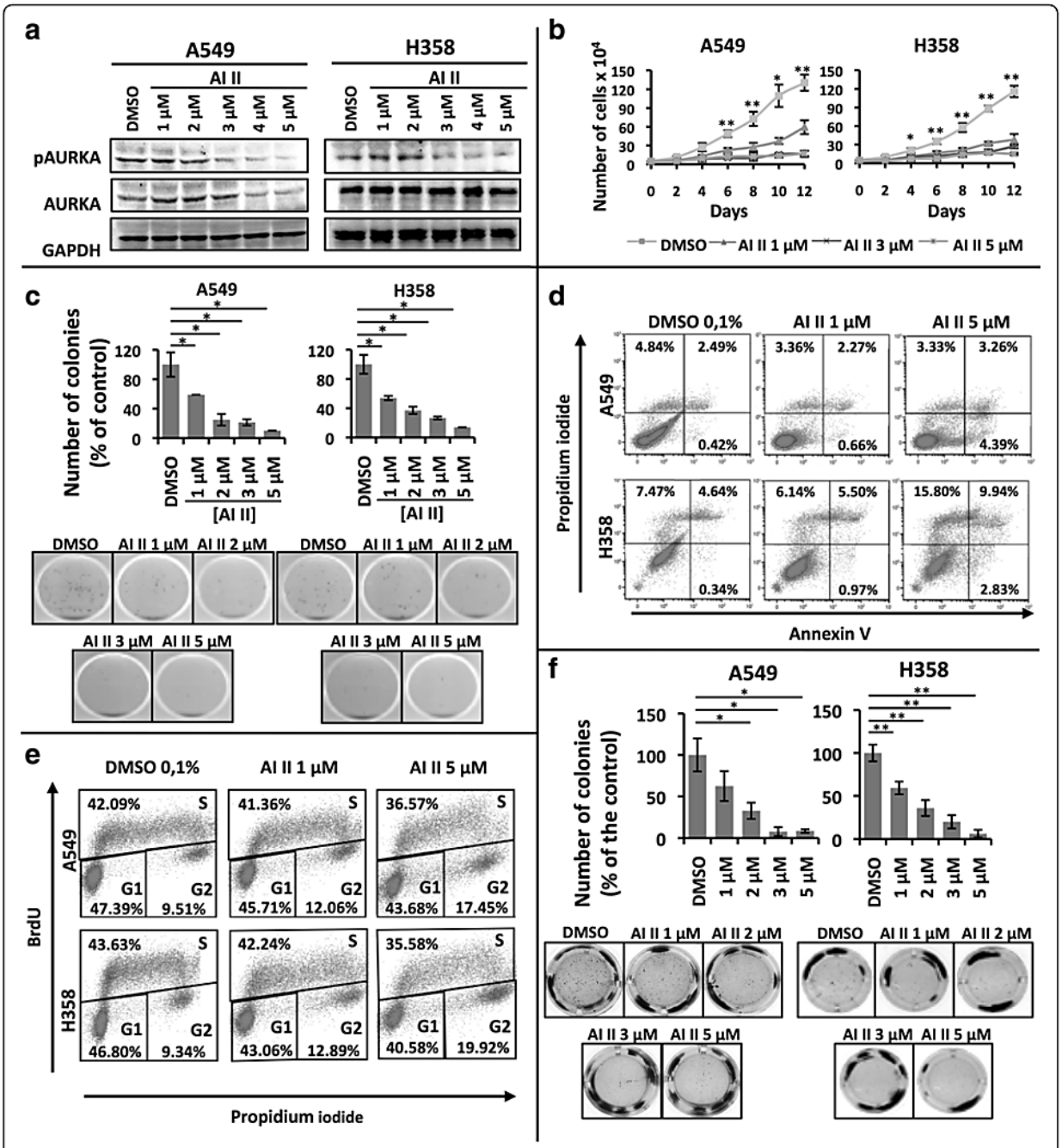


Fig. 2 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)
Fig. 2 Dual pharmacological inhibition of AURKA and AURKB decreases the transformed phenotype of KRAS-positive lung cells. **a** A549 and H358 cells were treated with 0.1 % DMSO or increasing concentrations of AI II as indicated for 72 h and protein lysates were prepared and submitted to Western blotting with the indicated antibodies. **b** Growth curve analysis of A549 and H358 cells treated with the indicated concentrations of AI II compared to control-treated cells (0.1 % DMSO) for the indicated times. **c** A549 and H358 cells were plated for clonogenic assays as described in methods and treated for 21 days with either 0.1 % DMSO or different concentrations of AI II as indicated. Colonies formed were stained with crystal violet and counted. Images shown are representative of three independent experiments. **d** A549 and H358 cells were treated with 0.1 % DMSO or increasing concentrations of AI II as indicated for 72 h, stained for Annexin V and propidium iodide (PI) as described in methods and Annexin V positive cells were analyzed by flow cytometry. **e** A549 and H358 cells were treated with 0.1 % DMSO or increasing concentrations of AI II as indicated for 72 h, cells were stained with BrdU and PI as described in methods, and cell cycle analysis was performed by flow cytometry. **f** Anchorage-independent growth was evaluated by plating A549 and H358 in soft agar as described in methods. Cells were then treated for 21 days with either 0.1 % DMSO or different concentrations of AI II as indicated. Colonies formed were stained with MTT and counted. Images shown are representative of three independent experiments. In all cases, statistical significance was determined when appropriate by Student's *t*-test (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$) by comparing AI II-treated vs. DMSO-treated samples. Error bars represent average ± 1 s.d

These results indicate that AURKA and AURKB inhibition reduces proliferation and promotes apoptosis, thereby leading to reduced growth and viability, as well as reduces the ability of KRAS-positive lung cancer cells to maintain a transformed phenotype.

shRNA-mediated inhibition of Aurora A expression reduces KRAS-induced tumor growth in vivo

In order to validate Aurora kinases as potential therapeutic targets for KRAS-induced lung cancer, it is important to demonstrate that Aurora kinase targeting reduces KRAS-driven tumor growth in vivo. Given that the results we obtained in vitro were similar for both AURKA and AURKB targeting, and given that AURKA has been more extensively implicated in promoting oncogenesis, we performed in vivo studies with KRAS mutant A549 cells with inducible inhibition of AURKA expression to evaluate the effect of inhibition of AURKA expression for KRAS-positive lung tumor xenograft growth.

For that purpose A549 cells with doxycycline-inducible expression of a shRNA targeting AURKA (A549-shAKA) or with doxycycline-inducible expression of a non-targeting shRNA (A549-shCtrl) were inoculated subcutaneously in nude mice. Doxycycline administration in mice inoculated with A549-shAKA cells significantly reduced tumor growth rate when compared to untreated mice inoculated with these cells, as well as to doxycycline-treated and untreated mice inoculated with A549-shCtrl cells (Fig. 4a). Consistently, doxycycline-treated A549-shAKA tumors were smaller (Fig. 4b), displayed reduced weight (Fig. 4c) and reduced AURKA expression (Fig. d). Nonetheless, AURKA inhibition did not lead to tumor regression (Fig. 4a). This is consistent with the fact that apoptotic cells were not detected in these tumors (data not shown).

Inhibition of Aurora kinase activity reduces the oncogenic properties of lung cells in a $KRAS^{G12V}$-dependent manner

In order to address if Aurora inhibition preferentially affects KRAS-transformed cells, we used our previously described cell-based models to assess the effects of pharmacological inhibition of Aurora kinase activity in the presence and absence of oncogenic KRAS expression.

As expected, SAKRAS cells grow faster than SALEB cells (Fig. 5a, left panel) and form more colonies under adherent conditions (Fig. 5b, left panel). Interestingly, treatment with 1uM AI II reduces growth and colony formation of SAKRAS cells without affecting the ability of untransformed SALEB cells to grow (Fig. 5a, left panel) and form colonies (Fig. 5b, left panel). In addition, only SAKRAS cells are able to form colonies in soft agar, a feature of transformed cells, and this ability is reduced by AI II treatment (Fig. 5c, left panel).

Similarly, induction of $KRAS^{G12V}$ expression by doxycycline in H1703-G12V cells leads to enhanced growth (Fig. 5a, right panel) and ability to form colonies both under adherent (Fig. 5b, right panel) and non-adherent (Fig. 5c, right panel) conditions. These increased abilities to grow and form colonies were not observed in H1703 T-RexB cells treated with doxycycline (Fig. 5a, b and c, middle panels), which do not express oncogenic KRAS. Interestingly, treatment with AI II abrogated the enhanced growth (Fig. 5a, right panel), colony formation (Fig. 5b, right panel) and anchorage-independent growth (Fig. 5c, right panel) of H1703 G12V cells induced to express $KRAS^{G12V}$ with doxycycline, but had no effect in uninduced H1703 G12V cells (Fig. 5a, b and c, right panels) or in H1703 T-RexB cells (Fig. 5a, b and c, middle panels). Again, loss of viability was confirmed by MTT reduction-based assays, whereby MTT reduction is decreased upon treatment with AI II only in cells expressing mutant $KRAS^{G12V}$ (Additional file 4: Figure S3A and B). Interestingly, as assessed by caspase 3 cleavage (Additional file 4: Figure S3C), or by Annexin V/PI staining (Additional file 4: Figure S3D), aurora kinase targeting with AI II preferentially increases apoptosis of $KRAS^{G12V}$-expressing H1703 cells.

These results show that Aurora inhibition primarily exerts anti-tumor effects in the presence of oncogenic $KRAS^{G12V}$, having little or no effect on normal cells or tumorigenic cells without KRAS mutations. This suggests that Aurora kinase inhibition therapy can preferentially target $KRAS^{G12V}$ transformed cells.

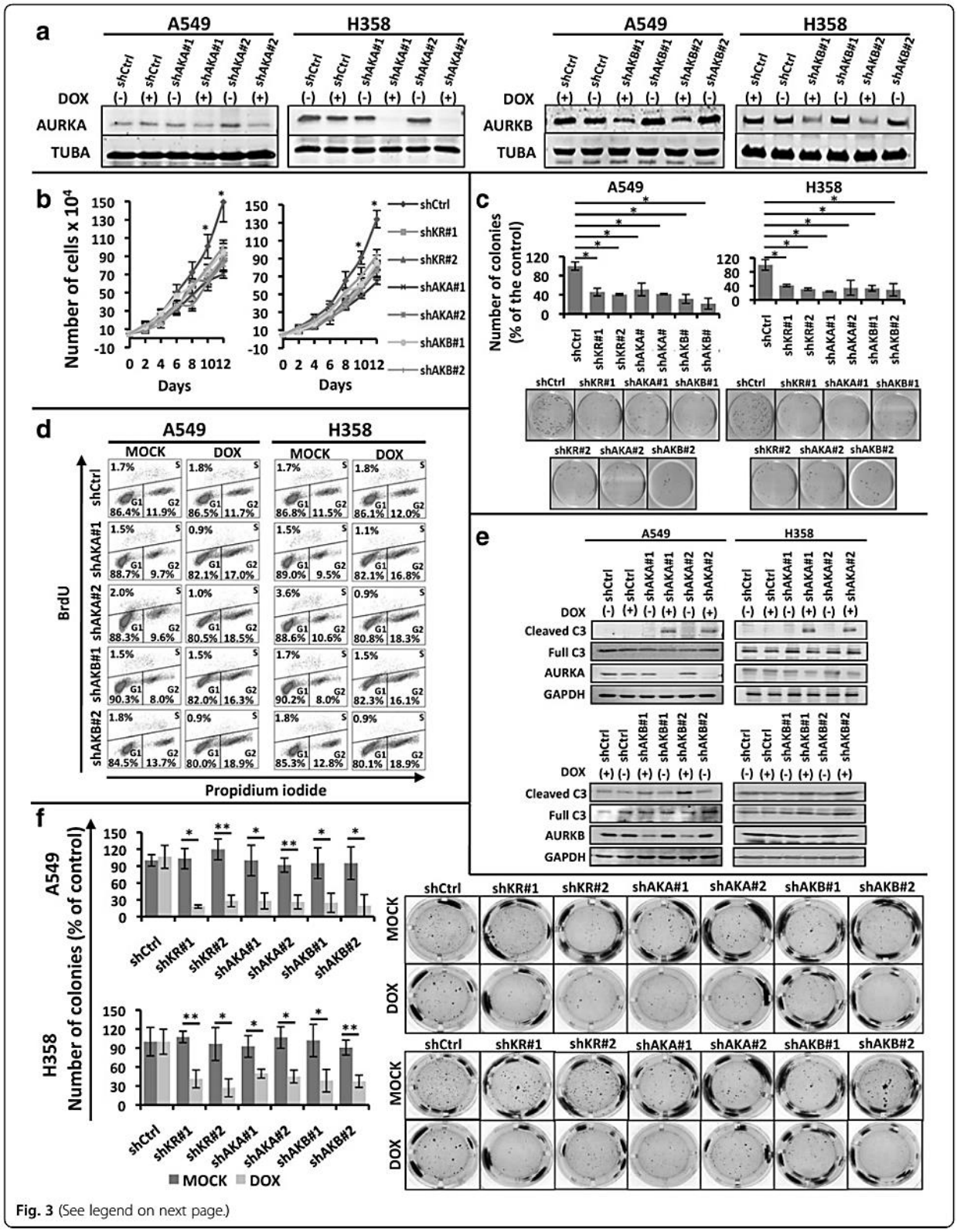


Fig. 3 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)
Fig. 3 shRNA-mediated knockdown of AURKA or AURKB decreases the transformed phenotype of KRAS-positive lung cells. Unless otherwise indicated, A549 and H358 stable cells with inducible expression of 2 different shRNAs targeting AURKA (shAKA#1 and shAKA#2), AURKB (shAKB#1 and shAKB#2) or a non-targeting shRNA (shCtrl) were either treated with 2 μg/mL doxycycline (DOX) for 5 days to induce shRNA expression or left untreated (MOCK). **a** Protein lysates of doxycycline-treated (+) and untreated (–) cells were submitted to western blotting with the indicated antibodies. TUBA) anti-α-tubulin. **b** Growth curve analysis of the indicated cells. All cells were treated with 2 μg/mL doxycycline (DOX) for the indicated times. **c** The indicated cells were plated for clonogenic assays as described in methods and treated for 21 days with 2 μg/mL doxycycline (DOX). Colonies formed were stained with crystal violet and counted. Images shown are representative of three independent experiments. **d** The indicated treated (DOX) or untreated (MOCK) cells were stained with BrdU and propidium iodide (PI) as described in methods, and cell cycle analysis was performed by flow cytometry. **e** Protein lysates of A549 and H358 stable cells with inducible expression of 2 different shRNAs targeting AURKA (shAKA#1 and #2), AURKB (shAKB#1 and #2) or a non-targeting shRNA (shCtrl), treated (+) or not (-) with 2 μg/mL doxycycline (DOX) for 5 days, were submitted to western blotting with the indicated antibodies. C3) anti-caspase 3. **f** Anchorage-independent growth was evaluated by plating the indicated cells in soft agar as described in methods. Cells were then treated for 21 days with 2 μg/mL doxycycline (DOX) or left untreated (MOCK). Colonies formed were stained with MTT and counted. Images shown are representative of three independent experiments. In all cases, statistical significance was determined when appropriate by Student's *t*-test (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$) and the groups being compared are indicated by horizontal bars

Discussion

In spite of recent studies that provide new promising strategies for targeting KRAS directly [1–4], effective therapies for KRAS-induced malignancies, including KRAS-induced lung cancer, are still unavailable. Targeting KRAS indirectly through its downstream effectors is also complicated by the number and crosstalk of pathways regulated by KRAS that contribute to the malignant phenotype [46, 47]. Effective indirect KRAS targeting is likely to rely on combined inhibition of critical targets, which may vary according to context. Therefore, a better understanding of the molecular pathways triggered by oncogenic KRAS in lung cancer is warranted, as it can identify new potential targets to be explored therapeutically.

In this work we demonstrated that AURKA and AURKB are potential new promising targets for KRAS-induced lung cancer therapy. Using three different cell-based models, we have shown that oncogenic KRAS positively regulates expression of AURKA and AURKB likely by regulating AURKA and AURKB transcription or mRNA stability (Fig. 1 and Additional file 2: Figure S1). An increase in Aurora A expression was also observed in a mouse model of malignant peripheral nerve sheath tumor caused by overexpression of $HRAS^{G12V}$ [37]. These results are consistent with the fact that RAS activation leads to phosphorylation and stabilization of the MYC transcription factor [48], which in turn binds to the AURKA and AURKB promoters and positively regulates their transcription [49]. These results are also supported by the observation that AURKA and AURKB are required for in vivo maintenance of MYC-induced tumors [49, 50].

Nevertheless, we cannot rule out that other mechanisms, both transcriptional and post-transcriptional, may be involved in the regulation of KRAS-induced AURKA and AURKB activity. Recently, Bowman et al. [51] reported that KRAS can induce phosphorylation of FADD by CK1α, and that phosphorylated FADD is, not only required for KRAS-induced lung tumorigenesis, but also that it interacts with AURKA. In addition, Yang et al. [28] demonstrated that, in ovarian cancer cells, oncogenic HRAS led to accumulation of AURKA protein possibly via inhibition of AURKA proteolysis. Interestingly, AURKA and AURKB expression levels have been used as diagnostic and prognostic markers in lung cancer [16–19, 52], suggesting that these kinases play a role in lung oncogenesis.

In order to investigate if AURKA and AURKB contribute to the malignant phenotype induced by KRAS activation, we either targeted AURKA or AURKB expression by RNA interference or targeted their activity with a dual pharmacological inhibitor. By these approaches, we have shown that these kinases are important for growth and viability of KRAS-positive lung cancer cells (Figs. 2b–c and 3b–c). These results are consistent with other studies showing that these kinases are important for cancer cell growth, viability and in vivo tumorigenicity [37, 53–56]. Nonetheless, our findings demonstrate that these kinases also support the malignant phenotype of KRAS-transformed lung cancer cells.

We have determined that Aurora kinase targeting in KRAS-positive lung cancer cells leads to loss of viability through promoting cell cycle arrest at G2 and through activation of apoptosis (Figs. 2d–e and 3d–e). This is consistent with the fact that AURKA and AURKB are master regulators of mitosis [10, 11], and that Aurora kinase inhibition is known to promote cell cycle arrest and apoptosis [14, 15].

More importantly, Aurora kinase targeting reduced anchorage-independent growth of KRAS-transformed lung cells (Figs. 2f, 3f and 5c), and inducible inhibition of AURKA expression by RNA interference reduced A549 xenograft tumor growth in vivo (Fig. 4). Different studies have shown that Aurora targeting reduces cell transformation in vitro and tumorigenicity in vivo [50, 53–63], even though these studies did not evaluate Aurora kinase targeting in KRAS-driven oncogenesis. Different mechanisms have been proposed to explain the role these kinases play in promoting malignant transformation. One possible mechanism would be through phosphorylation of

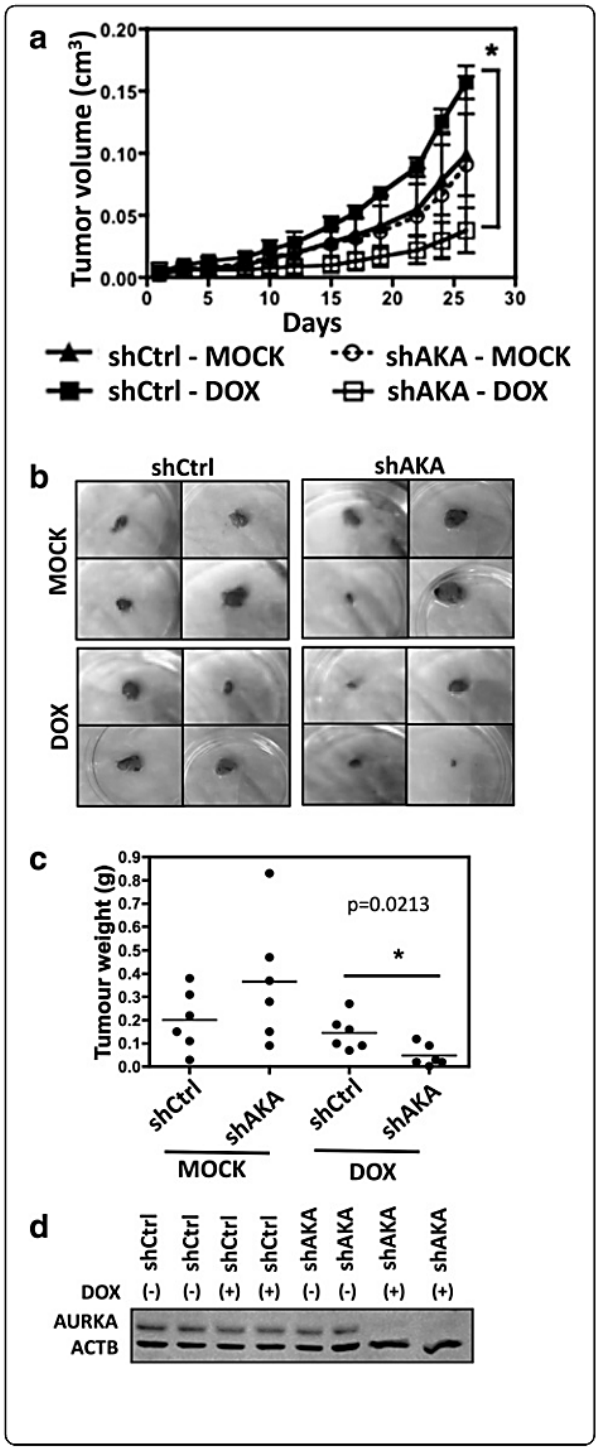


Fig. 4 shRNA-mediated knockdown of AURKA reduces xenograft tumor growth. **a** A549 stable cells with inducible expression of a shRNA targeting AURKA (shAKA) or a non-targeting shRNA (shCtrl) were injected subcutaneously in nude mice ($n = 9$ per group). shRNA expression was induced by doxycycline (DOX) administration in the drinking water as described in methods ($n = 5$ per group). Alternatively, mice were left untreated (MOCK) to control for doxycycline-mediated effects ($n = 4$ per group). The graph shows tumor volume measurements, which were initiated 26 days after inoculation (day 0). Error bars represent average ± 1 s.d. **b** Representative images of the tumors at day 56 after inoculation. **c** A549 stable cells with inducible expression of a shRNA targeting AURKA (shAKA) or a non-targeting shRNA (shCtrl) were injected subcutaneously in nude mice ($n = 12$ per group). shRNA expression was induced by doxycycline (DOX) administration in the drinking water as described in methods ($n = 6$ per group). Tumor weights at day 56. Error bars represent average ± 1 s.d. In all cases, statistical significance was determined when appropriate by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison test (**a**) or by Student's *t*-test (**c**) (*$p < 0.05$) and the significantly different comparisons are indicated by vertical (**a**) or horizontal (**c**) bars. **d** Protein lysates of xenograft tumors were submitted to western blotting with the indicated antibodies. ACTB) anti-β-actin

LIMK2 by AURKA [64]. Another possibility is that AURKA can promote RAS farnesylation, thus increasing the ability of this oncoprotein to transmit signals to downstream effectors [28]. In the case of AURKB, phosphorylation of CDCA8 by AURKB can play a role in promoting cell growth, survival and xenograft tumor growth [25]. Finally, both kinases have been proposed to mediate the oncogenic effects of MYC [49], an oncogenic transcription factor known to be positively regulated by RAS [48].

Interestingly, whereas AURKA targeting in vitro caused cells to undergo apoptosis (Figs. 2d and 3e and Additional file 3: Figure S2B, Additional file 4: Figure S3C and D), we failed to detect apoptotic cells in xenograft tumors with RNAi-mediated inihibition of AURKA expression (data not shown). This discrepancy between our in vitro and in vivo data could reflect the fact that tumor extrinsic survival factors influenced by the microenvironment in vivo can affect the ability of tumors cells to undergo cell death upon inhibition of oncogenic pathways. It is known that several key stages in apoptosis are sensitive to depletion of cellular energy reserves, which results from conditions, such as hypoxia and low glucose, which are found in vivo [65]. In addition, hypoxia is known to select cells that have lost their apoptotic potential [66], so it is also likely that an initial apoptotic response to AURKA inhibition might have occurred, leading to expansion of apoptotic resistant cells and failure to detect apoptotic cells at the endpoint.

In order to validate Aurora kinases as therapeutic targets for KRAS-induced lung cancer, it is important to show that inhibiting these kinases preferentially targets lung cancer cells expressing oncogenic KRAS. In order to

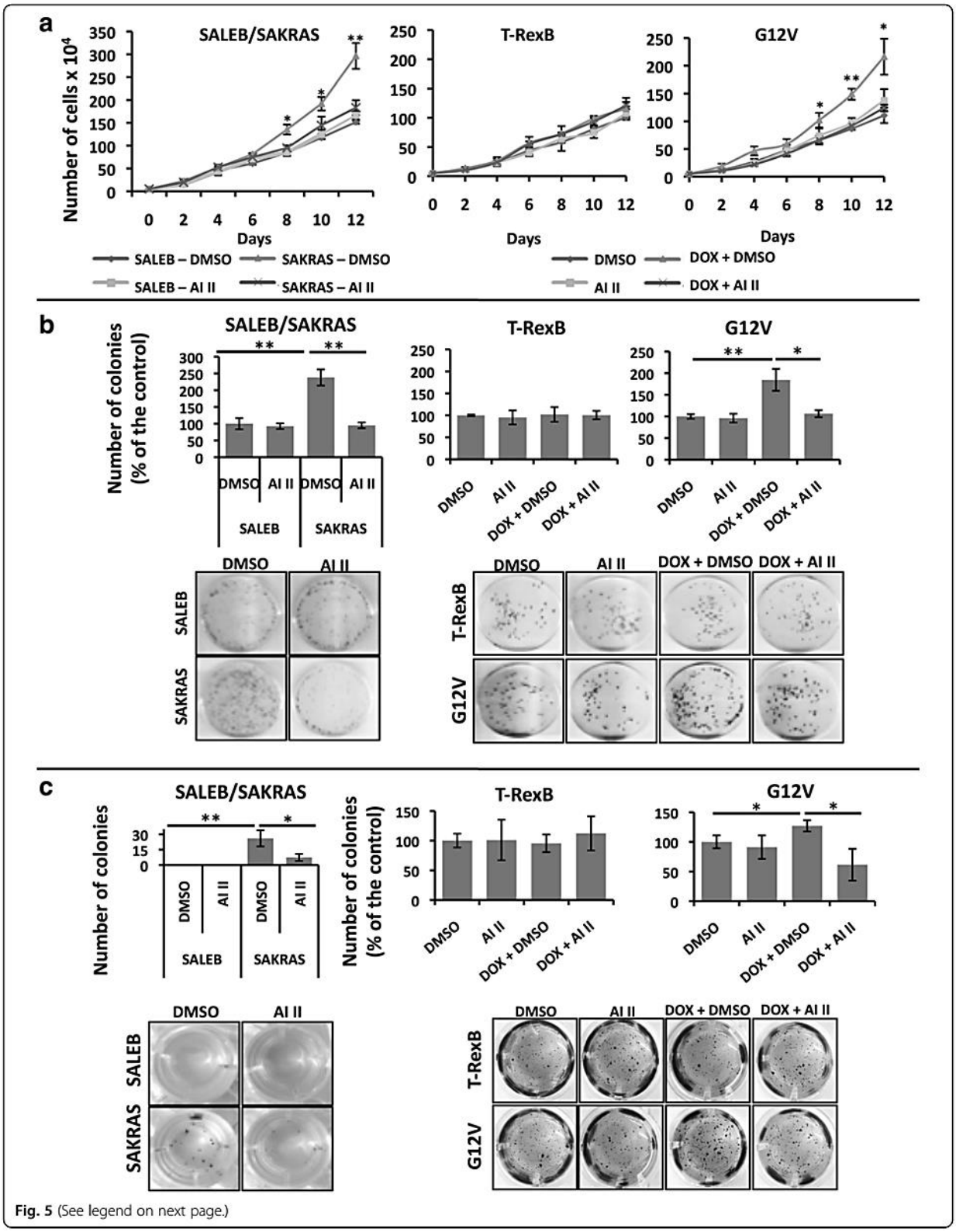


Fig. 5 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)
Fig. 5 AURKA or AURKB targeting decreases the transformed phenotype of lung cells in a KRAS-dependent manner. Primary immortalized human airway cells (SALEB) and their KRAS-transformed counterpart (SAKRAS) were treated with 0.1 % DMSO (DMSO) or 1uM AI II (AI II) as indicated. H1703-TrexB and H1703-G12V lung cancer cells were also treated with 0.1 % DMSO (DMSO) or 1 μM AI II (AI II) as indicated. To induce KRAS expression H1703-TrexB and H1703-G12V cells were simultaneously treated with 2 μg/mL doxycycline (DOX + DMSO or DOX + AI II) where indicated. **a** Growth curve analysis of cells. All drug treatments (DMSO, AI II, DOX + DMSO, DOX + AI II) were continued for 12 days. **b** Cells were plated for clonogenic assays as described in methods and treated for 21 days as indicated. Colonies formed were stained with crystal violet and counted. Images shown are representative of three independent experiments. **c** Anchorage-independent growth was evaluated by plating the indicated cells in soft agar as described in methods. Cells were then treated for 21 days as indicated. Colonies formed were stained with MTT and counted. Images shown are representative of three independent experiments. In all cases, statistical significance was determined when appropriate by Student's *t*-test (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$) and the groups being compared are indicated by horizontal bars

evaluate the specificity of the biological effects caused by Aurora kinase targeting, we used the dual AURKA and AURKB inhibitor AI II to treat lung cell pairs, that only differed by their expression of oncogenic $KRAS^{G12V}$. Our results show, for the first time, that AURKA and AURKB inhibition reduces growth, viability and anchorage- independent growth in a KRAS-dependent manner (Fig. 5 and Additional file 4: Figure S3).

Our results support a model, whereby oncogenic KRAS effector pathways trigger abnormally high levels of AURKA and AURKB activation, rendering KRAS-transformed cells more sensitive than other cells to Aurora kinase targeting. These results are important, not only because they identify a specific vulnerability of KRAS-transformed lung cells, but also because this vulnerability can be used to develop targeted therapies for KRAS-induced lung cancer. The potential for clinical translation is further underscored by the fact that different Aurora kinase inhibitors, including alisertib and danusertib are undergoing phase II/III clinical trials for different malignancies [15, 59, 67, 68], even though very few combination trials using these drugs are currently ongoing.

Taken together, our results provide strong evidence that Aurora kinases are KRAS downstream effectors that play an important role in promoting the oncogenic phenotype, and suggest AURKA and/or AURKB inhibition as a promising approach to be explored alone or preferentially in combination with other strategies for KRAS-induced lung cancer therapy.

Conclusions

In conclusion, our results show that AURKA and AURKB are not only regulated by KRAS, but also promote KRAS-induced oncogenesis. Furthermore, targeting Aurora kinases by RNA interference reduces the oncogenic phenotype of KRAS mutant lung cancer cells in vitro and AURKA targeting slows tumor growth in vivo. Finally, Aurora kinase pharmacological inhibition preferentially targets lung cancer cells expressing $KRAS^{G12V}$, thereby supporting our hypothesis that AURKA and AURKB are promising targets for KRAS-induced lung cancer therapy.

Methods

Cell lines, antibodies and reagents

A549 (ATCC CCL-185) and H358 (ATCC CRL-5807) cells were cultivated in RPMI-1640 medium (ATCC 30–2001) supplemented with 10 % (vol/vol) fetal bovine serum (FBS), without antibiotics. HEK 293 T/17 cells (ATCC CRL-11268) were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10 % (vol/vol) FBS, without antibiotics. H1703 (ATCC CRL-5889) genetically modified to inducibly express $KRAS^{G12V}$ or empty vector control (T-RexB) [40] were cultivated in RPMI-1640 medium supplemented with 10 % (vol/vol) FBS, 10 μg/mL blasticidin (#A1113903, Invitrogen) and 3 μg/mL zeocin (#R25001, Invitrogen). 2 μg/mL doxycycline (#D3447, Sigma Aldrich) was added to the medium to induce $KRAS^{G12V}$ expression when appropriate (see figure legends). SALEB and SAKRAS cells [39] were a kind gift from Dr. Scott Randell, UNC School of Medicine. They were cultured in supplemented Bronchial Epithelial Cell Growth Medium (BEGM, Lonza). The antibodies used were as follows: Anti-AURKA (#4718, Cell Signaling Technology), anti-pAURKA (#3079, Cell Signaling Technology), anti-AURKB (#3094, Cell Signaling Technology), anti-GAPDH (#25778, Santa Cruz Biotechnology), anti-HA-tag (#H3663, Sigma-Aldrich), anti-PanRAS (#OP40, Merck Millipore), anti-cleaved caspase 3 (#9661, Cell Signalling), anti-full caspase 3 (#9662, Cell Signalling), anti-β-actin (#7210, Santa Cruz Biotechnology) and anti-α-tubulin (#T9026, Sigma-Aldrich). Secondary antibodies were as follows: anti-rabbit Alexa Fluor® 680 (#A-21109 Life Technologies), anti-mouse Alexa Fluor® 680 (#A-21058 Life Technologies), anti-rabbit IRDye® 800CW (#926-32211, Li-Cor) and anti-mouse IRDye® 800CW (#926-32210, Li-Cor). Cells were treated as described in figures with Aurora Inhibitor II (AI II, #189404, Merck Millipore), which is a dual Aurora A and Aurora B inhibitor.

Generation of lung cells with inducible inhibition of KRAS, Aurora A or Aurora B expression by RNA interference

Lentiviral particles were produced in HEK 293 T/17 cells by co-transfection of lentiviral packaging plasmids pCMV-VSVG and pCMV-dR8.2 dvpr (Addgene) with pTRIPZ lentiviral vectors (GE Dharmacon) expressing

the desired shRNAs according to the manufacturer's protocol. The following pTRIPZ lentiviral vectors were used: a lentiviral vector expressing a non-targeting control shRNA (shCtrl, RHS 4743), two lentiviral vectors expressing different shRNAs targeting KRAS (shKR#1, V3THS_314004 and shKR#2, V3THS_314009), two lentiviral vectors expressing different shRNAs targeting Aurora A (shAKA#1, V2THS_12364 and shAKA#2, V2THS_153609) and two lentiviral vectors expressing different shRNAs targeting Aurora B (shAKB#1, V2THS_28606 and shAKB#2, V2THS_28601). In each case, A549 and H358 cells were infected with 1 MOI of lentiviral particles and selected with 2 μg/mL puromycin (#A1113803, Life Technologies) for two weeks. Individual cell clones were induced with 2 μg/mL doxycycline (#D9891, Sigma-Aldrich) for 5 days and screened for expression of the reporter red fluorescent protein (turboRFP), as well as for inhibition of expression of shRNA targets. Cells with at least 80 % knockdown levels were used to perform all biological assays.

Growth curve analysis

Cells were seeded at a confluence of 5×10^3 cells per well in 6-well adherent plates and allowed to proliferate for 12 days with medium changed daily. Cells were counted every two 2 days. Trypan blue (#T8154, Sigma-Aldrich) was used to exclude dead cells. All conditions were done in triplicate.

Clonogenic assay

Cells were seeded at 500 cells per plate in 60 mm adherent plates in triplicate. Cells were allowed to form colonies for 2 weeks with medium changed daily. Colonies were stained with crystal violet solution and counted manually.

Soft agar assay

1×10^3 cells were ressuspended in cell culture medium containing 0.3 % low-melting-point agarose and were plated onto a solidified bottom layer medium containing 0.6 % agarose in 24-well plates. Liquid medium was added after 24 h and changed every three days. Colonies were allowed to grow for 3 weeks and subsequently stained with 1 mg/mL 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, #M5655, Sigma-Aldrich) for 2 h and colonies were counted. All conditions were done in sextuplicate.

Western blotting

1×10^5 cells were grown in 60 mm plates and whole cell lysates were isolated using RIPA buffer (20 mM Tris–HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM Na_2EDTA, 1 mM EGTA, 1 % NP-40) supplemented with protease and phosphatase inhibitors (1 μg/mL leupeptin, 1 % sodium deoxycholate, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM b-glycerophosphate, 1 mM Na^3VO_4). 25 μg of protein/lane were electrophoresed in 10 or 12 % polyacrylamide minigels at 120 V for 90 min and transferred to nitrocellulose membranes. After blocking, the membranes were incubated with primary antibody, followed by incubation with fluorescently labelled secondary antibodies. Fluorescence detection was performed using ODYSSEY® CLx (Li-Cor®).

AURKA phosphorylation assay

1×10^5 cells were grown in 60 mm plates and treated with Aurora inhibitor II (#189404, Merck Millipore) for 72 h. 24 h after cell seeding, 2 mM thymidine (#T1895, Sigma- Aldrich) was added. The thymidine block was released after 24 h of incubation and cells were cultured for an additional 8 h. Finally, 100 ng/mL nocodazole (#M1404, Sigma-Aldrich) was added for 16 h. Cells were harvested and whole lysates were analyzed by Western blotting to check for AURKA phosphorylation.

Cell cycle analysis

Cells were seeded at a confluence of 1×10^5 cells in 6-well adherent plates. After drug treatment or doxycycline-mediated expression of shRNAs, cells were incubated with 50 μM 5-Bromo-2′-deoxyuridine (BrdU, #19-160, Merck Millipore) in the dark for 2 h, and fixed in 70 % ethanol. Cells were treated with 100 μg/mL RNase A (#EN0531, Thermo Fisher Scientific) for 30 min at 37 °C followed by 2 M HCl for 20 min at room temperature. Suspended cells were incubated in 100 μL of Alexa Fluor® 488-labeled BrdU antibody (#FCMAB101A4, Merck Millipore) for 1 h in the dark, and finally resuspended in a buffer containing 100 μg/mL of propidium iodide (#81845, Sigma-Aldrich) for analysis using flow cytometry in a BD FACSVerse™ Flow Cytometer (BD Biosciences). Results were analyzed with Kaluza® Flow Analysis Software (Beckman Coulter).

Annexin V/PI staining

Cells were seeded at a confluence of 1×10^6 cells in 100 mm adherent plates and treated with different concentrations of AI-II or doxycycline as indicated in the figure legends. Cells were stained with Annexin V and propidium iodide (PI) according to the Annexin V-FITC Kit (#130-092-052, Miltenyi Biotec) instructions. Briefly, cells were resuspended in binding buffer, incubated with FITC-labeled Annexin V antibody for 15 min, followed by incubation in binding buffer containing 100 μg/mL propidium iodide (PI). Cells were then analyzed by flow cytometry in a BD FACSVerse™ Flow Cytometer (BD Biosciences). Results were analyzed with Kaluza® Flow Analysis Software (Beckman Coulter).

Xenograft tumor growth analysis

2×10^6 A549 cells with doxycycline-inducible expression of a shRNA targeting AURKA (A549-shAKA) or with

doxycycline-inducible expression of a non-targeting shRNA (A549-shCtrl) were subcutaneously inoculated into the flanks of 8-week-old, male Balb/C nude mice in pathogen-free conditions according to the protocols approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of São Paulo Chemistry Institute Animal Facility. Animals were monitored every 3 days, and, once primary tumors were palpable (26 days after inoculation), 1 mg/mL doxycycline was added to the drinking water to induce shRNA expression. Tumor volumes were determined by direct diameter measurement with calipers followed by the following calculation: (large diameter) x (small diameter)^2/2. Animals were sacrificed by CO_2 euthanasia 56 days after inoculation, and tumor weight was determined. Statistical significance of differences observed in tumor growth and weight was determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison test or by the Student's *t*-test.

Statistics

All values are presented either as mean ± 1SD or as representative images of at least three independent experiments. Data analysis was performed using the statistical software Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Differences between groups were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison test or alternatively by the Student's *t*-test. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Additional files

Additional file 1: Materials and methods used in the data presented in the additional figures, which are not included in the main manuscript. (PDF 80 kb)

Additional file 2: Figure S1. KRAS regulates AURKA and AURKB mRNA levels. **a** Expression of *KRAS*, *AURKA*, and *AURKB* was analyzed by real-time quantitative PCR in immortalized primary epithelial lung cells (SALEB) and their isogenic KRAS-transformed counterpart (SAKRAS), showing that KRAS mRNA expression positively correlates with both AURKA and AURKB mRNA expression. Statistical significance was measured by Student's *t*-test (*$p < 0.05$) and error bars represent average ± 1s.d. **b** mRNA expression of *KRAS*, *AURKA*, and *AURKB* was analyzed by real-time quantitative PCR in H1703 lung cancer cells engineered to express KRAS^{G12V} inducibly (G12V) in comparison to empty vector-transfected H1703 cells (TrexB). To induce KRAS expression, cells were treated with 2 μg/mL doxycycline for the indicated times. Statistical significance was measured by Student's *t*-test (*$p < 0.05$) by comparing treated samples (DOX) to untreated control samples (MOCK). Error bars represent average ± 1s.d. **c** Fluorescence microscopy images of A549 and H358 stable cells with inducible expression of 2 different shRNAs targeting KRAS (shKR#1 and shKR#2), AURKA (shAKA#1 and shAKA#2), AURKB (shAKB#1 and shAKB#2) or a non-targeting shRNA (shCtrl) showing induction of red fluorescent reporter protein (RFP) expression upon treatment with 2 μg/mL doxycycline for 5 days (DOX) when compared to untreated (MOCK) cells. Brightfield images of the same fields are included for comparison. **d** mRNA expression of *KRAS*, *AURKA*, and *AURKB* was analyzed by real-time quantitative PCR in A549 and H358 stable cells with inducible expression of 2 different shRNAs targeting KRAS (shKR#1 and shKR#2) or a non-targeting shRNA (shCtrl). Cells were either treated with 2 μg/mL doxycycline (DOX) for 5 days to induce shRNA expression or left untreated (MOCK). Statistical significance was measured by Student's *t*-test (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$) by comparing treated samples (DOX) to untreated control samples (MOCK). Error bars represent average ± 1s.d. (PDF 648 kb)

Additional file 3: Figure S2. Pharmacological or shRNA-mediated inhibition of AURKA and/or AURKB leads to decreased cell viability and induces apoptosis. **a** A549 and H358 cells were treated with 0.1 % DMSO or 1uM AI II for 72h. Cell viability was measured using a colorimetric MTT assay (described in the Additional file 1: Methods). **b** Protein lysates of A549 and H358 cells treated with 0.1 % DMSO or the indicated concentrations of AI II for 72h were submitted to western blotting with the indicated antibodies. C3) anti-caspase 3; ACTB) anti-β-actin. **c** A549 and H358 stable cells with inducible expression of 2 different shRNAs targeting AURKA (shAKA#1 and #2), AURKB (shAKB#1 and #2) or a non-targeting shRNA (shCtrl) were treated with 2 μg/mL doxycycline (DOX) for 5 days to induce shRNA expression. Cell viability of doxycycline-treated cells was compared to untreated cells using a colorimetric MTT assay (described in the Additional file 1: Methods). Statistical significance in all cases was measured by Student's *t*-test (**$p < 0.01$, ***$p < 0.0001$) when compared to experimental control samples (MOCK-treated cells). Error bars represent average ± 1s.d. (PDF 263 kb)

Additional file 4: Figure S3. Aurora inhibition reduces viability and induces cell death in a KRAS-dependent manner. **a** Primary immortalized human airway cells (SALEB) and their KRAS-transformed counterpart (SAKRAS) were treated with 0.1 % DMSO or 1uM AI II. Cell viability was measured at 72h using a colorimetric MTT assay (described in the Additional file 1: Methods). Statistical significance was determined by Student's *t*-test (*$p < 0.05$) when compared to experimental control samples (DMSO-treated cells). Error bars represent average ± 1s.d. **b**, **c** and **d** H1703-TrexB and H1703-G12V lung cancer cells were treated with 0.1 % DMSO (DMSO) or 1μM AI II (AI II) as indicated for 72h. To induce KRAS expression H1703-TrexB and H1703-G12V cells were simultaneously treated with 2μg/mL doxycycline (DOX + DMSO or DOX + AI II) where indicated. **b** Cell viability was measured using a colorimetric MTT assay (described in the Additional file 1: Methods). Statistical significance was determined by Student's *t*-test (*$p < 0.05$, ***$p < 0.0001$) when compared to experimental control samples (DMSO-treated cells). Error bars represent average ± 1s.d. **c** Protein lysates were submitted to western blotting with the indicated antibodies. C3) anti-caspase 3. **d** Annexin V positive cells were analyzed by flow cytometry. (PDF 455 kb)

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

EOS participated in the study design, generated A549 and H358 cells with inducible knockdown of AURKA or AURKB, performed all in vitro studies, analyzed results and drafted the manuscript. TTCL performed in vivo studies, analyzed results and helped to draft the manuscript; MNA generated A549 and H358 cells with inducible knockdown of KRAS; EL participated in the study design and coordination, analyzed data and helped to draft the manuscript; DSB conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by a Young Investigator Grant (2010/52685-9) from the Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and a Young Clinical Scientist Award (YCSA 072165) from the Flight Attendant Medical Research Institute (FAMRI) to D.S.B., a FAMRI YCSA award (YCSA 052409) and Clinical Investigator Award (CIA 103063) to E.L., by a FAPESP masters fellowship to E.O.S., a FAPESP postdoctoral fellowship to T.C.C-L, a FAPESP Ph.D. fellowship to M.N.A. and by a Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Ph.D. fellowship to E.O.S. This work was also supported by the graduate program in Biochemistry and Molecular Biology of the University of São Paulo, which is sponsored by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Author details
[1]Department of Biochemistry, Chemistry Institute, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil. [2]Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, MA, USA. [3]Institute of Biomedical Technologies, National Research Council (CNR), Pisa, Italy.

Received: 20 August 2015 Accepted: 20 January 2016
Published online: 03 February 2016

References

1. Cox AD, Fesik SW, Kimmelman AC, Luo J, Der CJ. Drugging the undruggable RAS: Mission Possible? Nat Rev Drug Discov. 2014;13(11):828–51.
2. Rodrigues-Viciana P, Tetsu O, Oda K, Okada J, Rauen K, McCormick F. Cancer targets in the Ras pathway. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2005;70:461–7.
3. Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. Ras oncogenes: weaving a tumorigenic web. Nat Rev Cancer. 2011;11(11):761–74.
4. Stephen AG, Esposito D, Bagni RK, McCormick F. Dragging ras back in the ring. Cancer Cell. 2014;25(3):272–81.
5. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2015; 65(1):5–29.
6. Zhang Z, Stiegler AL, Boggon TJ, Kobayashi S, Halmos B. EGFR-mutated lung cancer: a paradigma of molecular oncology. Oncotarget. 2010;1(17):497–514.
7. Gerber DE, Minna JD. ALK inhibition for non-small cell lung cancer: from discovery to therapy in record time. Cancer Cell. 2010;18(6):548–51.
8. Izar B, Zhou H, Heist RS, Azzoli CG, Muzikansky A, Scribner EE, et al. The prognostic impact of KRAS, its codon and amino acid specific mutations, on survival in resected stage I lung adenocarcinoma. J Thorac Oncol. 2014;9(9): 1363–9.
9. Ohtaki Y, Shimizu K, Kakegawa S, Nagashima T, Nakano T, Atsumi J, et al. Postrecurrence survival of surgically resected pulmonary adenocarcinoma patients according to EGFR and KRAS mutation status. Mol Clin Oncol. 2014; 2(2):187–96.
10. Fu J, Bian M, Jiang Q, Zhang C. Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. Mol Cancer Res. 2007;5:1–10.
11. Hochegger H, Hégarat N, Pereira-Leal JB. Aurora at the pole and equator: overlapping functions of Aurora kinases in the mitotic spindle. Open Biol. 2013;3(3):120185.
12. Sourisseau T, Maniotis D, Mccarthy A, Tang C, Lord CJ, Ashworth A, et al. Aurora-A expressing tumour cells are deficient for homology-directed DNA double strand-break repair and sensitive to PARP inhibition. EMBO Mol Med. 2010;2(4):130–42.
13. Wang G, Jiang Q, Zhang C. The role of mitotic kinases in coupling the centrosome cycle with the assembly of the mitoticspindle. J Cell Sci. 2014; 127(Pt 19):4111–22.
14. Portella G, Passaro C, Chieffi P. Aurora B: a new prognostic marker and therapeutic target in cancer. Curr Med Chem. 2011;18(4):482–96.
15. Malumbres M, Pérez de Castro I. Aurora kinase A inhibitors: promising agents in antitumoral therapy. Expert Opin Ther Targets. 2014;18(12): 1377–93.
16. Smith SL, Bowers NL, Betticher DC, Gautschi O, Ratschiller D, Hoban PR, et al. Overexpression of aurora B kinase (AURKB) in primary non-small cell lung carcinoma is frequent, generally driven from one allele, and correlates with the level of genetic instability. Br J Cancer. 2005;93:719–29.
17. Vischioni B, Oudejans JJ, Vos W, Rodriguez JA, Giaccone G. Frequent overexpression of aurora B kinase, a novel drug target, in non-small cell lung carcinoma patients. Mol Cancer Ther. 2006;5:2905–13.
18. Lo Iacono M, Monica V, Saviozzi S, Ceppi P, Bracco E, Papotti M, et al. Aurora kinase A expression is associated with lung cancer histological-subtypes and with tumor de-differentiation. J Transl Med. 2011;9:100.
19. Takeshita M, Koga T, Takayama K, Ijichi K, Yano T, Maehara Y, et al. Aurora-B overexpression is correlated with aneuploidy and poor prognosis in non-small cell lung cancer. Lung Cancer. 2013;80(1):85–90.
20. Zhou H, Kuang J, Zhong L, Kuo WL, Gray JW, Sahin A, et al. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. Nat Genet. 1998;20:189–93.
21. Ota T, Suto S, Katayama H, Han ZB, Suzuki F, Maeda M, et al. Increased mitotic phosphorylation of histone H3 attributable to AIM-1/Aurora-B overexpression contributes to chromosome number instability. Cancer Res. 2002;62(18):5168–77.
22. Zhang D, Hirota T, Marumoto T, Shimizu M, Kunitoku N, Sasayama T, et al. Cre-loxP-controlled periodic Aurora-A overexpression induces mitotic abnormalities and hyperplasia in mammary glands of mouse models. Oncogene. 2004;23:8720–30.
23. Chou CH, Yang NK, Liu TY, Tai SK, Hsu DS, Chen YW, et al. Chromosome instability modulated by BMI1-AURKA signaling drives progression in head and neck cancer. Cancer Res. 2013;73(2):953–66.
24. Wang X, Zhou YX, Qiao W, Tominaga Y, Ouchi M, Ouchi T, et al. Overexpression of aurora kinase A in mouse mammary epithelium induces genetic instability preceding mammary tumor formation. Oncogene. 2006; 25(54):7148–58.
25. Hayama S, Daigo Y, Yamabuki T, Hirata D, Kato T, Miyamoto M, et al. Phosphorylation and activation of cell division cycle associated 8 by aurora kinase B plays a significant role in human lung carcinogenesis. Cancer Res. 2007;67(9):4113–22.
26. Li JJ, Weroha SJ, Lingle WL, Papa D, Salisbury JL, Li SA. Estrogen mediates Aurora-A overexpression, centrosome amplification, chromosomal instability, and breast cancer in female ACI rats. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(52):18123–8.
27. Nguyen HG, Makitalo M, Yang D, Chinnappan D, St Hilaire C, Ravid K. Deregulated Aurora-B induced tetraploidy promotes tumorigenesis. FASEB J. 2009;23(8):274–8.
28. Yang G, Mercado-Uribe I, Multani AS, Sen S, Shih IEM, Wong KK, et al. RAS promotes tumorigenesis through genomic instability induced by imbalanced expression of Aurora-A and BRCA2 in midbody during cytokinesis. Int J Cancer. 2013;133(2):275–85.
29. Muñoz-Barrera M, Monje-Casas F. Increased Aurora B activity causes continuous disruption of kinetochore-microtubule attachments and spindle instability. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(38):E3996–4005.
30. Katayama H, Sasai K, Kawai H, Yuan ZM, Bondaruk J, Suzuki F, et al. Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. Nat Genet. 2004;36:55–62.
31. Gully CP, Velazquez-Torres G, Shin JH, Fuentes_Mattei E, Wang E, Carlock C, et al. Aurora B kinase phosphorylates and instigates degradation of p53. Proc Natl Sci U S A. 2012;109(24):E1513–22.
32. Kanda A, Kawai H, Suto S, Kitajima S, Sato S, Takata T, et al. Aurora-B/AIM-1 kinase activity is involved in Ras-mediated cell transformation. Oncogene. 2005;24:7266–72.
33. Tatsuka M, Sato S, Kitajima S, Suto S, Kawai H, Miyauchi M, et al. Overexpression of Aurora-A potentiates HRAS-mediated oncogenic transformation and is implicated in oral carcinogenesis. Oncogene. 2005;24:1122–7.
34. Tseng YS, Lee JC, Huang CY, Liu HS. Aurora-A overexpression enhances cell-aggregation of Ha-ras transformants through the MEK/ERK signaling pathway. BMC Cancer. 2009;9:435.
35. Hadj-Slimane R, Pamonsinlapatham P, Herbeuval JP, Garbay C, Lepelletier Y, Raynaud F. RasV12 induces Survivin/AuroraB pathway conferring tumor cell apoptosis resistance. Cell Signal. 2010;22(8):1214–21.
36. Biran A, Brownstein M, Haklai R, Kloog Y. Downregulation of survivin and aurora A by histone deacetylase and RAS inhibitors: a new drug combination for cancer therapy. Int J Cancer. 2011;128(3):691–701.
37. Patel AV, Eaves D, Jessen WJ, Rizvi TA, Ecsedy JA, Qian MG, et al. Ras-driven transcriptome analysis identifies aurora kinase A as a potential malignant peripheral nerve sheath tumor therapeutic target. Clin Cancer Res. 2012;18(18):5020–30.
38. Cheung CH, Sarvagalla S, Lee JY, Huang YC, Coumar MS. Aurora kinase inhibitor patentes and agentes in clinical testing: an update (2011–2013). Expert Opin Ther Pat. 2014;24(9):1021–38.
39. Lim KH, Brady DC, Kashatus DF, Ancrile BB, Der CJ, Cox AD, et al. Aurora-A phosphorylates, activates, and relocalizes the small GTPase RalA. Mol Cell Biol. 2010;30(2):508–23.
40. Lundberg AS, Randell SH, Stewart SA, Elenbaas B, Hartwell KA, Brooks MW, et al. Immortalization and transformation of primary human airway epitelial cells by gene transfer. Oncogene. 2002;21(29):4577–86.
41. Bassères DS, Ebbs A, Cogswell PC, Baldwin AS. IKK is a therapeutic target in KRAS-induced lung cancer with disrupted p53 activity. Genes Cancer. 2014; 5(1–2):41–55.
42. Mortlock AA, Keen NJ, Jung FH, Heron NM, Foote KM, Wikinson RW, et al. Progress in the development of selective inhibitors of aurora kinases. Curr Top Med Chem. 2005;5(8):807–21.
43. Heron NM, Anderson M, Blowers DP, Breed J, Eden JM, Green S, et al. SAR and inhibitor complex structure determination of a novel class of potente and specific Aurora kinase inhibitors. Bioorg Med Chem Lett. 2006;16(5):1320–3.

44. Eyers PA, Erikson E, Chen LG, Maller JL. A novel mechanism for activation of the protein kinase Aurora A. Curr Biol. 2003;13:691–7.
45. Bayliss R, Sardon T, Vernos I, Conti E. Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle. Mol Cell. 2003;12(4):851–62.
46. Lim KH, OHayer K, Adam SJ, Kendall SD, Campbell PM, Der CJ, et al. Divergent roles for RalA and RalB in malignant growth of human pancreatic carcinoma cells. Curr Biol. 2006;16(24):2385–94.
47. Engelman JA, Janne PA. Mechanisms of acquired resistance to epidermal growth fator receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 2008;14(10):2895–9.
48. Bachireddy P, Bendapudi PK, Felsher DW. Getting at MYC through RAS. Clin Cancer Res. 2005;11(12):4278–81.
49. Den Hollander J, Rimpi S, Doherty JR, Rudelius M, Buck A, Hoellein A, et al. Aurora kinases A and B are up-regulated by Myc and are essential for maintenance of the malignant state. Blood. 2010;116(9):1498–505.
50. Lu L, Han H, Tian Y, Li W, Zhang J, Feng M, et al. Aurora kinase A mediates c-Myc's oncogenic effects in hepatocellular carcinoma. Mol Carcinog. 2014; 54(11):1467–79.
51. Bowman BM, Sebolt KA, Hoff BA, Boes JL, Daniels DL, Heist KA, et al. Phosphorylation of FADD by the kinase CK1α promotes KRASG12D-induced lung cancer. Sci Signal. 2015;8(361):ra9.
52. Xia R, Chen S, Chen Y, Zhang W, Zhu R, Deng A. A chromosomal passenger complex protein signature model predicts poor prognosis for non-small-cell lung cancer. Onco Targets Ther. 2015;8:721–6.
53. Wang X, Dong L, Xie J, Tong T, Zhan Q. Stable knockdown of Aurora-A by vector-based RNA interference in human esophageal squamous cell carcinoma cell line inhibits tumor cell proliferation, invasion and enhances apoptosis. Cancer Biol Ther. 2009;8(19):1852–9.
54. Gully CP, Zhang F, Chen J, Yeunj JA, Velazquez-Torres G, Wang E, et al. Antineoplastic effects of an Aurora B kinase inhibitor in breast cancer. Mol Cancer. 2010;22(9):42.
55. Zhou N, Singh K, Mir MC, Parker Y, Lindner D, Dreicer R, et al. The investigational Aurora kinase A inhibitor MLN8237 induces defects in cell viability and cell-cycle progression in malignant bladder cancer cells in vitro and in vivo. Clin Cancer Res. 2013;19(7):1717–28.
56. Liu P, Qi M, Ma C, Lao G, Liu Y, Liu Y, et al. Let7a inhibits the growth of endometrial carcinoma cells by targeting Aurora-B. FEBS Lett. 2013;587(16):2523–9.
57. Harrington EA, Bebbington D, Moore J, Rasmussen RK, Ajose-Adeogun AO, Nakayama T, et al. VX-680, a potente and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo. Nat Med. 2004; 10(3):262–7.
58. Oke A, Pearce D, Wikinson RW, Crafter C, Odedra R, Cavenagh J, et al. AZD1152 rapidly and negatively affects the growth and survival of human acute myeloid leucemia cells in vitro and in vivo. Cancer Res. 2009;69(10): 4150–8.
59. Alferez DG, Goodland RA, Odedra R, Sini P, Crafter C, Ryan AJ, et al. Inhibition of Aurora-B kinase activity confers antitumor efficacy in preclical mouse models of early and advanced gastrointestinal neoplasia. Int J Oncol. 2012;41(4):1475–85.
60. Pérez de Castro I, Aguirre-Portolés C, Fernández-Miranda G, Cañamero M, Cowley DO, Van Dyke T, et al. Requirements for Aurora-A in tissue regeneration and tumor development in adult mammals. Cancer Res. 2013; 73(22):6804–15.
61. Jiang Z, Jiang J, Yang H, Ge Z, Wang Q, Zhang L, et al. Silencing of Aurora kinase A by RNA interference inhibits tumor growth in human osteosarcoma cells by inducing apoptosis and G2/M cell cycle arrest. Oncol Rep. 2014;31(3):1249–54.
62. Yeh CN, Yen CC, Chen YY, Cheng CT, Huang SC, Chang TW, et al. Identification of aurora kinase A as an unfavorable prognostic factor and potential treatment target for metastatic gastrointestinal stromal tumors. Oncotarget. 2014;5(12):4071–86.
63. Zhou LD, Xiong X, Long XH, Liu ZL, Huang SH, Zhang W. RNA interference-mediated knockdown of Aurora-B alters the metastatic behavior of A549 cells via modulation of the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway. Oncol Lett. 2014;8(5):2063–8.
64. Johnson EO, Chang KH, Ghosh S, Venkatesh C, Giger K, Low PS, et al. LIMK2 is a crucial regulator and effector of Aurora-A-kinase-mediated malignancy. J Cell Sci. 2012;125(Pt 5):1204–16.
65. Hunter A, Hendrikse A, Renan M, Abratt R. Does the tumor microenvironment influence radiation-induced apoptosis? Apoptosis. 2006; 11:1727–35.
66. Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, et al. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. Nature. 1996;379(6560):88–91.
67. Kollareddy M, Zheleva D, Dzubak P, Brahmkshatria PS, Lepsik M, Hajduch M. Aurora kinase inhibitors: progress towards the clinic. Invest New Drugs. 2012;30(6):2411–32.
68. Meulenbeld HJ, Mathijssen RH, Verweij J, de Wit R, de Jonge MJ. Danusertib, an aurora kinase inhibitor. Expert Opin Investig Drugs. 2012;21(3):383–93.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit