



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat Autònoma
de Barcelona

Departament de Bioquímica i
Biologia Molecular.
Unitat de Medicina



MAP quinasa ERK5: una nueva diana antitumoral en cáncer endometriode y neuroblastoma

Nora Diéguez Martínez

TESIS DOCTORAL

Bellaterra, 2021



Universitat Autònoma
de Barcelona

Departament de Bioquímica i
Biologia Molecular.
Unitat de Medicina



MAP quinasa ERK5: una nueva diana antitumoral en cáncer endometriode y neuroblastoma

Memoria de tesis doctoral presentada por Nora Diéguez Martínez para optar al grado de Doctora en Bioquímica y Biología Molecular por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Este trabajo ha sido realizado bajo la dirección del Doctor José Miguel Lizcano de Vega en la Unitat de Medicina del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular y en el Institut de Neurociències de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Director,

Doctoranda,

Dr. José Miguel Lizcano de Vega

Nora Diéguez Martínez

Bellaterra, 2021

Este estudio ha sido realizado gracias a la financiación de los siguientes proyectos:

- **Ministerio de Ciencia e Innovación. Plan Nacional de Investigación Científica. Ref. PID2019-107561RB-I00**
- **Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. Plan Nacional de I+D+I. Ref SAF2015-64237-R**

Este estudio también se ha realizado gracias a la concesión de una beca predoctoral de la Universitat Autònoma de Barcelona para Personal de Investigación en Formación (PIF).

A mi abuela Josefa,
quien nada no se ahoga.

AGRADECIMIENTOS

Después de cuatro años y algo, cierro una etapa muy importante de mi vida para abrir otra que espero que sea igual o más emocionante que ésta. Antes de terminarla me gustaría dar las gracias a todas las personas que han puesto su granito de arena en este trabajo duro e intenso para que esta tesis haya llegado a buen puerto.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias al director de esta Tesis doctoral, Jose Miguel Lizcano. Jose, gracias por haber confiado en mí cuando hace 5 años entré en tu despacho para pedirte una carta de recomendación para hacer la Tesis y tú me dijiste que por qué no me quedaba en Kinasas Lab. Gracias por la oportunidad, por la lealtad y por el compromiso. Gracias por enseñarme a gestionar los fracasos experimentales y a perseverar hasta conseguir el objetivo. Gracias también por tu dedicación y compromiso con este proyecto y con mi tesis, he aprendido mucho de ti todos estos años.

Gracias a los miembros de la comisión de seguimiento de mi Tesis, Dr. Antonio Casamayor, Dr. Miguel Segura y Dr. Victor Yuste, por darme la visión crítica que necesitaba en el momento oportuno y sacarme de una espiral sin salida. Gracias especialmente al Dr. Miguel Segura por colaborar con nosotros en el proyecto de ERK5 y neuroblastoma y darnos una visión más clínica. Gracias también a Dr. Victor Yuste por sus aportaciones y asesoramiento científico en el estudio de muerte celular, y por estar dispuesto a ayudar en cualquier otro aspecto.

Gracias a la Dra. Eva Colás por darnos su valiosísima visión sobre el cáncer de endometrio y darnos acceso a muestras humanas de pacientes aún más valiosas si cabe.

A Dr. Xavi Dolcet gracias por toda la ayuda proporcionada, por el asesoramiento científico en el estudio de cáncer de endometrio y la vía de NF- κ B, por los reactivos proporcionados, y por mostrar interés en el proyecto y predisposición a ayudarnos y colaborar en todo momento.

También me gustaría dar las gracias a todos los técnicos tanto del Departament como del Institut que han hecho posible que esta Tesis salga adelante. Gracias a Susana por tener siempre tan buena predisposición para solucionar cualquier problema que surja, da gusto tener cerca gente tan preparada y tan dispuesta. Gracias a Cris y a Neus (y también Toni corto pero intenso), por trabajar diariamente para ofrecernos un servicio de cultivos de calidad, por el asesoramiento en cultivos celulares y en inmunocitoquímica. Y gracias Mar por la enorme ayuda y paciencia para poner a punto protocolos de Inmunohistoquímica en un laboratorio donde nunca se habían realizado.

Gracias al laboratorio kinaso y a todos los que han pasado por él. Gracias a Valeria, Dídac, Inés, Lidia por dar lo mejor de vosotros y hacer el ambiente en el laboratorio mucho más agradable. Gracias a Rubén por ser literal “la alegría de la huerta” y por todas las birras, comidas y conversaciones intensas de estos años (nos quedan muchas aún). Gracias a Andrés por hacer piña y promover el trabajo colaborativo. Gracias a las últimas incorporaciones Idoia y Marc, porque me duele la boca de reirme tanto y eso sólo puede significar cosas buenas.

A Guille por tener siempre toda la buena predisposición para ayudar a los demás con lo que sea porque es una alegría compartir lab con alguien así. Gracias por la inmensa ayuda con los experimentos *in vivo* y las inmunohistos.

A Sergio, gracias por haberme acompañado todos estos años en el team kinaso, las victorias y las derrotas saben mejor en compañía. Gracias por el interés, la buena predisposición y el apoyo tanto profesional como personal.

A Eli, gracias por hacernos la vida más fácil, por ser las manos y los pies del laboratorio Kinasos, y no dejar que la entropía se nos vaya de las manos. Gracias por la energía inagotable y por el enorme soporte que le has dado a este proyecto, sin ti todo hubiera sido mucho más complicado.

Gracias Tati por los consejos tan valiosos que me diste antes de irte y que me han acompañado durante todos estos años. Gracias por haber ido un referente para mi y haberme enseñado tanto en tan poco tiempo. Me acuerdo muchísimo de ti.

Gracias también a todos los compañeros del resto de grupos de investigación en especial a Cristina Fábregas y a Judit por hacer más llevadero el día a día en el Departament y estar dispuestos a ayudar siempre que hiciera falta.

Dentro de Departament, gracias especialmente a Pau y a Laura por saber escucharme, entenderme y quererme justo en el momento y en la medida oportunos. Pau, gracias por todo el aprendizaje a nivel profesional que ha sido mucho y por haberme entendido tan bien y tan rápido a nivel personal. Qué bien sienta tu calma siempre. Laura, lo mío contigo fue amor a primera vista y después de cinco años sigo queriéndote a mi lado y eso es maravilloso. Gracias por el apoyo incondicional, por haberte tomado tiempo para conocerme muy bien y por la delicadeza con la que haces todo.

A Flavia, porque cuando alguien se convierte en imprescindible lo mejor que puede pasar es que vuelva para quedarse. Gracias por ser mi terapia infalible para cualquier día malo.

Gracias a Guillem y a Ángel por todos los años de risas, fiesta y convivencia, no he podido tener mejor soporte a nivel profesional y personal. Empezamos juntos esta etapa y me alegro que la terminemos así también.

A Valencia 470, por las birras, por las comidas y por el mejor confinamiento que se podía tener en pandemia, también formáis parte de esto. Gracias especialmente a Marga por ser transportarme siempre al Sur que tanto echo de menos, y a Irene por todo el aguante, el apoyo y las sesiones de terapia y birras (tan necesarias) durante esta última etapa de escritura.

Gracias a mis bioquímicos preferidos y a los científicos que más admiro que son Ana, Estre, Sara y Alberto. Hace ahora casi 10 años que nos conocimos y empezamos juntos esta aventura. Qué suerte que nuestros caminos se cruzaran porque no he podido tener mejores compañeros de carrera, de viajes, de birras y de vida. Estre gracias por ser luz y calma en el momento perfecto, Sara gracias por tantas cosas que sólo tú y yo sabemos, Ana gracias por darnos EntreParedes, y Alberto gracias por ser mi otra mitad en el centro de España, por ser mi cielo y mi suelo todos los días, por todas las llamadas, por escucharme, por quererme y acompañarme en absolutamente TODO.

Gracias a las dos personas que saben cómo estoy y lo que pienso sólo con mirarme. Gracias a Ana y a Berta por ser parte de mi, por las conversaciones infinitas sobre todo lo que se puede hablar, por conocerme y entenderme mejor que nadie, y por acompañarme en todas y cada una de las decisiones que he tomado en mi vida. No podría explicar TODO lo que sois para mí.

Gracias a mi padre, por enseñarme que la perseverancia y el buen hacer te pueden llevar muy lejos y por toda ayuda y soporte con la escritura de esta Tesis.

A Alazne, gracias por ser todo lo que he necesitado en cada momento. Gracias por ser mi salvavidas, mi familia en Barcelona, mi rutina preferida, mi cerveza de rescate un viernes después de una semana intensa o mi pizza preferida un domingo para empezar bien la semana. Gracias por la paciencia infinita y por ser mis manos, mis ojos y mi aliento durante estos meses tan complicados. T'e.

A mi abuela Josefa, por haber sido la persona más orgullosa de su nieta científica y porque siempre me decía que quien nada no se ahoga y aquí estoy nadando hasta el final. Te echo de menos, todos los días.

Por último, gracias a mi madre y a mi hermana por ser los pilares más importantes de mi vida. Somos un equipo y con vosotras a mi lado me siento capaz de todo. Gracias porque sin vosotras nada de esto hubiera sido posible y porque mis logros son vuestros. Gracias también a Claudio por el papel tan importante que has desarrollado durante todos estos años y por mantener la piña siempre muy unida. Os quiero hasta Sevilla y vuelta.

ARTÍCULOS PUBLICADOS

1. Wang J, Erazo T, Ferguson FM, Buckley DL, Gomez N, Muñoz-Guardiola P, **Dieguez-Martinez N**, Deng X, Hao M, Masefski W, Fedorov O, Offei-Addo NK, Park PM, Dai L, DiBona A, Becht K, Kim ND, McKeown MR, Roberts JM, Zhang J, Sim T, Alessi DR, Bradner JE, Lizcano JM, Blacklow SC, Qi J, Xu X, Gray NS.

Structural and Atropisomeric Factors Governing the Selectivity of Pyrimido-benzodiazepinones as Inhibitors of Kinases and Bromodomains.

ACS Chem Biol. 2018 Aug 13. 13(9), 2438-2448. doi: 10.1021/acscchembio.7b00638.

2. Ferguson FM, Nabet B, Raghavan S, Liu Y, Leggett AL, Kuljanin M, Kalekar RL, Yang A, He S, Wang J, Ng RWS, Sulahian R, Li L, Poulin EJ, Huang L, Koren J, **Dieguez-Martinez N**, Espinosa S, Zeng Z, Corona CR, Vasta JD, Ohi R, Sim T, Kim ND, Harshbarger W, Lizcano JM, Robers MB, Muthaswamy S, Lin CY, Look AT, Haigis KM, Mancias JD, Wolpin BM, Aguirre AJ, Hahn WC, Westover KD, Gray NS.

Discovery of a selective inhibitor of doublecortin like kinase 1.

Nat Chem Biol. 2020 Jun. 16(6), 635-643. doi: 10.1038/s41589-020-0506-0.

3. Muñoz-Guardiola P, Casas J, Megías-Roda E, Solé S, Perez-Montoyo H, Yeste-Velasco M, Erazo T, **Diéguez-Martínez N**, Espinosa-Gil S, Muñoz-Pinedo C, Yoldi G, Abad JL, Segura MF, Moran T, Romeo M, Bosch-Barrera J, Oaknin A, Alfón J, Domènech C, Fabriàs G, Velasco G, Lizcano JM.

The anti-cancer drug ABTL0812 induces ER stress-mediated cytotoxic autophagy by increasing dihydroceramide levels in cancer cells.

Autophagy. 2020 May 25. 1-18. doi: 10.1080/15548627.2020.1761651.

4. Erazo T, Espinosa-Gil S, **Diéguez-Martínez N**, Gómez N, Lizcano JM.

SUMOylation Is Required for ERK5 Nuclear Translocation and ERK5-Mediated Cancer Cell Proliferation.

Int J Mol Sci. 2020 Mar 23. 21(6), 1-18. doi: 10.3390/ijms21062203.

ARTÍCULOS EN PREPARACIÓN

Diéguez-Martínez N, Espinosa-Gil S, Wang J, Yoldi G, Megías-Roda E, Bolinaga I, Domingo-Ortí I, Navaridas R, Colás E, Dolcet X, Gray NS, Lizcano JM.

MAPK ERK5: a new antitumor target to tackle endometrioid cancer proliferation and survival.

Cancer research.

Gámez A, Bolinaga I, Yoldi G, Espinosa-Gil S, Megías-Roda E, **Diéguez-Martínez N**, Wang J, Gray NS, Muñoz-Guardiola P, Lizcano JM.

ERK5 inhibition induces autophagy-mediated cancer cell death by activating ER stress

Frontiers in Cell and Developmental Biology. Submitted.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ABREVIATURAS.....	IX
RESUMEN/SUMMARY.....	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
1. LA MAP KINASA ERK5.....	3
1.1. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LAS MAP KINASAS.....	3
1.2. LA MAP QUINASA ERK5.....	5
1.2.1. ESTRUCTURA Y REGULACIÓN DE ERK5.....	6
1.2.2. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE ERK5. PAPEL DE LA SUPERCHAPERONA HSP90-CDC37.....	7
1.2.3. MECANISMOS DE TRANSLOCACIÓN NUCLEAR DE ERK5.....	8
1.2.4. ACTIVACIÓN DE ERK5 POR MEK5.....	10
MEK5: quinasa activadora de ERK5.....	11
1.2.5. SUSTRATOS DE ERK5.....	13
Sustratos nucleares.....	13
Sustratos no nucleares.....	14
1.2.6. FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE ERK5.....	15
2. ERK5 Y CÁNCER.....	19
2.1. ROL DE ERK5 EN PROLIFERACIÓN TUMORAL Y TUMORIGÉNESIS.....	19
2.2. ERK5 CONTROLA LA SUPERVIVENCIA DE LA CÉLULA TUMORAL.....	27
2.2.1. Los inhibidores de ERK5 o MEK5 inducen toxicidad en células tumorales.....	27
Inhibidores de MEK5.....	27
Inhibidores de la vía MEK5-ERK5.....	28
2.2.2. El silenciamiento de ERK5 induce toxicidad en células tumorales.....	31
2.2.3. ERK5 implicada en resistencia a la terapia dirigida contra las MAPK RAS-MEK-ERK.....	33
3. CÁNCER DE ENDOMETRIO.....	35
3.1. ENDOMETRIO.....	35
3.2. CÁNCER DE ENDOMETRIO.....	36
3.2.1. Clasificación del cáncer de endometrio.....	37
3.2.2. Biología del cáncer de endometrio.....	39
3.2.3. Terapia contra el cáncer de endometrio.....	40

OBEJTIVOS.....	44
MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
1. CULTIVOS CELULARES.....	49
1.1. Líneas celulares utilizadas.....	49
1.2. Tratamiento de las células.....	51
1.3. Ensayo de viabilidad celular (MTT)	51
1.4. Ensayo de proliferación por contaje celular.....	52
1.5. Ensayo de proliferación mediante incorporación de BrdU.....	52
1.6. Ensayo de formación de colonias.....	53
2. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	53
2.1. Lisis y cuantificación de proteína.....	53
2.2. Extracción proteica de tumores <i>xenograft</i>	54
2.3. Extracción de proteínas de biopsias de pacientes oncológicos.....	54
2.4. Fraccionamiento subcelular.....	54
2.5. Técnicas electroforéticas para la detección de proteínas.....	55
Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.....	55
Electrotransferencia de proteínas: Inmunoblot.....	55
3. ENSAYO DE ACTIVIDAD QUINASA.....	57
4. INMUNOCITOQUÍMICA.....	58
5. ESTUDIO DE LA MUERTE APOPTÓTICA.....	58
Análisis por citometría de flujo: incorporación de Anexina V y de yoduro de propidio.....	58
Tinción de nuclear con Hoescht 33258.....	59
6. TRANSFECCIÓN DE DNA EN CÉLULAS DE MAMÍFERO.....	59
Transfección con Polietilenamina (PEI)	60
Transfección con Lipofectamina 2000.....	60
7. BIOLOGÍA MOLECULAR.....	61
7.1. Amplificación de DNA.....	61
7.2. Producción de lentivirus para silenciar la ERK5 celular o para sobreexpresar el mutante constitutivamente nuclear ERK5-5E.....	62
7.3. Infección de células con lentivirus shRNAi para ERK5 o lentivirus ERK5-5E.....	63
7.4. Ensayo de gen reportero luciferasa para la actividad transcripcional de los promotores de AP-1, NF- κ B y p53.....	64
7.5. Generación de células Ishikawa CRISPR MEK5 ^{-/-}	65

7.6. Extracción de RNA total de células en cultivo.....	65
7.7. PCR cuantitativa por transcripción reversa (RT-qPCR).....	65
8. GENERACIÓN DE TUMORES <i>XENOGRAFTS</i>	66
8.1. Amplificación e inyección de células.....	66
8.2. Tratamiento y seguimiento de los ratones.....	67
8.3. Necropsia y obtención de muestras.....	67
8.4. Inmunohistoquímica.....	67
9. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO. MICROARRAYS DE mRNA.....	69
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	69
RESULTADOS.....	71
CAPÍTULO I.....	73
1. ANTECEDENTES. DESARROLLO DEL NUEVO INHIBIDOR DE ERK5 JWG-071.....	75
2. DESARROLLO PRECLÍNICO DEL JWG-071. EFECTO SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.....	77
2.1. JWG-071 inhibe la proliferación celular basal de células de cáncer ginecológico.....	77
2.2. JWG-071 inhibe la proliferación inducida por EGF en células de cáncer ginecológico.....	79
2.3. La inhibición farmacológica (JWG-071) o genética (células CRISPR-MEK5 ^{-/-}) de la actividad quinasa de ERK5 reduce la proliferación celular <i>in vivo</i>	83
3. DESARROLLO PRECLÍNICO DEL JWG-071. EFECTO CITOTÓXICO EN CÉLULAS DE CÁNCER GINECOLÓGICO.....	87
3.1. JWG-071 afecta a la viabilidad celular e induce apoptosis <i>in vitro</i>	87
3.2. JWG-071 inhibe la vía canónica de NF-κB al reducir los niveles de expresión de NEMO/IKKγ.....	93
3.3. JWG-071 induce la activación de la vía apoptótica regulada por las MAPK JNKs.....	100
3.4. JWG-071 reduce el crecimiento de tumores <i>in vivo</i> , en un modelo murino <i>xenograft</i> de cáncer de endometrio humano.....	104
3.5. JWG-071 sensibiliza frente a la quimioterapia estándar en cáncer endometrial y cervical. Efecto en líneas celulares.....	106
3.6. JWG-071 sensibiliza frente a la quimioterapia estándar de tumores <i>xenografts</i> de cáncer endometrial.....	109
CAPÍTULO II.....	113
1. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA MAP QUINASA ERK5 EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO QUIMIOSENSIBLES Y QUIMIORRESISTENTES.....	115
1.1. Localización subcelular de ERK5 y sensibilidad del NBL a inhibidores de ERK5 y quimioterápicos.....	115

2. LA EXPRESIÓN DE ERK5 NUCLEAR EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA QUIMIOSENSIBLES CONFIERE RESISTENCIA AL CISPLATINO.....	119
2.1. Caracterización de una forma de ERK5 constitutivamente nuclear.....	119
2.2. ERK5 nuclear confiere resistencia al cisplatino.....	122
2.3. ERK5 nuclear confiere resistencia al cisplatino mediante un mecanismo dependiente de p53.....	123
3. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE ERK5 SOBRE LAS CÉLULAS DE NBL QUIMIORRESISTENTES.....	125
3.1. El silenciamiento de ERK5 induce apoptosis células de NBL quimiorresistentes.....	125
3.2. Análisis del silenciamiento de ERK5 en la expresión génica de células NBL quimiorresistentes.....	127
DISCUSIÓN.....	133
1. ACTIVIDAD QUINASA DE ERK5 COMO DIANA ANTITUMORAL EN CÁNCER DE ENDOMETRIO.....	135
1.1. Proliferación celular mediada por ERK5.....	136
1.2. ERK5 como nueva diana en el cáncer endometrioide (Tipo I).....	139
1.3. La inhibición de ERK5 como coadyuvante en el tratamiento quimioterapéutico del cáncer endometrial.....	146
2. ROL DE ERK5 EN EL NEUROBLASTOMA.....	148
2.1. Papel de ERK5 nuclear en la resistencia del NBL a quimioterapia.....	149
2.2. Silenciamiento de ERK5 como estrategia para el tratamiento del NBL agresivo.....	151
CONCLUSIONES.....	155
BIBLIOGRAFÍA.....	161
ANEXOS.....	193
ANEXO 1: Cuantificación y calidad del RNA de las muestras utilizadas para el ensayo de microarray en CHLA-90 y SK-N-BE(2).....	195
ANEXO 2: Genes <i>UP</i> y <i>DOWN</i>-regulados obtenidos en el análisis de microarrays realizado en células CHLA-90 y SK-N-BE(2) al silenciar ERK5.....	205

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1: Representación esquemática de las cuatro vías canónicas de señalización de las MAP quinasa.....	3
Figura 2: Modelo molecular de los <i>docking sites</i> de la MAP quinasa p38 α	5
Figura 3: Alineamiento múltiple de las secuencias de la proteína ERK5 humana y de ratón.....	6
Figura 4: Representación esquemática de los dominios funcionales de ERK5.....	7
Figura 5: Modelos de translocación nuclear de ERK5.....	10
Figura 6: Representación esquemática de los dominios funcionales de MEK5 α y MEK5 β	12
Figura 7: Representación esquemática de la vía de MEK5-ERK5 que recoge los activadores de la misma.....	13
Figura 8: Estructura química de algunos de los inhibidores de ERK5 desarrollados durante los últimos años.....	30
Figura 9: Anatomía del sistema reproductor femenino.	35
Figura 10: Esquema del endometrio uterino caracterizado por las capas basal y funcional.....	35
Figura 11: Tasas de incidencia estandarizadas por edad del cáncer de cuerpo uterino utilizando datos de GLOBOCAN, 2019.	37
Tabla 1: Efecto de la inhibición o el silenciamiento de ERK5 en la proliferación celular y la reducción tumoral.....	32
Tabla 2: Características clínicas y patológicas de los subtipos de cáncer de endometrio que recoge la clasificación de Bokhman en 1983.	38
Tabla 3: Clasificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) para cáncer de endometrio.	39

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 11: Esquema representativo de un ensayo radiométrico enzimático.....	57
Figura 12: Representación esquemática de los vectores y protocolo utilizados para la generación de lentivirus shRNA de ERK5 y lentivirus ERK5-5E.....	63
Tabla 4: Composición de los tampones utilizados en ensayos de electroforesis y de inmunoblot....	53
Tabla 5: Composición de los tampones utilizados en ensayos de electroforesis y de inmunoblot.....	55
Tabla 6: Anticuerpos primarios empleados en este trabajo. WB: Western Blot; IHC: Inmunohistoquímica; IC: Inmunocitoquímica; IF: Inmunofluorescencia.....	56
Tabla 7: Composición tampones utilizados para inmunofluorescencia de cultivos celulares.....	58
Tabla 8: Vectores de expresión utilizados en este trabajo y su procedencia.....	59

Tabla 9: Secuencias y referencias de los siRNAs utilizados en el silenciamiento génico de NEMO/IKK- γ humana en este trabajo.....	61
Tabla 10: Secuencias y referencias de los shRNAs usados para silenciar ERK5 endógena en este trabajo.....	62

RESULTADOS

Figura 13: Desarrollo JWG-071, un nuevo inhibidor específico de ERK5 sin actividad BRD4.....	76
Figura 14: El nuevo inhibidor específico de ERK5, JWG-071.....	77
Figura 15: El inhibidor específico de ERK5 JWG-071 inhibe la proliferación de líneas tumorales humanas.....	78
Figura 16: JWG-071 inhibe la proliferación de líneas tumorales humanas.....	79
Figura 17: Los inhibidores específicos de ERK5 JWG-071 y AX15836 inhiben la activación de ERK5 y la proliferación celular inducida por EGF.....	80
Figura 18: JWG-071 previene la translocación nuclear de ERK5 inducida por EGF, y reduce la actividad transcripcional de AP-1 mediada por ERK5 activa.....	81
Figura 19: Las células MEK5 CRISPR/Cas9 KO no muestran activación de ERK5 en respuesta a EGF.....	82
Figura 20: El inhibidor específico de ERK5 JWG-071 presenta óptimos parámetros farmacocinéticos.....	83
Figura 21: El JWG-071 inhibe el crecimiento de tumores <i>xenografts</i> humanos de endometrio.....	84
Figura 22: La depleción genética de MEK5 resulta en una menor proliferación basal de células Ishikawa.....	85
Figura 23: La depleción genética de MEK5 inhibe el crecimiento de tumores <i>xenografts</i> humanos de endometrio.....	86
Figura 24: Expresión de la proteína ERK5 en diferentes cánceres humanos.....	87
Figura 25: La sobreexpresión de ERK5 correlaciona con una menor supervivencia en pacientes de carcinoma endometrial y cervical.....	88
Figura 26: El inhibidor específico de ERK5 JWG-071 reduce la viabilidad de diferentes células tumorales humanas.....	88
Figura 27: La inhibición de la kinasa DCLK1 no afecta a la viabilidad de células de carcinoma endometrial.....	89
Figura 28: La inhibición de ERK5 induce apoptosis en células tumorales humanas.....	90
Figura 29: La inhibición de ERK5 induce muerte apoptótica en células humanas de cáncer endometrial y cervical.....	91
Figura 30: Las células MEF Bax ^{-/-} /Bak ^{-/-} son resistentes al tratamiento con JWG-071.....	92
Figura 31: ERK5 correlaciona con p65 en tumores humanos de endometrio.....	94
Figura 32: ERK5 correlaciona con p65 en tumores humanos de cáncer endometrioide.....	95
Figura 33: Los niveles de proteína ERK5 no correlacionan con los de NEMO/IKK γ o IKK- β en tumores humanos de endometrio.....	96

Figura 34: La inhibición (JWG-071) o el silenciamiento de ERK5 (shERK5) reduce los niveles de expresión de p65 en líneas tumorales de cáncer endometrial y cervical.....	97
Figura 35: La inhibición de ERK5 reduce la localización nuclear basal de p65 y su actividad transcripcional.....	98
Figura 36: La inhibición de ERK5 resulta en una menor expresión de NEMO/IKK γ y de la vía canónica de NF-kB.....	99
Figura 37: La inhibición de ERK5 induce la activación de la vía apoptótica regulada por las MAPK JNKs.....	100
Figura 38: La sobreexpresión de NEMO/IKK γ protege frente a la toxicidad inducida por la inhibición de ERK5.....	101
Figura 39: El inhibidor de la vía NF-kB, BAY-117082, induce apoptosis mediante la activación de la vía de las JNKs.....	102
Figura 40: El super-represor de IKK α reduce los niveles de p65 y activa la vía apoptótica inducida por las JNKs.....	103
Figura 41: JWG-071 reduce el crecimiento tumoral e induce apoptosis <i>in vivo</i> (<i>xenografts</i> humanos de endometrio).....	105
Figura 42: JWG-071 inhibe la vía canónica de NF-kB <i>in vivo</i> (tumores <i>xenografts</i> humanos de endometrio).....	106
Figura 43: JWG-071 sensibiliza <i>in vitro</i> frente a la citotoxicidad inducida por quimioterápicos estándar utilizados en el tratamiento de cánceres ginecológicos.....	107
Figura 44: JWG-071 sinergiza con quimioterápicos estándar en ensayos clonogénicos de formación de colonias.....	108
Figura 45: La inhibición de ERK5 potencia la apoptosis inducida por paclitaxel en células HeLa de cáncer de cérvix humano.....	109
Figura 46: JWG-071 potencia la acción antimetabólica de paclitaxel <i>in vivo</i> (<i>xenografts</i> humanos de endometrio).....	110
Figura 47: Altos niveles de MEK5 correlacionan con mal pronóstico de NBL humano.....	115
Figura 48: Caracterización de distintas líneas celulares de neuroblastoma (NBL) humano.....	116
Figura 49: Efecto de la inhibición de ERK5 (XMD8-92 ó JWG-071) sobre la viabilidad de líneas celulares de neuroblastoma (NBL) humano.....	117
Figura 50: Localización subcelular de ERK5 en distintas líneas de neuroblastoma (NBL).....	118
Figura 51: Caracterización del mutante constitutivamente nuclear de ERK5, ERK5-5E.....	120
Figura 52: Caracterización de la actividad quinasa y transcripcional, y de la capacidad de inducir proliferación del mutante constitutivamente nuclear de ERK5, ERK5-5E.....	121
Figura 53: La sobreexpresión del mutante ERK5-5E confiere resistencia frente a la apoptosis inducida por cisplatino.....	122
Figura 54: Rol de p53 en la resistencia al cisplatino en células NBL que sobre-expresan el mutante ERK5-5E.....	124
Figura 55: El silenciamiento de ERK5 inhibe la proliferación y activa la apoptosis de líneas de neuroblastoma quimiorresistentes.....	126

Figura 56: Efecto del silenciamiento de ERK5 (shRNAs) en los niveles de ERK5 en células quimiorresistentes SK-N-BE(2) y CHLA-90.....	127
Figura 57: Análisis de los cambios en la expresión génica en respuesta al silenciamiento de ERK5 en células de NBL.....	128
Figura 58: Análisis de cambios en la expresión génica en respuesta al silenciamiento de ERK5 con shERK5#1.....	129
Figura 59: Análisis de cambios en la expresión de genes reguladores de muerte celular en respuesta al silenciamiento de ERK5 (shRNA5#1) en células CHLA-90.....	130
Tabla 11: Características de ERK5 en las líneas celulares de neuroblastoma (NBL) humano analizadas.....	118

DISCUSIÓN

Figura 60: Vía canónica de NF- κ B.....	142
Figura 61: Mecanismo de acción del nuevo inhibidor específico de ERK5, JWG-071.....	145
Figura 62: Graphical abstract del papel de ERK5 nuclear en neuroblastoma.....	153

ABREVIATURAS

aa: Amino acid	IL: Interleukine
AKT: RAC-alpha serine/threonineprotein kinase; protein kinase B	JNK: c-jun N-terminal Kinase
ALK: Anaplastic lymphoma kinase	LIF: Leukemia inhibitory factor
AP1: Activator protein 1	LMA: Acute myeloid leukemia
Asp (D): Aspartic acid	LMC: Chronic myeloid leukemia
ATCC: American type culture collection	Lys (K): Lysine
ATP: Adenosine triphosphate	MAPK: Mitogen-activated protein kinase
Bad: Bcl-2-associated death promoter	MDM2: Mouse double minute 2 homolog
Bak: Bcl-2 homologous antagonist-killer	MEF: mouse embryonic fibroblast
Bax: Bcl-2-like protein 4	MEF2: Myocyte enhancer factor 2
Bcl-2: B-cell lymphoma 2	MEK: MAPK kinase
BDNF: Brain-derived neurotrophic factor	Mg²⁺: Magnesium ion
Bim: Bcl-2-interacting mediator of cell death	MM: Multiple myeloma
BMK-1: Big MAP kinase-1	MMP-9: mmp 9 matrix metalloproteinase 9
BNIP3: BCL2 Interacting Protein 3	mTOR: Mammalian target of rapamycin
Cdc37: Cell division cycle 37	NES: Nuclear export signal
CDKs: Cyclin-dependent kinase	NLS: Nuclear localization signal
cDNA: complementary DNA	NGF: Nerve growth factor
CHIP: Carboxy-terminus of Hsc70 interacting protein	NSCLC: Non-small cell lung cancer
c-Myc: Celullar Myelocytomatosis	p38: p38 mitogen-activated protein kinase
CREB: cAMP response element binding protein	PDGF: Platelet-derived growth factor
DCLK1/2: Doublecortin-like kinase 1/2	PEI: Polietilenamin
DUSP: Dual-specificity phosphatase	PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase
EGF: Epidermal growth factor	PML: Promyelocytic leukemia protein
ER: Estrogen receptor	PTEN: Phosphatase and tensin homologue
ERK1/2: Extracellular signal-regulated kinase 1/2	PTP: Protein tyrosine phosphatase
ERK5: Extracellular-signal-regulated kinase 5; MAPK7	PUMA: p53 upregulated modulator of apoptosis
ERK5i: ERK5 inhibitor	SDS-PAGE: SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis
FGF-2: Fibroblast growth factor 2	Ser (S): Serine
FoxO3a: Forkhead box O 3a	SUMO: Small ubiquitin-like modifier
GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	TAD: transcriptional activation domain
G-CSF: Granulocyte colony-stimulating factor	Thr (T): Threonine
Glu (E): Glutamic acid	TNBC: Triple negative breast cancer
GST: Glutathione S-transferase	Tyr (Y): Tyrosine
HER2: Human Epidermal growth factor Receptor-type2	UPR: Unfolded Protein Response
Hsp90: Heat shock protein 90	VEGF: Vascular endothelial Growth factor
IGF1: Insulin-like growth factor 1	

SUMMARY

The MAP kinase ERK5 signaling pathway is activated in response to growth factors and different forms of stress. During the last few years, several works have shown that ERK5 plays an important role in regulating cell proliferation and survival in different cancer paradigms. However, these experimental evidences were achieved using ERK5 inhibitors that, subsequently, were shown to be non-specific. Among others, first generation ERK5 inhibitors also impair the activity of the transcriptional regulator BRD4 (a known antitumor target). Consequently, the role of ERK5 as a regulator of tumor proliferation and survival has recently been questioned.

Here, we have characterized JWG-071, a new generation competitive and specific ERK5 inhibitor (ERK5i), without BRD4 activity. This small compound exhibits excellent pharmacokinetic parameters, and inhibits ERK5 efficiently in cell lines and in xenograft tumors (systemic administration). To perform the preclinical development of JWG-071, we have used endometrioid and cervical gynecological cancer models. The role of ERK5 in these cancer models has not been previously reported.

We show that ERK5 regulates proliferation of gynecological cancer cell lines, through activation of the transcription factor AP-1. Thus, pharmacological (JWG-071) or genetic (CRISPR/Cas9 MEK5^{-/-} cells) inhibition of ERK5 impairs proliferation and growth of endometrioid cancer cells and xenografts (Ishikawa cells). Moreover, in this work we present evidences supporting that ERK5 kinase activity is required for the survival of endometrioid and cervical cancer cell lines. Thus, ERK5 inhibition induces apoptosis in cell lines and in xenografts tumors (Ishikawa cells), by impairing the canonical NF- κ B pathway. The NF- κ B pathway regulates endometrioid cancer proliferation and survival. Mechanistically, ERK5 inhibition results in a drastic reduction of the upstream regulator NEMO/IKK, leading to inhibition of p65/RELA expression, nuclear localization and transcriptional activity. Furthermore, we show that inhibition of NF- κ B in response to JWG-071 results in activation of the JNK-regulated apoptotic pathway, both *in vitro* (cell lines) and *in vivo* (tumor xenografts). In agreement with this, human endometrioid tumors show elevated levels of ERK5 and RELA proteins, compared to peritumoral tissue. Finally, we show that ERK5 inhibition sensitizes endometrioid and cervical cancer cells to standard chemotherapy. Of interest, systemic administration of JWG-071 sensitizes endometrioid xenografts tumors (Ishikawa cells) to paclitaxel treatment. Overall, we propose ERK5 as a new target to tackle endometrioid cancer.

We also provide preliminary evidences showing that nuclear ERK5 plays a role in modulating neuroblastoma cancer survival and resistance to chemotherapy. Using a panel of NBL cell lines, we found that chemosensitive (functional p53) NBL cells are sensitive to ERK5 inhibitors, and show a cytosolic ERK5 localization. On the contrary, high-risk chemoresistant (non-functional p53) NBL cells are less sensitive to ERK5 inhibitors and show nuclear ERK5 localization. Interestingly, chemosensitive NBL IMR-32 and SH-SY5Y cells became resistant to cisplatin in response to overexpression of a constitutively nuclear form of ERK5, by a mechanism that impairs p53 expression and transcriptional activity. Finally, we performed a transcriptome (DNA microarrays) analysis to investigate the impact of ERK5 silencing (shRNAi) in high-risk chemoresistant NBL CHLA-90 and SK-N-BE(2) cell lines. Preliminary analysis show that depletion of the ERK5 protein induces changes in the expression of genes related to cell cycle, transcription and apoptosis. These results leads us to propose chemoresistant NBL as a model to validate the antitumor action of ERK5 degrader drugs (PROTACs).

RESUMEN

La vía de señalización de la MAP quinasa ERK5 se activa en respuesta a factores de crecimiento y diferentes formas de estrés. Durante los últimos años, varios trabajos han mostrado que ERK5 juega un papel importante en la proliferación y supervivencia en diferentes paradigmas del cáncer. Sin embargo, estas evidencias experimentales se han conseguido utilizando inhibidores de ERK5 que posteriormente han demostrado no ser específicos. Entre otros, estos inhibidores de ERK5 también afectan a la actividad del regulador transcripcional BRD4 (una conocida diana antitumoral), por lo que recientemente se ha puesto en cuestión el papel de ERK5 como regulador de la proliferación y de la supervivencia tumoral.

En este trabajo hemos caracterizado JWG-071, un inhibidor competitivo y específico de ERK5 (ERK5i), sin actividad BRD4. Este pequeño compuesto muestra unos excelentes parámetros farmacocinéticos, e inhibe ERK5 eficientemente en líneas celulares y en tumores *xenografts*. Para el desarrollo preclínico de este inhibidor de ERK5 de nueva generación se han utilizado modelos de cáncer ginecológico endometrioide y cervical, no estudiados hasta la fecha.

Nuestros resultados muestran que ERK5 regula la proliferación de líneas celulares de cáncer ginecológico, a través del factor de transcripción AP-1. Así, la inhibición farmacológica (JWG-071) o genética (células CRISPR/Cas9 MEK5^{-/-}) de ERK5 reduce la proliferación celular y el crecimiento de tumores *xenografts* de cáncer endometrioide (células Ishikawa). Por otra parte, presentamos evidencias que muestran que la actividad quinasa de ERK5 es necesaria para la supervivencia de líneas celulares de cáncer endometrioide y cervical. Así, la inhibición de ERK5 induce apoptosis en estas líneas y en tumores *xenografts* de células Ishikawa, al inhibir la vía canónica de NF- κ B, una vía que regula la proliferación y supervivencia del cáncer endometrioide. Mecánicamente, la inhibición de ERK5 resulta en una drástica reducción del regulador apical NEMO/IKK γ , lo que conduce a la inhibición de la expresión, localización nuclear y actividad transcripcional de p65/RELA. Asimismo, mostramos que la inhibición de NF- κ B en respuesta al JWG-071 resulta en la activación de la vía apoptótica regulada por JNK, tanto *in vitro* (líneas celulares) como *in vivo* (tumores *xenografts*). De acuerdo con estos resultados, que muestran una relación funcional entre ERK5 y NF- κ B, muestras de pacientes con cáncer endometrioide presentan una elevada expresión proteica de ERK5 y p65/RELA, comparada con el tejido peritumoral. Finalmente, la inhibición de ERK5 sensibiliza células de cáncer endometrioide y cervical a la quimioterapia estándar. De interés, la administración sistémica de JWG-071 sensibiliza a tumores *xenografts* endometrioides (Ishikawa) al tratamiento con paclitaxel. En definitiva, proponemos ERK5 como una nueva diana para el tratamiento del cáncer endometrioide.

Por otra parte, en este trabajo se han obtenido evidencias preliminares que muestran que ERK5 nuclear media en la supervivencia y resistencia a la quimioterapia del neuroblastoma (NBL) humano. Utilizando un panel de líneas celulares NBL, mostramos que células NBL quimiosensibles (p53 funcional) presentan ERK5 citosólica y son sensibles a los ERK5i. Por el contrario, células NBL de alto riesgo quimiorresistentes (p53 no-funcional) presentan ERK5 nuclear y escasa sensibilidad a los ERK5i. De interés, la sobreexpresión de una forma constitutivamente nuclear de ERK5 confiere resistencia al cisplatino en células NBL quimiosensibles, al reducir la expresión y actividad transcripcional de p53. Finalmente, se ha llevado a cabo un estudio con el fin de valorar el impacto del silenciamiento de ERK5 en el transcriptoma de dos líneas celulares de NBL quimiorresistentes. Los resultados preliminares muestran que la ausencia de ERK5 induce cambios en la expresión de genes relacionados con el ciclo celular, transcripción y apoptosis, lo que nos lleva a proponer al NBL quimiorresistente como modelo para validar la acción antitumoral de fármacos *degraders* (PROTACs) de ERK5.

INTRODUCCIÓN

1. LA MAP KINASA ERK5

1.1. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LAS MAP KINASAS

Las células eucariotas se caracterizan por su capacidad para percibir los estímulos externos y responder a ellos de una manera dinámica. Esa capacidad de recibir información y procesarla, y la consiguiente toma de decisiones, se llevan a cabo gracias a las vías de señalización celular. Estas vías regulan la transducción de señales externas, desde de la membrana celular al citosol para finalmente modular la transcripción génica y la actividad de numerosas proteínas.

La vía de señalización de proteínas quinasas activadas por mitógenos, o MAPKs, es una de las vías de señalización mejor caracterizada y evolutivamente conservada. Las MAPKs son una familia de proteínas quinasas activadas por diversos estímulos extracelulares (Turjanski et al., 2007). Entre los estímulos que activan estas vías se encuentran factores de crecimiento que actúan a través de receptores de membrana con actividad tirosina quinasa (como EGF o PDGF) o a través receptores serina/treonina quinasa (como TGF- β), diferentes formas de estrés (como choque térmico, choque osmótico, radiaciones ionizantes o isquemia), o péptidos vasoactivos que actúan a través de receptores acoplados a proteínas G (como angiotensina II o endotelina-1). La activación de las distintas vías de MAPKs controla una pléyade de procesos biológicos, tales como la proliferación, diferenciación, migración y supervivencia (apoptosis) celular (Chang and Karin, 2001; Pearson et al., 2001).

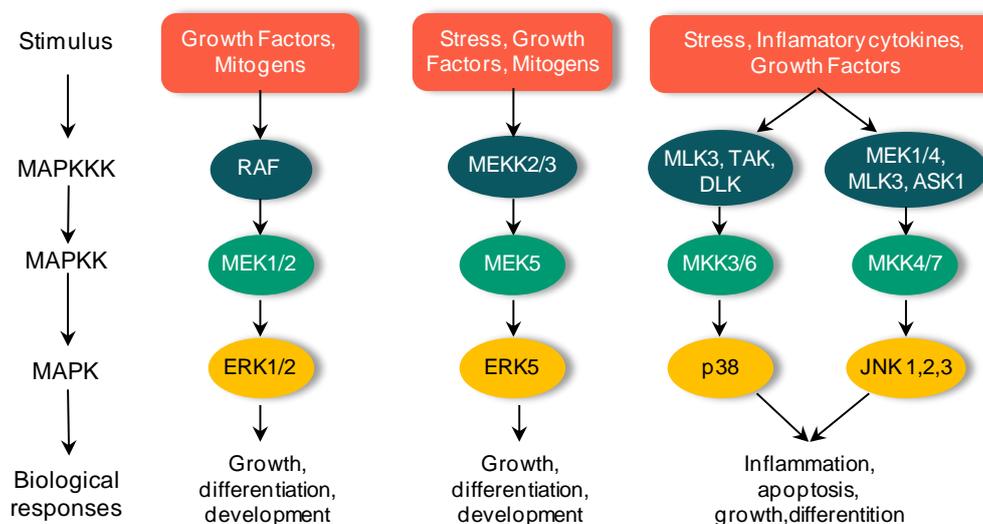


Figura 1. Representación esquemática de las cuatro vías canónicas de señalización de las MAP quinasas.

En mamíferos, se han descrito 4 subfamilias de MAPK: las ERK1/2 (*Extracellular regulated kinases 1 and 2*), que son activadas principalmente por mitógenos y factores de crecimiento, y están asociadas a proliferación y supervivencia celular; las JNKs (*c-Jun amino-terminal kinases*, JNK1, JNK2 y JNK3) y las p38 (α , β , γ , δ) activadas en respuesta a citoquinas y diferente tipos de estrés, que principalmente median en la inflamación y la apoptosis; y ERK5 (*Extracellular regulated kinase 5*), activada por mitógenos y distintos tipos de estrés (Johnson and Lapadat, 2002) (Figura 1). Cada subfamilia de MAPK está compuesta por tres

INTRODUCCIÓN

quinasas evolutivamente conservadas: MAPKK quinasa (también denominadas MAP3K, MEKK o MEK quinasa), MAPK quinasa (MAP2K, MKK o MEK), y MAPK (ERK) que se activan de forma secuencial mediante fosforilación (**Figura 1**). En respuesta a estímulos extracelulares, la activación del correspondiente receptor induce la activación de las correspondientes MAP3Ks, serina/treonina quinasas que específicamente fosforilan residuos Ser o Thr de las MEKs. Finalmente, las MEKs activan a las correspondientes MAPKs mediante la fosforilación dual de los residuos de treonina y tirosina del motivo Thr-X-Tyr (T-X-Y) conservado y situado en el bucle de activación del dominio quinasa (Turjanski et al., 2007). Las MAPKs fosforilan proteínas tanto citosólicas como nucleares. Así, en respuesta a un estímulo sostenido, las MAPKs translocan al núcleo celular y provocan la respuesta transcripcional correspondiente, mediante la fosforilación específica de factores de transcripción.

La cinética de activación de las MAPKs está controlada por proteínas fosfatasas específicas que desfosforilan el motivo T-X-Y. La familia de fosfatasas de doble especificidad (DUSPs) pertenece a la superfamilia de proteínas tirosina fosfatasas (PTPs), y catalizan la desfosforilación específica de los residuos de fosfo-treonina y fosfo-tirosina del motivo T-X-Y de las MAPKs (Guan et al., 1991; Huang and Tan 2012). La especificidad de las DUSPs viene determinada por la unión a la MAPKs correspondiente a través su dominio N-terminal, evento que además potencia la actividad catalítica de la fosfatasa (Rohan et al., 1993).

La activación secuencial de las MAPK está potenciada y regulada por proteínas de andamiaje (*scaffolding*) específicas, que ayudan a los componentes de la vía de las MAPKs a propagar la señal y a dirigirla a la ubicación celular correcta. Estas proteínas *scaffolding* contienen varios dominios que unen simultáneamente a dos o más componentes de la vía de señalización. Unen específicamente cada quinasa con su sustrato, formando un complejo multienzimático, para lograr la transducción de señales en respuesta a estímulos específicos (Morrison and Davis, 2003). Dentro de este complejo, las quinasas están protegidas de la acción de las fosfatasas desactivadoras y se minimiza la interferencia con otras vías de señalización (Locasale et al., 2007). Dado que no todos los estímulos dan lugar a la misma respuesta celular, existen diferentes proteínas *scaffolding* que reclutan proteínas adaptadoras con la finalidad de dirigir las MAPKs a regiones subcelulares específicas, mejorando la señalización y proporcionando una plataforma para la interacción con sus sustratos.

Existen varias proteínas *scaffolding* para la cascada de ERK1/2. La más estudiada es KSR (*kinase suppressor of Ras*) y β -arrestina. KSR se asocia de forma constitutiva con MEK1/2 y recluta C-Raf y ERK1/2 en respuesta a la activación del receptor del factor de crecimiento correspondiente (Morrison, 2001). β -arrestina une C-Raf, MEK1 y ERK1/2, facilitando la fosforilación y activación de ERK1/2 por MEK1 y, al mismo tiempo, reteniendo ERK1/2 en el citosol y prolongando los eventos de señalización citosólicos (DeWire et al., 2007). En el caso de las JNKs y las p38, las proteínas JIP (*JNK-interacting proteins*) regulan la señalización de estas MAPKs actuando como proteínas *scaffolding*. Las proteínas JIP forman complejos con módulos específicos de la vía de JNK y p38, permitiendo la co-localización espacial de tres proteínas quinasas que forman el módulo de activación de las JNKs y las p38s (Yasuda et al., 1999). Las JIP desempeñan importantes funciones en el desarrollo del cerebro, el tráfico neuronal, la apoptosis, la función de las células beta pancreáticas y en su respuesta a la insulina (Whitmarsh and Davis, 1998; Yasuda et al., 1999). No se han descrito proteínas *scaffolding* para la vía de señalización MEK5-ERK5.

La especificidad de las MAPK viene determinada por su interacción con motivos específicos (*D-domains*) de las proteínas sustrato. Las MAP quinasas interactúan con sus sustratos a través de tres subdominios diferentes, localizados en el dominio quinasa (Tanoue et al., 2000). El dominio CD (*Common Docking*) se encuentra en la parte C-terminal del dominio catalítico y comprende una serie de residuos ácidos que interactúan con los residuos básicos presentes en los motivos *D-domain* de los sustratos. El dominio ED recibe su nombre porque contiene dos residuos ácidos Glu y Asp, y tiene importancia en la interacción con los sustratos de tipo MAPKAP-Ks (*MAP kinase activated protein kinases*), como las p90RSKs (activadas por ERK1/2) o la MAPKAP-K2 (activada por las p38s). Por último, el dominio *docking groove* interactúa con dos aminoácidos hidrofóbicos del *D-domain* del sustrato (**Figura 2**), y su reconocimiento por el sustrato induce cambios conformacionales en el centro activo del dominio quinasa (Tanoue et al., 2001).

La mayoría de los sustratos fisiológicos de las MAP quinasas poseen *D-domains*, lo que confiere especificidad al enzima. En general, las MAP quinasas requieren residuos de prolina adyacentes a los residuos de Ser o Thr fosforilados. Así, el reconocimiento del sustrato implica la interacción de su motivo *D-domain* con los dominios CD, ED y *docking Groove* adyacentes al centro activo de la quinasa. Una vez fijado, se produce un cambio conformacional que facilita la fosforilación del correspondiente residuo de Ser/Thr (Tanoue et al., 2001).

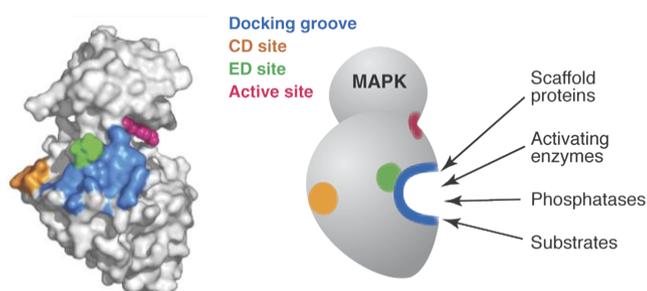


Figura 2. Modelo molecular de los sitios de interacción de la MAP quinasa p38 α . Se muestra el *docking groove* (azul) al que se une el *D-domain* del sustrato MEF2A y del activador MEK3b, el dominio CD (naranja) y el dominio ED (verde). El sitio activo aparece marcado en rosa. Figura modificada de Weston et al., 2002.

1.2. LA MAP QUINASA ERK5

En 1995, dos grupos de investigación independientes clonaron simultáneamente ERK5. Por un lado, Zhou y colaboradores aislaron por PCR el cDNA de MEK5 (proteína quinasa activadora de ERK5) que codificaba una proteína de 444 aminoácidos, y gracias a un ensayo de doble híbrido en levadura utilizando MEK5 como cebo identificaron componentes que interactuaban con MEK5. Esto dio lugar al descubrimiento de una proteína de 816 aminoácidos con un dominio quinasa similar al de ERK1/2, que fue denominada ERK5 (Zhou et al., 1995). En un estudio paralelo, Lee y colaboradores llevaron a cabo el cribado de una librería de cDNA de placenta humana mediante PCR e identificaron una nueva MAPK con alta homología con ERK1/2. Esta proteína se distinguía del resto de miembros de la familia porque presentaba un dominio C-terminal más extenso, que le confería el doble de tamaño, por lo que fue denominada “Big

mERK5a. Por su parte, la isoforma ERK5a es activa y más abundante (Yan et al., 2001; Wang and Tournier, 2006; Nishimoto and Nishida, 2006).

Dominios funcionales de ERK5

ERK5 presenta una estructura única, no compartida con otras MAPKs. El dominio N-terminal de ERK5 (aa. 1-406) se inicia con una región requerida para la localización citoplasmática (aa. 1-77), seguida del dominio quinasa (aa. 54-346). El dominio quinasa contiene el motivo de fosforilación dual TEY en el bucle de activación (fosforilado por la quinasa activadora MEK5), que comparte un 60% de homología con el dominio quinasa de ERK1/2. Este dominio catalítico es importante para la interacción con MEK5 (aa. 78-139) y para la dimerización (aa. 140-406) que sufre ERK5 una vez activada (Wang and Tournier, 2006).

ERK5 presenta una cola C-terminal única (aa. 410-816), de unos 400 aminoácidos, que no comparte homología con ninguna otra proteína. En condiciones basales, esta cola posee una función autoinhibitoria sobre el dominio quinasa de ERK5 (Buschbeck and Ullrich, 2005). Contiene una señal de localización nuclear NLS (aa. 505-539), y dos dominios ricos en prolina PR1 (aa. 434-465) y PR2 (aa. 578-701) que sirven como posibles sitios de unión para proteínas que contienen dominios SH3, no descritas hasta la fecha (Zhou et al., 1995; Yan et al., 2001). La región C-terminal también contiene un dominio de interacción con el factor de transcripción MEF2 (*Myocyte enhancer factor-2*) (aa. 440-501), y un dominio de transactivación transcripcional TAD (aa. 664-789) que le permite actuar como co-activador de factores de transcripción como MEF2 (Kasler et al., 2000; Morimoto et al., 2007) (**Figura 4**).

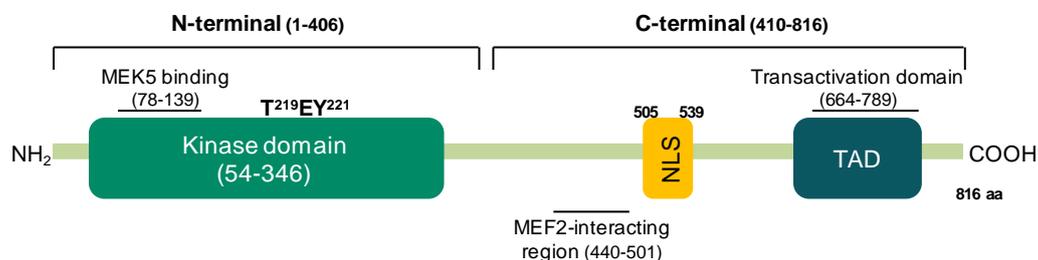


Figura 4. Representación esquemática de los dominios funcionales de ERK5. Se muestra el el motivo TEY del bucle de activación, necesario para la activación de ERK5. NLS, señal de localización nuclear; TAD, dominio de activación transcripcional.

1.2.2. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE ERK5. PAPEL DE LA SUPERCHAPERONA HSP90-CDC37.

Como ocurre para otras MAP kinasas, ERK5 basal/inactiva localiza mayoritariamente en el citosol celular, donde adopta una conformación cerrada en la que la cola C-terminal interactúa con el dominio quinasa (en el subdominio CD), lo que impediría la interacción de ERK5 con sus sustratos (Buschbeck and Ullrich, 2005). En esta conformación, el motivo NLS está oculto y no disponible para el transporte al núcleo (Kondoh et al., 2006). Una vez activada/fosforilada por MEK5, ERK5 fosforila su cola C-terminal en múltiples residuos (Ser496, Ser507, Ser720, Ser731, Thr733, Ser760, Ser764 y Ser766, Ser803) (Mody et al., 2003; Morimoto et al., 2007; Iñesta-Vaquera et al., 2010). Estas fosforilaciones inducen un cambio

INTRODUCCIÓN

conformacional que permite la exposición del motivo NLS y la translocación nuclear de ERK5. Una vez en el núcleo, ERK5 regularía la transcripción génica a través de dos mecanismos: fosforilación directa de factores de transcripción como MEF2C, c-MYC (ser62) o Sap1; o co-activación de factores de transcripción como MEF2D (Kasler et al., 2000; Morimoto et al., 2007).

A pesar de lo arriba expuesto, el modelo ERK5 basal/citosólica y activa/nuclear no explica las observaciones realizadas en varias líneas celulares tumorales, que muestran una ERK5 nuclear inactiva o una ERK5 activa citosólica (Borges et al., 2007). En este sentido, la descripción del interactoma de ERK5 permitió a nuestro laboratorio establecer que ERK5 interacciona con la chaperona Hsp90 y con la co-chaperona Cdc37 a través de su dominio quinasa (Erazo et al., 2013). Hsp90 (*Heat shock protein 90*) regula el plegamiento y la maduración de numerosas proteínas, incluyendo proteínas quinasas y factores de transcripción. En el caso de los receptores de hormonas esteroideas, Hsp90 estabiliza su forma inactiva y la mantiene competente para su activación (Jackson, 2012). Cdc37 es una co-chaperona que está especializada en asociar Hsp90 a numerosas proteínas quinasas, y es requerida para mantener la estabilidad de estas enzimas (Smith et al., 2009). En el caso de ERK5, y como pasa para otras proteínas clientes de la superchaperona Hsp90-Cdc37, la inhibición farmacológica de Hsp90 (geldanamicina o radicicol) o de Cdc37 (celastrol) induce la ubiquitinación y degradación proteosomal de ERK5 (Erazo et al., 2013). Por el contrario, la activación de ERK5 resulta en la disociación de Hsp90, pero no de Cdc37, tal y como ocurre para los receptores de andrógenos y progesterona (Picard, 2006). Estas observaciones sugieren que ERK5 es una proteína quinasa inestable en su forma inactiva y que requiere de Hsp90 para su estabilización. En nuestro modelo, la cola C-terminal reemplazaría a Hsp90 para estabilizar la conformación activa/fosforilada de ERK5.

Recientemente se ha descrito el papel de SUMO en la localización celular de ERK5 (Erazo et al., 2020). La SUMOilación es una modificación postraducional que consiste en la unión covalente de la proteína SUMO (*Small ubiquitin-like modifier*) a las cadenas laterales de residuos de lisina de las proteínas sustrato (Johnson, 2004). La activación por MEK5 induce la SUMOilación de ERK5 en el extremo N-terminal (Lys6 y Lys22). ERK5 no requiere de SUMOilación para ser activada por MEK5. Sin embargo, esta modificación postraducional permite la disociación de Hsp90 del dominio quinasa de la ERK5 activa y es necesaria para la translocación nuclear (Erazo et al., 2020). Estas observaciones han permitido establecer de manera más precisa el mecanismo que gobierna la translocación nuclear de ERK5, que se presenta a continuación.

1.2.3. MECANISMOS DE TRANSLOCACIÓN NUCLEAR DE ERK5

ERK5 presenta dos actividades que impactan de diferente manera en la fisiología de la célula. La fosforilación de sus putativos sustratos (por descubrir en la mayoría de los casos) permite la modulación de proteínas por modificación postraducional (fosforilación). Por otra parte, la presencia del dominio de co-activación transcripcional TAD permite a ERK5 modular la actividad de factores de transcripción independientemente de su actividad quinasa. En este sentido, la localización nuclear de formas inactivas de ERK5 puede tener un impacto importante en la transcripción génica, como se ha descrito en diversos paradigmas tumorales (ver más adelante en el capítulo de ERK5 y cáncer).

Mecanismos de translocación nuclear de ERK5 dependiente de fosforilación de la cola C-terminal.

Mecanismo canónico (mediado por MEK5). En condiciones basales, ERK5 adopta una conformación cerrada en la que la cola C-terminal autoinhibitoria interacciona con el dominio quinasa, de manera que el motivo NLS no está expuesto. En esta conformación, ERK5 es estabilizada por las chaperonas Hsp90-Cdc37, y Hsp90 actuaría de anclaje citosólico. En respuesta a mitógenos, factores de crecimiento o diferentes formas de estrés, la activación de MEK5 induce la fosforilación del motivo TEY de ERK5, que resulta en la activación del dominio quinasa de ERK5. Esta activación permitiría el reclutamiento de una PIAS SUMO E3 ligasa específica (todavía por descubrir) que SUMOila ERK5 en los residuos Lys6/22. Una vez activa, ERK5 fosforila su cola C-terminal, lo que resulta en cambio conformacional hacia una conformación abierta que libera el anclaje citosólico Hsp90 (facilitado por SUMO), expone el motivo NLS, y permite la translocación del complejo ERK5-Cdc37 al núcleo de la célula (**Figura 5**).

Mecanismo no canónico (no mediado por MEK5). En 2010, dos grupos independientes describieron la fosforilación de ERK5 en mitosis, en los residuos de la cola C-terminal Ser706, Thr732, Ser753 y Ser773 (Díaz-Rodríguez and Pandiella, 2010) o Ser576, Ser720, Ser731, Thr733 y Ser803 (Iñesta-Vaquera et al., 2010). Estas fosforilaciones son independientes de MEK5 e inducen la translocación nuclear de una forma de ERK5 inactiva que mantiene su actividad transcripcional (**Figura 5**). Aunque no se ha descrito, es muy probable que esta fosforilación resulte en la disociación del ancla citosólica Hsp90. El uso de inhibidores específicos permitió a ambos grupos establecer que esta fosforilación está mediada por la quinasa reguladora del ciclo celular CDK1. Este evento representa una segunda vía que controla la translocación nuclear de formas de ERK5 sin actividad quinasa, a través de la fosforilación del C-terminal, y pone de relevancia el impacto de la fosforilación de la cola C-terminal en la actividad transcripcional de ERK5, independientemente de su actividad quinasa.

En conjunto, la fosforilación de la cola C-terminal integra diferentes señales que convergen en el translocación nuclear de ERK5 y la activación de la transcripción. La autofosforilación del C-terminal de ERK5 representa un mecanismo dependiente de MEK5 que integra señales mitogénicas y de estrés. Por otra parte, la fosforilación del C-terminal por otras quinasas (como CDK1 durante la mitosis) representa un mecanismo que resulta en la activación transcripcional mediada por ERK5 independiente de su actividad quinasa.

Mecanismo de translocación nuclear de ERK5 independiente de fosforilación de la cola C-terminal.

Por último, se ha propuesto un mecanismo para el transporte nuclear de ERK5 mediado por la sobreexpresión de Cdc37. Así, la sobreexpresión de Cdc37 induce la disociación de Hsp90 del complejo ERK5-Cdc37, y la translocación nuclear de una forma de ERK5 quinasa inactiva que mantiene su actividad transcripcional (Erazo et al., 2013) (**Figura 5**). En este modelo, la sobreexpresión de Cdc37 resulta en la SUMOilación de ERK5 y en el cambio conformacional de ERK5 similar al que induciría la autofosforilación de la cola C-terminal. Este mecanismo no requiere de la actividad quinasa de ERK5, ya que la sobreexpresión de Cdc37 induce la translocación nuclear del mutante quinasa-inactivo de ERK5 (D200A), o de ERK5 endógena en presencia de inhibidores o en células MEK5^{-/-} (Erazo et al., 2013).

INTRODUCCIÓN

La relevancia de este mecanismo radica en el hecho de que Cdc37 es un oncogén, que actúa estabilizando otros oncogenes que se encuentran mutados o sobreexpresados en células cancerosas como *AKT*, *Her-2* o *BRAF-V600E* (Smith et al., 2009). Se ha descrito la sobreexpresión de Cdc37 en adenocarcinoma de próstata, (Stepanova et al., 2000; Gray et al., 2007), leucemia mielocítica aguda (Casas et al., 2003) y en mieloma múltiple (Katayama et al., 2004) donde promovería la proliferación de la célula tumoral. En este sentido, es interesante considerar que ERK5 bien podría mediar la proliferación de aquellos tumores que sobreexpresan Cdc37.

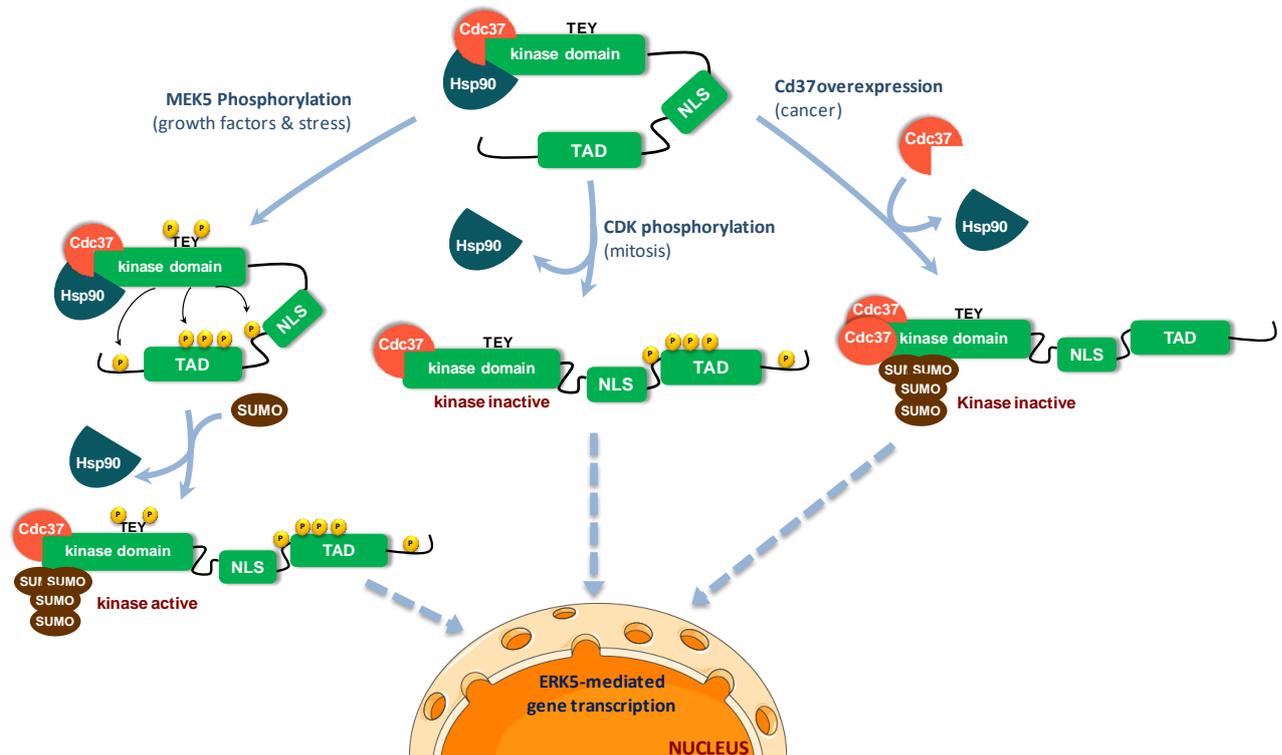


Figura 5. Modelos de translocación nuclear de ERK5. En condiciones basales, ERK5, Hsp90 y Cdc37 forman un complejo trimérico. ERK5 adopta una conformación cerrada, donde la chaperona Hsp90 actúa de anclaje citosólico. En el mecanismo canónico (dependiente de MEK5), la fosforilación de ERK5 por MEK5 promueve en primer lugar la conjugación de SUMO-2 en el extremo N-terminal de ERK5 (Lys 6 y 22). Una vez activa, la autofosforilación de ERK5 en su cola C-terminal induce un cambio conformacional que facilita la disociación de Hsp90 y la translocación al núcleo de ERK5 activa. En el mecanismo no canónico (independiente de MEK5), la cola C-terminal de ERK5 es fosforilada por otras quinasas (como CDK1 durante la mitosis), lo que resulta en la translocación nuclear de una ERK5 catalíticamente inactiva, pero que conserva su actividad transcripcional. Por último, en el tercer mecanismo, la sobreexpresión de la co-chaperona Cdc37 desplaza a Hsp90, e induce la SUMOilación de ERK5 como paso previo a la entrada de ERK5 al núcleo. En todo caso, la SUMOilación de ERK5 y la disociación de Hsp90 son eventos necesarios pero no suficientes *per se* para la translocación nuclear de ERK5.

1.2.4. ACTIVACIÓN DE ERK5 POR MEK5

La vía de señalización mediada por MEK5-ERK5 se activa en respuesta a una amplia variedad de estímulos extracelulares, incluido el estrés oxidativo y osmótico (Abe et al., 1996); citoquinas proinflamatorias, como IL-6 y el factor inhibidor de la leucemia (LIF) (Carvajal-Vergara et al., 2005); suero (Kato et al., 1997); así como una pléyade de factores de crecimiento como EGF (factor de crecimiento epidérmico, Kato et al.,

1998), G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos, Dong et al., 2001), FGF (factor de crecimiento de fibroblastos, Kesavan et al., 2004), PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas, Rovida et al., 2008), VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular, Roberts et al., 2010) y NGF (factor de crecimiento nervioso, Shao et al., 2002).

MEK5: quinasa activadora de ERK5

MEK5 es la única MAPKK capaz de activar directamente ERK5, mediante la fosforilación del motivo TEY (Thr²¹⁸-Gu-Tyr²²⁰) del lazo de activación del dominio quinasa de ERK5. Inicialmente, MEK5 fosforila a ERK5 en la Thr218, lo que provoca un cambio conformacional que permite la fosforilación de la Tyr220, necesaria para que se dé la completa activación de ERK5 (Mody et al., 2003). Una vez activa, ERK5 cataliza la autofosforilación de su cola C-terminal en múltiples residuos de serina y treonina (Ser241, Ser233, Ser496, Ser731 y Ser733, Ser760, Ser764 y Ser766) (Mody et al., 2003; Morimoto et al., 2007; Iñesta-Vaquera et al., 2010). Estas fosforilaciones facilitan la translocación de ERK5 al núcleo, donde podrá regular la transcripción génica mediante mecanismos dependientes e independientes de su actividad quinasa.

La delección homocigótica de MEK5, al igual que ocurre para ERK5, es letal para el desarrollo embrionario. Así, los ratones MEK5 *knockout* mueren a día 10,5 de gestación debido a defectos en la angiogénesis y en el desarrollo cardiaco (Wang et al., 2005). Las células cardiacas de estos fetos presentan una tasa de proliferación disminuida y un aumento de apoptosis, lo que afecta el desarrollo del corazón (Wang et al., 2005). La obtención de células MEF de estos ratones permitió establecer que MEK5 no sólo es la única MAPKK de ERK5, sino también que la señalización de MEK5 se da exclusivamente por ERK5.

MEK5 fue identificada por dos laboratorios independientes en 1995 (English et al., 1995; Zhou et al., 1995). El cDNA de MEK5 humana codifica una proteína de 444 aminoácidos, que comparte un 40% de homología con otras MAPKKs, y ~90% con las MEK5 de rata y de ratón (Kamakura et al., 1999). MEK5 humana presenta dos variantes derivadas de un procesamiento alternativo de un único ARNm, la isoforma α de 50 kDa y la isoforma β de 40 kDa. Ambas isoformas poseen residuos de fosforilación que son críticos para su activación: MEK5 α debe ser fosforilada en Ser311-Thr315, y MEK5 β en Ser222-Thr226. La isoforma MEK5 α es conocida como la forma completa de MEK5. MEK5 α posee 89 aminoácidos más que MEK5 β en el extremo N-terminal, y tiene una distribución tisular restringida principalmente al cerebro y tejidos mitóticamente activos como el hígado. MEK5 β no posee actividad quinasa y se expresa de manera ubicua en todos los tejidos, presentando una localización principalmente citosólica y una expresión mayor que la de MEK5 α , sobre todo en tejidos altamente diferenciados (English et al., 1995; Cameron et al., 2004).

Con el fin de caracterizar la vía de señalización de MEK5-ERK5, se ha recurrido a generar mutantes en los sitios de fosforilación de ambas isoformas de MEK5. La doble mutación en los residuos de fosforilación de MEK5 α a ácido aspártico (S311D/T315D, MEK5-DD) da lugar a una forma activa que funciona como un activador constitutivo de ERK5. Por el contrario, MEK5 β inhibe la activación de ERK5 inducida por EGF, por lo que se considera que MEK5 β actúa como dominante negativo en la activación de ERK5 (Cameron et al., 2004).

INTRODUCCIÓN

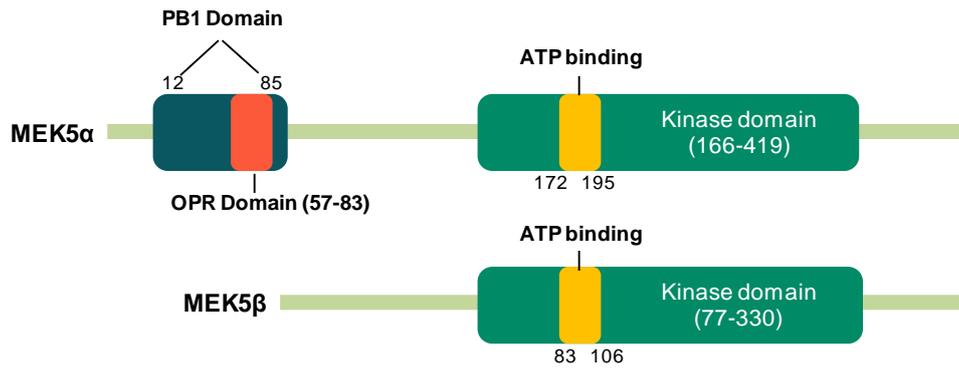


Figura 6. Representación esquemática de los dominios funcionales de MEK5α y MEK5β. Las dos isoformas de MEK5 difieren en que MEK5α tiene un dominio PB1 N-terminal, necesario para interaccionar con sus activadores MEKK2 y MEKK3, y una dominio OPR (*octicosapeptide repeat*) clave para la activación de ERK5.

MEKK2 y MEKK3 son las dos MAPKKs implicadas en la activación de MEK5 (English et al., 1995; Chao et al., 1999; Sun et al., 2001). MEK5 contiene un dominio PB1 (Phox-Bem1p) que está involucrado en la interacción con sus quinasas activadoras (Nakamura and Johnson, 2003). La pérdida de PB1 impide la interacción de MEK5 con MEKK2/3 y provoca la inhibición de esta vía de señalización (Nakamura and Johnson, 2003). El dominio PB1 se encuentra situado en los primeros 85 aminoácidos del dominio N-terminal de la isoforma MEK5α, y MEK5β carece de este dominio PB1 (**Figura 6**). En el dominio PB1 se ubica una región denominada OPR (*octicosapeptide repeat*) situada entre los aminoácidos 57 y 83, exclusiva de MEK5α. Esta región OPR es determinante para la activación de ERK5, dado que la habilita para interaccionar con el dominio quinasa de ERK5. La ausencia del dominio PB1, y por lo tanto del motivo OPR, que exhibe la isoforma MEK5β implica que esta isoforma se comporte como un dominante negativo, dado que compite con MEK5α por la unión a ERK5 (Cameron et al., 2004).

A pesar de que los dominios quinasa de MEKK2 y MEKK3 comparten una alta homología, MEKK2 presenta mayor afinidad en la asociación con MEK5. MEKK2 y ERK5 compiten por el mismo sitio de unión a MEK5, de manera que la teoría más aceptada es que MEK5 y MEKK2 interaccionan en reposo formando un complejo y tras la fosforilación de MEK5, MEKK2 es liberado dejando a MEK5 libre para que pueda asociarse con su sustrato ERK5 y activarlo (Seyfried et al., 2005).

Los mecanismos implicados en la activación de MEKK2/3 en respuesta a los distintos estímulos extracelulares no se han descrito. Por otra parte, la vía de señalización mediada por MEK5-ERK5 puede ser activada por otros mecanismos. Así, se ha descrito la activación de ERK5 en respuesta a la activación de Ras por receptores con actividad tirosina-quinasa (Kamakura et al., 1999). También se ha descrito a la tirosina quinasa oncogénica Src como un activador de la vía MEK5-ERK5, en respuesta al estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno (Abe et al. 1996; Suzaki et al., 2002). Más importantemente, se ha sugerido que la actividad catalítica de Src es necesaria para la activación de ERK5 en respuesta a la estimulación por EGF, dado que permite la asociación de MEKK2 con Lad (*Lack-associated adapter*), necesaria para fosforilar MEK5 (Sun et al., 2001).

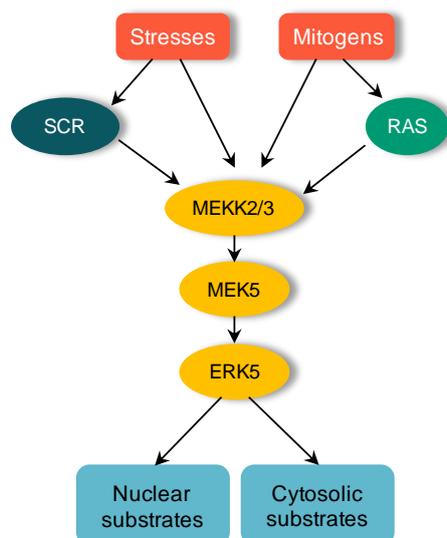


Figura 7. Representación esquemática de la vía de MEK5-ERK5. Figura modificada de Stecca y Rovida: *Impact of ERK5 on the Hallmarks of Cancer* (Stecca & Rovida, 2019)

1.2.5. SUSTRATOS DE ERK5

La comprensión de las distintas funciones de una proteína quinasa implica la identificación de sus sustratos. El número de sustratos descritos para ERK5 es muy limitado, en comparación con el resto de MAPKs, en parte debido a la pobre K_{cat} que presenta ERK5. En general, las MAPKs fosforilan residuos de Ser/Thr seguidos o precedidos de un residuo de prolina. Si bien una gran proporción de los sustratos de ERK5 son fosforilados en residuos de Ser/Thr que muestran una prolina en posición ± 1 , esta especificidad no parece determinante. Así, de los 6 sitios de autofosforilación identificados, dos presentan una prolina en posición +1, dos en posición -1 y dos de los residuos no presentan una prolina contigua (Mody et al., 2003). Esto sugiere que la especificidad de ERK5 respecto a su sustrato podría diferir a lo establecido para las otras MAPKs. A continuación, se presentan las proteínas sustrato de ERK5 identificadas hasta la fecha.

Sustratos nucleares de ERK5

La mayor parte de los efectores de ERK5 son factores de transcripción. De ellos, los mejor caracterizados son los tres miembros de la familia MEF2 (*myocyte enhancer factor-2*), MEF2A, C y D (Kato et al., 2000). Estos factores de transcripción regulan la diferenciación celular de miocitos y neuronas, y median en la respuesta al estrés en tejidos adultos. La cola C-terminal de ERK5 posee un motivo de unión a MEF2 (aa. 440-501) y un dominio de activación transcripcional necesario para la coactivación de MEF2 (Kasler et al., 2000). ERK5 fosforila MEF2A en los residuos Thr312, Thr319 y Ser356; a MEF2C en Ser387; y a MEF2D en Thr179. MEF2D es un sustrato específico de la vía de ERK5 (Kasler et al., 2000), mientras que los residuos fosforilados en MEF2A y MEF2C son promiscuos y también son fosforilados por las p38s (Pearson et al., 2001). En el caso de MEF2C, ERK5 es la única quinasa que fosforila la Ser387 en respuesta a suero o estimulación con EGF, y es fundamental para promover la transcripción de c-jun, factor de transcripción clave en la proliferación celular mediada por EGF y otros mitógenos (Kato et al., 1998).

INTRODUCCIÓN

Uno de los primeros sustratos de ERK5 identificados fue el factor de transcripción Sap1 (*Sodium channel associated protein 1*). ERK5 fosforila Sap1 en residuos no identificados, y esta fosforilación activa la transcripción mediada por SER (*Serum response element*), que es responsable del aumento de la expresión del promotor del factor de transcripción c-Fos (Kamakura et al., 1999; Terasawa et al., 2003). ERK5, además, promueve la estabilización de c-Fos mediante la fosforilación directa de la Ser387 (Terasawa et al., 2003). Dado el papel de c-Fos en la regulación de la proliferación celular en respuesta a factores de crecimiento y mitógenos, estas observaciones permitieron implicar a la vía de ERK5 en el control de la proliferación celular.

Otro de los sustratos nucleares de ERK5 es el factor de transcripción oncogénico c-myc (*cellular-Myelocytomatosis*). Inicialmente, English et al. describieron que la sobreexpresión de HRAS mutado (V12) resultaba en la activación de ERK5 y en la fosforilación de c-myc (English et al., 1998). Estudios recientes han propuesto que ERK5 fosforila la Ser62 de c-myc (Vaseva et al., 2018), y que esta fosforilación evita la ubiquitinación y la consecuente degradación proteasomal de c-myc (Sears, 2004). Esta estabilización de c-myc mediaría en el papel de ERK5 en el mantenimiento de la proliferación tumoral del cáncer colorrectal (Ibrahim et al., 2011) y leucemia (Kang et al., 2018), entre otros.

Por último, ERK5 fosforila a la proteína PML (*Promyelocytic leukemia protein*) en Ser403 y Thr409 (Yang et al., 2010). Esta fosforilación, además de bloquear la función supresora de tumores de PML, también suprime la expresión de la proteína p21, sustrato de PML que actúa como regulador del ciclo celular (Bernardi and Pandolfi, 2007). En consecuencia, la inhibición sistémica de ERK5 en ratones con tumores *xenografts* de células A549 resulta en un fenotipo anti-proliferativo que potencia la expresión de p21 a través de PML (Yang et al., 2010).

Sustratos no nucleares de ERK5

Hasta la fecha se han caracterizado escasos sustratos citosólicos de ERK5. Uno de ellos es la proteína de uniones gap conexina 43 (Cx43), fosforilada en la Ser255 por ERK5. La fosforilación por ERK5 facilita la acción de Cx43 en la conducción de la corriente intercelular en los miocitos ventriculares y el intercambio de nutrientes entre células (Jongen et al., 1991), lo que podría explicar el papel fisiológico que cumple ERK5 en la función cardíaca (Cameron et al., 2003).

ERK5 fosforila alguno de los miembros de la familia de proteínas quinasas AGC. Así, ERK5 fosforila a la proteína quinasa SGK (*Serum and glucocorticoid inducible kinase*) en la Ser78. Esta fosforilación es necesaria para la activación de SGK y promueve la proliferación celular en respuesta a factores de crecimiento (Hayashi et al., 2001). También se ha descrito que ERK5 fosforila y activa *in vitro* a p90RSK, una proteína quinasa sustrato canónico citosólico de ERK1/2 (Ranganathan et al., 2006). Sin embargo, estas observaciones no se han podido corroborar en sistemas celulares, por lo que se han puesto en cuestión.

ERK5 regula la apoptosis intrínseca en líneas celulares. Así, ERK5 fosforila la proteína pro-apoptótica Bad en Ser136 y Ser112, lo que promueve su secuestro citosólico por proteínas 14-3-3 y protege a las células endoteliales de la apoptosis inducida por estrés mecánico (Pi et al., 2004). Por otra parte, ERK5 fosforila *in vitro* a la proteína pro-apoptótica mitocondrial Bim (Gírio et al., 2007). Durante la mitosis, ERK5 se activa y

fosforila la subforma Bim_{EL} impidiendo la apoptosis, mientras que la inactivación de ERK5 causa la desfosforilación de Bim_{EL}, induciendo su interacción con Bax y la consiguiente activación de las caspasas celulares. A falta de resultados en líneas celulares, la fosforilación de Bim por ERK5 actuaría como un factor de supervivencia durante la mitosis (Gírio et al., 2007).

1.2.6. FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE ERK5

Ratones *knock-out* de la vía de ERK5-MEK5

Con el fin de dilucidar el rol fisiológico de cada uno de los componentes de la vía de ERK5-MEK5 se han obtenido los correspondientes ratones deficientes para estas proteínas. Tres grupos de investigación independientes obtuvieron ratones ERK5 *knock-out*, que presentaron fenotipos similares (Regan et al., 2002; Sohn et al., 2002; Yan et al., 2003). Los embriones de ratón deficientes en ERK5 mueren aproximadamente a día 10,5 de gestación, debido a defectos en el desarrollo cardíaco normal, en la maduración de la vasculatura y en la angiogénesis. Aunque ocurre la vasculogénesis, la vasculatura resultante es inmadura y las células endoteliales de los vasos y del corazón en desarrollo presentan una morfología desorganizada, lo que conduce a la pérdida de la integridad vascular (lo que provoca muerte por hemorragia). Este fenotipo es debido a una deficiencia de la señalización del factor de crecimiento del endotelio vascular VEGF (Sohn et al., 2002). Además, los defectos en vasculogénesis también se dan en tejido extraembrionario, saco vitelino y corazón (Hayashi and Lee, 2004).

En un intento por determinar el defecto primario en la ablación del gen de ERK5, se generaron ratones *knock-out* de ERK5 condicionales en tejidos específicos. Los embriones en los que ERK5 se elimina específicamente de la célula endotelial muestran defectos cardiovasculares y letalidad sobre el día 10 de gestación (E10.0), similar a los ratones *knock-out* de ERK5 (Hayashi and Lee, 2004). En cambio, el ratón *knock-out* de ERK5 condicional de cardiomiocitos no muestra defectos en su desarrollo, lo que confirma que el desarrollo anormal del corazón en los embriones *knock-out* de ERK5 global es consecuencia del fallo en la vasculogénesis y la angiogénesis (Hayashi and Lee, 2004). Estos datos sugieren que aunque el *knock-out* de ERK5 afecta al desarrollo cardiovascular, el defecto inicial ocurre en el endotelio e indican que ERK5 juega un papel crítico en la viabilidad de la célula endotelial (detallado más abajo) (Hayashi and Lee, 2004).

Como se ha comentado con anterioridad, los ratones MEK5 *knock-out* también son letales a nivel embrionario, mueren a día 10,5 de gestación presentando un fenotipo similar al de los ratones ERK5 *knock-out*: fallos a nivel endotelial por alteraciones durante la angiogénesis y en el desarrollo del cerebro. En estos ratones, la tasa de proliferación de las células cardíacas disminuye y aumenta la apoptosis lo que afecta el desarrollo del corazón (Wang et al., 2005).

Por último, los ratones deficientes en MEKK2 o MEKK3 exhiben diferencias fenotípicas muy marcadas. Los ratones MEKK3 *knock-out* mueren durante el desarrollo embrionario (E11.0) por alteraciones en la angiogénesis, como ocurre para los otros miembros de la vía (Yang et al., 2000). En cambio la pérdida de expresión de MEKK2 no afecta a la viabilidad ni a la fertilidad (Guo et al., 2002).

Papel de ERK5 en la hipertrofia cardíaca

La hipertrofia cardíaca es la respuesta adaptativa inicial en respuesta a un aumento de la carga cardíaca, a la estimulación neuro-hormonal o al estrés oxidativo. Puede ocurrir en estados no patológicos, pero el estrés cardíaco prolongado conduce a la dilatación de la cámara cardíaca, lo que da lugar a la apoptosis de miocitos y a la disfunción del miocardio, que concluye en insuficiencia cardíaca, arritmia y muerte (Hayashi and Lee, 2004). Las cuatro MAPKs han sido relacionadas con la señalización asociada a hipertrofia cardíaca (Hayashi and Lee, 2004). No está claro el mecanismo por el que ERK5 media las respuestas de activadores de hipertrofia, como el factor inhibitorio de la leucemia (LIF) y, el estrés osmótico y oxidativo. LIF se asocia con el receptor de la glicoproteína 130 (gp130), lo que conduce a la fosforilación de Gab1 (proteína de unión asociada a Grb2). Esta fosforilación permite la asociación de Gab1 a la proteína tirosina fosfatasa SHP2, lo que resulta en hipertrofia cardíaca mediada por gp130 (Nakaoka et al., 2003). La interacción Gab1-SHP2 juega un papel crítico en la activación de ERK5, sugiriendo que la hipertrofia cardíaca inducida por LIF ocurre a través de la activación de ERK5 (Nakaoka et al., 2003). El uso de ratones *knock-out* de ERK5 específicos de cardiomiocitos demuestra la importancia de ERK5 durante la sobrecarga de presión (hipertensión arterial). Los ratones *knock-out* para ERK5 muestran menos remodelación hipertrófica cardíaca, es decir, son más vulnerables a un estrés hipertrófico, lo que resulta en una disfunción cardíaca en respuesta a una carga de trabajo prolongada (Kimura et al., 2010).

Supervivencia de células endoteliales

ERK5 es necesaria para mediar la respuesta de supervivencia de las células endoteliales a la tensión tangencial (Pi et al., 2004). La sobreexpresión de MEK5 limita la actividad de caspasa-3 e inhibe la apoptosis inducida por privación de suero o estímulos inflamatorios. En cambio, la inhibición de ERK5 causa la muerte de las células endoteliales (Pi et al., 2004). Estudios con células endoteliales microvasculares dérmicas humanas (HDMEC) demuestran que ERK5 es necesaria para la fosforilación de Akt mediada por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), lo que da lugar a una mayor expresión de la proteína pro-supervivencia Bcl-2 y a un aumento de la fosforilación de la proteína pro-apoptótica BAD. Esto se traduce en una inhibición de la apoptosis y un aumento de la supervivencia celular (Roberts et al., 2010). Otros trabajos muestran que ERK5 promueve la supervivencia de los fibroblastos en respuesta a estrés al inducir una bajada de expresión del ligando Fas (FasL) en un proceso dependiente de Akt. ERK5 induce la fosforilación (no directa) de Akt en la Ser473 y la Thr308, lo que conlleva la inactivación de FoxO3a (Forkhead Box O3a) provocando una bajada en la expresión FasL c.

Desarrollo neuronal

ERK5 se expresa de forma ubicua en muchos tejidos, pero su mayor expresión tiene lugar en el cerebro embrionario (Yan et al., 2003). Durante el desarrollo embrionario del cerebro de rata, la expresión de ERK5 es elevada, decreciendo hasta niveles indetectables tras el día postnatal 49 (Cavanaugh, 2004; Liu et al., 2003). El ratón *knock-out* de ERK5 específico de cerebro presenta un desarrollo normal, aunque el *knock-out* global muestra retraso en el crecimiento de la cabeza del feto (Wang and Tournier, 2006).

Numerosos estudios han demostrado que ERK5 es un importante regulador de la supervivencia de las células neuronales en respuesta a diversos estímulos pro-supervivencia neurotrófica (Liu et al., 2003; Wang et al., 2006). La estimulación con BDNF y NGF de los receptores de TrkA, presentes en la superficie de las neuronas sensoriales, da lugar a la activación de ERK5 y a la fosforilación del factor de transcripción CREB (*cAMP response element-binding*), lo que facilita la supervivencia de las células neuronales (Watson et al., 2001). Trabajos más recientes en neuronas simpáticas de ratón, han revelado que ERK5 es un importante regulador de la transcripción inducida por el NGF de las proteínas pro-apoptóticas BAD, BimL (*Bcl-2-interacting mediator of cell death long*) y Bim EL (*Bim extra-long*). Específicamente, ERK5 reprime la transcripción de BAD a través de la fosforilación de p90RSK y la consiguiente activación de CREB. CREB se une a la región promotora de BAD para evitar su transcripción. ERK5 también media en la reducción de la expresión génica de Bim a través de FoxO3a. ERK5 activa a Akt, lo que permite el secuestro citosólico de FoxO3a evitando la transcripción de Bim mediada por FoxO3a (Finegan et al., 2009).

Diferenciación celular

La vía de MEK5-ERK5 juega un papel esencial en la diferenciación osteogénica y en la mineralización de los precursores esqueléticos. En células endoteliales humanas primarias y en osteoblastos, ERK5 es activada por los bifosfatos que contienen nitrógeno (N-BP) de forma dosis-dependiente. Los N-BP influyen en la diferenciación osteogénica, mediante la inhibición de la vía de generación de mevalonato y la activación de la vía de MEK5-ERK5. Así, la activación de ERK5 regula la expresión de genes relevantes necesarios para la calcificación y diferenciación osteogénica de las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea (Adam et al., 2018). La vía de MEK5-ERK5 también media en la diferenciación y proliferación osteoblástica inducida por liraglutida, una hormona peptídica implicada en proliferación y diferenciación de osteoblastos que se utiliza para el tratamiento de la diabetes tipo II. El tratamiento con liraglutida induce la expresión de los principales componentes de la vía MEK5-ERK5, dando lugar a un aumento de la diferenciación y la proliferación de osteoblastos murinos. Por el contrario, la inhibición de ERK5 con el inhibidor XMD8-92 reduce los niveles de ERK5 fosforilada/activa y, como consecuencia, reduce la proliferación y diferenciación de los osteoblastos (Sun et al., 2020).

La vía de MEK5-ERK5 controla la diferenciación monocítica, que está alterada en cánceres como la leucemia mieloide aguda y crónica (LMA y LMC). En líneas celulares HL60 y U937 de leucemia mieloide y en cultivos primarios de muestras de pacientes con LMC, la diferenciación monocítica inducida por 1,25-dihidroxivitamina D3 induce un aumento de expresión de ERK5 y del factor de transcripción MEF2C, diana directa de ERK5. Por el contrario, la inhibición o silenciamiento de la vía de MEK5-ERK5 con BIX02189 o XMD8-92 altera el fenotipo de estas células, reduce el marcador monocítico de superficie CD14 y aumenta la expresión del marcador mieloide general CD11b (Wang et al., 2014).

La vía de señalización MEK5-ERK5 también regula la diferenciación de macrófagos M2 inducida por IL-4. La inhibición de MEK5 reduce la expresión de marcadores clásicos de M2 como Arg-1, Ym-1 y Fizz-1, así como la producción de quimioquinas y citoquinas relacionadas con M2 como CCL22, CCL17 e IGF-1, en macrófagos estimulados por IL-4. Mecanísticamente, ERK5 regula la diferenciación de M2 de manera dependiente de c-myc, pero independiente de STAT3 y STAT6 (Luiz et al., 2020).

INTRODUCCIÓN

La vía de señalización MEK5-ERK5 es crítica para la etapa inicial de diferenciación de células musculares. ERK5 se activa en respuesta a la diferenciación de mioblastos de ratón y, por otra parte, la activación o sobreexpresión de ERK5 activa el promotor de genes específicos implicados en la diferenciación de mioblastos. Por el contrario, el silenciamiento de ERK5 anula la diferenciación miogénica (Dinev et al., 2001). La vía MEK5-ERK5 media en la diferenciación de mioblastos inducida por IGF-2. IGF-2 es un factor de crecimiento fetal predominante que desencadena importantes señales miogénicas. La estimulación con IGF-2 induce la actividad quinasa de ERK5 en los mioblastos en diferenciación (Carter et al., 2009). Por el contrario, el silenciamiento de IGF-2 reduce la fosforilación y la actividad quinasa de ERK5, lo que se traduce en una disminución de los marcadores miogénicos. Este hecho es rescatado al sobreexpresar MEK5 constitutivamente activa (Carter et al., 2009). Más tarde, se propuso que la proteína YAP (*Yes-associated protein*) promueve la diferenciación muscular mediante la activación de la vía Abl/Src/MEK3/MEK5/ERK5. La proteína YAP es un coactivador transcripcional en la vía de Hippo que regula la diferenciación (Chen et al., 2017). Los mioblastos que sobreexpresan YAP muestran una activación de la vía MEK5-ERK5, en comparación con mioblastos normales, lo que resulta en un aumento de la diferenciación miogénica. En estas células también se observa un aumento de la activación de las vías Src y c-Abl (homólogo del oncogén viral de leucemia murina de Abelson 1). Por el contrario, la inhibición de c-Abl, Scr o MEK5 disminuye la activación de MEK5 y ERK5, lo que resulta en una reducción de la miogénesis de estas células (Chen et al., 2017).

En referencia a células neuronales, la vía de MEK5-ERK5 regula múltiples aspectos de la neurogénesis, incluida su diferenciación. ERK5 promueve la diferenciación neuronal de los precursores neurales de la zona subventricular (Li et al., 2013). Mecánicamente, la vía MEK5-ERK5 es necesaria para la actividad de SoxD, un regulador de la diferenciación neural, y para la expresión de Xngnr1, un gen proneural. Por el contrario, los inhibidores de MEK5 o ERK5 bloquean la diferenciación neuronal (Nishimoto et al., 2005) *in vivo* sin afectar a los astrocitos (Li et al., 2013). Asimismo, los progenitores corticales en proliferación expresan ERK5 activa. En este sentido la activación de ERK5 resulta en un aumento en el número de neuronas corticales de rata generadas en cultivos a partir de células progenitoras, mientras que el silenciamiento de ERK5 o la expresión de una forma de ERK5 dominante negativa reducen la producción de neuronas (Liu et al., 2006). Estos datos sugieren que ERK5 es necesaria y suficiente para estimular la generación de neuronas a partir de progenitores corticales.

2. ERK5 Y CÁNCER

El papel de ERK5 en la progresión del cáncer se asocia con su capacidad de promover la proliferación y la supervivencia de las células. Esta capacidad resulta en una mayor tumorigénesis y, en algunos, casos, en una mayor capacidad de migración e invasión de las células que facilita la metástasis.

Durante los últimos 20 años, se ha caracterizado la expresión y actividad de la vía MEK5-ERK5 en distintos paradigmas tumorales. En numerosos casos, se ha establecido una correlación tanto de una elevada expresión como una elevada actividad de esta vía con la adquisición de fenotipos tumorales más agresivos, que resultan en un peor pronóstico. A continuación, se detallan estos estudios.

2.1. ROL DE ERK5 EN PROLIFERACIÓN TUMORAL Y TUMORIGÉNESIS

La vía MEK5-ERK5 desempeña un papel clave en la proliferación de las células cancerosas y, en menor medida, en la tumorigénesis. La vía de señalización de ERK5 se activa en respuesta a diferentes factores de crecimiento, como NGF (factor de crecimiento nervioso, Shao et al., 2002), G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos, Dong et al., 2001), FGF (factor de crecimiento de fibroblastos, Kesavan et al., 2004), PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas, Rovida et al., 2008) o EGF (factor de crecimiento epidérmico, Kato et al., 1998). La activación de ERK5 es necesaria para la proliferación inducida por dichos estímulos, dado que la sobreexpresión de mutantes negativos o la incubación con inhibidores de ERK5 resulta en una reducción de la tasa proliferativa inducida por EGF (Kato et al., 1998), PDGF (Rovida et al., 2008), FGF (Kesavan et al., 2004), NGF (Shao et al., 2002) o G-CSF (Dong et al., 2001).

Las primeras evidencias sobre el papel de la vía de MEK5-ERK5 en la proliferación celular se obtuvieron en estudios con células HeLa estimuladas con EGF. La activación de ERK5 en respuesta a EGF resulta en su translocación al núcleo, donde interacciona con factor de transcripción MEF2C, y promueve su actividad transcripcional mediante la fosforilación directa del residuo Ser387 (Kato et al., 1997). La activación de MEF2C por ERK5 promueve la transcripción de c-Jun, un factor de transcripción implicado en la proliferación celular mediada por EGF, entre otros mitógenos (Kato et al., 1998). Posteriormente, se observó que la vía MEK5-ERK5 también promueve la fosforilación y estabilización de c-Fos y Fra-1, factores de transcripción que regulan la proliferación celular (Terasawa et al., 2003). Dado que los homodímeros y heterodímeros de c-Jun, c-Fos y Fra-1 son miembros estructurales del factor de transcripción AP-1 (Angel & Karin, 1991), la monitorización de la actividad transcripcional de AP-1 es una aproximación válida para establecer el rol de ERK5 en la proliferación inducida por mitógenos (Kato et al., 1997).

Por otra parte, ERK5 regula la progresión del ciclo celular. ERK5 es necesaria para la transición G1/S, al promover la fosforilación y activación de SGK1 (*Serum and Glucocorticoid induced Kinase-1*) en respuesta a factores de crecimiento, necesaria para la entrada en fase S del ciclo celular (Hayashi et al., 2001). ERK5 promueve la entrada en fase S al suprimir la expresión de la proteína p21 (inhibidor de CDK2). En este sentido, ERK5 promueve la activación transcripcional de c-myc en células de carcinoma de mama, que a su vez induce la transcripción de los microRNA miR-17-5p y miR-20α que regulan negativamente el mRNA de p21 (Perez-Madrugal et al., 2012). ERK5 también regula la expresión del gen ciclina D1, proteína clave

INTRODUCCIÓN

en la transición G1/S. La activación de la vía MEK5-ERK5 induce la transcripción de la ciclina D1, lo que resulta en la progresión del ciclo celular en G1. Por el contrario, la inhibición de la actividad ERK5 disminuye los niveles proteicos de ciclina D1 inducidos por suero (Mulloy et al., 2003).

Otros autores sugieren que el pico máximo de activación de ERK5 se da en la transición de G2 a mitosis. La entrada en mitosis mediada por ERK5 depende de la activación del factor de transcripción NF- κ B. ERK5 induce la activación de la quinasa p90RSK2, que a su vez fosforila y manda a degradación a I κ B (inhibidor de kappa B), lo que permite la liberación de p65/p50 y su translocación al núcleo donde p65 induce la expresión de genes como las ciclinas B1 y B2, y de cdc25B (Cude et al., 2007). Del mismo modo, en cáncer colorrectal MEK5 promueve la progresión del ciclo celular a través de la activación de NF- κ B mediada por la degradación de I κ B (Simões et al., 2015). De interés, se ha observado que ERK5 se fosforila durante la mitosis, lo que favorece que interaccione e inactive a la proteína pro-apoptótica Bim. Este hecho sugiere que ERK5 activa contribuye a la supervivencia de células mitóticas (Gírio et al., 2007). Esta fosforilación de ERK5 en mitosis, que es llevada a cabo por CDK1 y es independiente de MEK5, es crucial para la progresión del ciclo celular. Así, como se ha indicado con anterioridad, CDK1 fosforila ERK5 en múltiples sitios localizados en su región C-terminal y promueve su translocación al núcleo (Díaz-Rodríguez & Pandiella, 2010; Iñesta-Vaquera et al., 2010). A continuación, se exponen las principales evidencias experimentales obtenidas sobre el papel que juega ERK5 en la proliferación y viabilidad de diferentes paradigmas tumorales.

ERK5 en carcinoma de próstata.

El cáncer de próstata (CaP) es un interesante paradigma de la relevancia de ERK5 en el control de la proliferación tumoral. En pacientes con cáncer de próstata la sobreexpresión de MEK5 (Mehta et al., 2003) y de ERK5 (McCracken et al., 2008; Ramsay et al., 2011) correlaciona con agresividad y con mal pronóstico. Además, los pacientes con enfermedad hormono-independiente presentan elevados niveles de ERK5 nuclear, que además correlacionan con mayor número de lesiones metastásicas (McCracken et al., 2008). En células de adenocarcinoma de próstata PC3 y LnCap, la activación de ERK5 resulta en un aumento en la proliferación, migración e invasión celular (McCracken et al., 2008), mientras que la inhibición o silenciamiento de ERK5 suprimen la proliferación de estas células (McCracken et al., 2008; Ramsay et al., 2011). Por otra parte, ERK5 media en la proliferación inducida por EGF en células PC3, al promover la entrada en la fase S del ciclo celular mediante el aumento de expresión de las ciclinas A y E (Xiong et al., 2016).

Se ha sugerido que los elevados niveles de ERK5 observados en el CaP podrían deberse a la reducción de los niveles del microRNA miR-143. Así, el análisis inmunohistoquímico de TMAs que contenían muestras de 50 (Clapé et al., 2009) o 168 (Ahmad et al., 2013) pacientes con PCa, puso de manifiesto una correlación inversa entre los niveles de miR-143 y los de ERK5, y una menor expresión de miR-143 en estadios avanzados de la enfermedad que presentan altos niveles de ERK5. Por otra parte, la transfección de miR-143 en células LnCaP resulta en pérdida de expresión de ERK5, inhibición de la proliferación celular, activación de la apoptosis e inhibición del crecimiento *in vivo* de tumores *xenografts* (Clapé et al., 2009).

Como se ha hecho referencia con anterioridad, los pacientes de CaP que muestran sobreexpresión de MEK5 o ERK5 presentan un mayor número de lesiones metastásicas. En este sentido, la sobreexpresión de MEK5 o ERK5 en células PC3 promueve su migración e invasión, y su capacidad de formar tumores *in vivo* (Mehta et al., 2003; McCracken et al., 2008, respectivamente). Del mismo modo, la sobreexpresión de ERK5 promueve la formación de metástasis *in vivo* en modelos tumorales ortotópicos de células PC-3. Por el contrario, el silenciamiento de ERK5 inhibe significativamente la motilidad y capacidad invasiva de células PC3 (Ramsay et al., 2011). Los mecanismos implicados en la esta capacidad metastásica de la vía MEK5-ERK5 en PCa no están completamente descritos. Por una parte, ERK5 promueve la expresión de las metaloproteinasas de matriz extracelular MMP2 y MMP9 en líneas celulares de PCa (Mehta et al., 2003; Ramsay et al., 2011) proteínas que facilitan la invasión de las células tumorales (Dong et al., 2011). Por otra parte, otros autores sugieren que ERK5 promovería la metástasis a través de un mecanismo que incluye la activación de la quinasa de adhesión focal FAK, una tirosina quinasa sobreexpresada en diferentes tipos de tumores y necesaria para la motilidad celular (Parsons et al., 2008). ERK5 forma un complejo con la integrina $\alpha\beta3$ y FAK en células de PCa, y es necesaria para la motilidad de estas células (Sawhney et al., 2009)

ERK5 en cáncer de mama.

La vía de señalización MEK5-ERK5 tiene especial relevancia en el desarrollo y progresión del carcinoma de mama. Se ha encontrado una elevada expresión de MEK5 y ERK5 en tumores de mama HER2+ que correlacionan con una menor supervivencia (Montero et al., 2009). En estos tumores, ERK5 es un efector de la cascada de señalización inducida por ErbB2: la activación de estos receptores por neuregulinas provoca la activación de ERK5, y líneas de carcinomas mamarios que sobreexpresan HER2 presentan una ERK5 constitutivamente activa. Por el contrario, la sobreexpresión de un mutante dominante negativo de ERK5 resulta en una inhibición de la proliferación inducida por neuregulinas (Esparis-Ogando et al., 2002). La terapia clásica usada en este tipo de tumores consiste en administrar el anticuerpo monoclonal anti-HER2 trastuzumab. De interés, la sobreexpresión del dominante negativo de ERK5 en la línea tumoral de mama BT474 potencia el efecto antiproliferativo del trastuzumab (Montero et al., 2009).

También se ha reportado una elevada expresión de la vía MEK5-ERK5 en pacientes con cáncer de mama triple negativo (TNBC) (Ortiz-Ruiz et al., 2014), que correlaciona con peor pronóstico. En estos tumores, tanto el 70% de biopsias de pacientes TNBC como la totalidad de tumores *xenografts* de células MDA-MB23 TNBC muestran una ERK5 sobreexpresada y activa. El silenciamiento de ERK5 inhibe la proliferación de distintas líneas tumorales de TNBC, y la inhibición farmacológica de ERK5 con TG02 (inhibidor de ERK5 y CDK1/2/7/9) reduce la proliferación celular (al bloquear la transición de G1 a G2), el crecimiento de tumores *xenografts* de células de TNBC MDA-MB231, y activa la muerte celular apoptótica (Ortiz-Ruiz et al., 2014). Por último, la inhibición de ERK5 potencia la acción antitumoral de la quimioterapia (taxotere y cisplatino) en el TNBC (Ortiz-Ruiz et al., 2014), y del inhibidor de Akt Ipatasertib (Wright et al., 2020).

En referencia a tumores de mama luminales, un estudio discreto reveló la presencia de ERK5 fosforilada/activa en el 76% de biopsias de pacientes analizadas, y un peor pronóstico asociado a ERK5 activa debido a una mayor resistencia al tratamiento hormonal (Antoon et al., 2013). Así, la

INTRODUCCIÓN

sobreexpresión MEK5 en células MCF-7 disminuye los niveles de mRNA del receptor de estrógenos ER- α , y el silenciamiento de ERK5 restablece los niveles de expresión de ER- α , tanto en la línea celular como en los correspondientes tumores *xenografts* (Antoon et al., 2013). Estos resultados apoyarían el uso de inhibidores de ERK5 para potenciar la terapia endocrina en este tipo tumoral. De interés, en células hormono-dependientes de cáncer de mama MCF-7 y BT474, ERK5 nuclear confiere resistencia a la muerte apoptótica inducida por el agonista de receptores de muerte TRAIL. Así, la sobreexpresión de un mutante de ERK5 constitutivamente nuclear confiere resistencia a TRAIL en líneas tumorales que presentan ERK5 citosólica, posiblemente a través de la activación de MEF2C (Borges et al., 2007). Estos resultados indican una función antiapoptótica de ERK5 nuclear (Borges et al., 2007).

La primera aproximación sobre el papel de la vía ERK5-MEK5 en la capacidad metastásica de tumores de mama procede de la observación de que el oncogén STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) regula la expresión de MEK5. STAT3 es un factor de transcripción que promueve tumorigénesis, mediante la regulación de la expresión de diferentes genes del ciclo celular, anti-apoptóticos y factores angiogénicos (Wake & Watson, 2015). La sobreexpresión de STAT3 en células epiteliales de mama MCF10A induce un aumento de 22 veces en los niveles de mRNA de MEK5, mientras que el silenciamiento de STAT3 en estas células reduce los niveles de expresión de MEK5 (Song et al., 2004). Estos autores también muestran una correlación de niveles elevados de STAT3 y MEK5 en líneas tumorales y biopsias de carcinomas mamarios, y de bajos niveles de ambas proteínas en líneas o muestras no tumorales (Song et al., 2004). Estos resultados están en consonancia con los de otro estudio realizado con tumores de mama invasivo. El 35% de estos tumores presentan fosforilación de STAT3, que correlaciona con elevada expresión de MEK5, mayor número de metástasis en nódulos linfáticos regionales y elevados niveles del receptor de progesterona (Hsieh et al., 2005). En este sentido, la activación de MEK5 regulada por STAT3 resulta en una mayor transición epitelio-mesénquima (EMT) en células de cáncer de mama, lo que induce un aumento de la capacidad invasiva y metastásica de este tipo tumoral (Liu et al., 2017).

Se han descrito numerosas evidencias que apuntan al papel de la vía MEK-ERK5 en la transición epitelio-mesénquima (EMT) de células de cáncer de mama. La activación constitutiva de MEK5 provoca resistencia frente a TNF- α (*Tumor Necrosis Factor*) dando lugar a un fenotipo de transición epitelio-mesénquima con una reducción de marcadores epiteliales y aumento de los marcadores mesenquimales. Estos marcadores fueron reestablecidos al silenciar ERK5 (Zhou et al., 2008). Asimismo, recientemente se ha observado que la vía MEK5-ERK5 juega un papel crítico en la EMT inducida por TGF- β . El silenciamiento de MEK5 o ERK5 impide los cambios morfológicos y moleculares que se producen durante la EMT inducida por TGF- β en modelos de cáncer de mama, y conduce a células altamente metastásicas hacia un fenotipo epitelial diferenciado (Pavan et al., 2018). En estos modelos, además, la inhibición farmacológica de MEK5/ERK5 reduce la migración e invasión celular y el número de metástasis pulmonares (Pavan et al., 2018). Por otra parte, el miR-143 es uno de los microRNAs implicados en la regulación de ERK5 (Akao et al., 2006). La expresión de miR-143 está reducida en células de cáncer de mama con respecto a las normales, y contribuye a justificar los altos niveles de ERK5 observados en estas células tumorales (Xia et al., 2018). De interés, el miR-143 suprime la EMT tanto en modelos celulares como *in vivo* en modelos de tumores *xenografts*, a través de un mecanismo que requiere ERK5 y de la vía GSK3-Snail (Zhai et al., 2016). Por

último, también se ha descrito el papel de ERK5 en la EMT de células de cáncer de mama triple negativo (TNBC). Así en las líneas MDA-MB-231 y Hs-578T (TNBC), la delección homocigótica de ERK5 (CRISPR-Cas9 *knock-out*) resulta en la pérdida de características mesenquimales y suprime la migración celular. *In vivo*, la delección de ERK5 reduce el crecimiento de tumores *xenografts* de células TNBC, como consecuencia de una reducida expresión de genes asociados a la matriz y a las integrinas en las células ERK5-KO. Estos hallazgos apuntan a un papel de ERK5 en la integridad de matriz extracelular (ECM) en cáncer de mama (Hoang et al., 2020).

ERK5 en cáncer colorrectal (CCR).

El papel de ERK5 en la regulación de la proliferación y tumorigénesis intestinal se ha revelado recientemente. MEK5 y ERK5 se encuentran sobreexpresadas en la mayoría de los adenomas y adenocarcinomas colorrectales humanos, y se han propuesto como marcadores de mal pronóstico de pacientes con CCR (Simões et al., 2015; Pereira et al., 2016). En línea con estas observaciones, la activación de la vía MEK5-ERK5 promueve la proliferación de células de CCR como HCT116 y SSW620 (Pereira et al., 2016). Entre otros, se ha propuesto que el eje ERK5/AP-1 media en el aumento de la proliferación y tumorigénesis inducidas por la sobreexpresión de CDK5 en modelos de CCR y en biopsias de pacientes con mal pronóstico (Zhuang et al., 2016), así como en la acción del supresor tumoral SATB2 (*Special AT-rich sequence binding protein 2*) (Mansour et al., 2015). Por otra parte, MEK5 promueve la transición del ciclo celular de G1-S y de S-G2/M en tumores de CCR mediante la activación de NF- κ B, un factor de transcripción implicado en la proliferación y supervivencia del CCR (Sakamoto et al., 2009).

Los pacientes de CCR muestran niveles reducidos de miRNA-143 y miRNA-145, cuya principal diana es ERK5, y se asocian a una expresión aumentada de ERK5 (Akao et al., 2006). Consecuentemente, la sobreexpresión de miR-143 en tumores *xenografts* de HCT116 resulta en bajos niveles de ERK5, una disminución de la proliferación y un aumento de la apoptosis. Estos tumores presentan una menor expresión de NF- κ B nuclear (Borralho et al., 2011). Por su parte, la sobreexpresión del miR-145 reduce la proliferación tumoral y aumenta la apoptosis en modelos de tumores *xenografts* de CCR, como consecuencia de la represión concomitante de c-Myc y ERK5 (Ibrahim et al., 2011).

Finalmente, elevados niveles de ERK5 se asocian con un potencial más invasivo y metastásico del CCR. Así, las células de CCR que presentan elevados niveles de ERK5 activa muestran una mayor expresión del marcador mesenquimal vimentina. Los modelos *xenografts* ortotópicos de CCR con ERK5 constitutivamente activa generan metástasis en ganglios linfáticos, a diferencia de las células que presentan una ERK5 basal (Simões et al., 2015).

ERK5 en cáncer de pulmón.

Una elevada expresión y activación de ERK5 correlaciona con malignidad, mayor capacidad metastásica y baja supervivencia de pacientes con adenocarcinoma pulmonar, (Jiang et al., 2019; Jiang et al., 2020). El 4% de los adenocarcinomas de pulmón NSCLC presentan una amplificación del gen MAPK7, que correlaciona con un aumento de expresión proteica de ERK5 y mal pronóstico (Gavine et al., 2015). Además, ERK5 se activa durante el desarrollo del adenocarcinoma pulmonar de NSCLC, y la expresión

INTRODUCCIÓN

ectópica de ERK5 promueve la proliferación celular y la progresión del ciclo celular en G2/M (Jiang et al., 2019). Por el contrario, el silenciamiento de MEK5 o ERK5 reduce la proliferación de células NCI-H23, KYS30 y SNU449 de adenocarcinoma pulmonar (NSCLC) (Sánchez-Fdez et al., 2019; Gavine et al., 2015), y la inhibición de MEK5 (BIX02189) o ERK5 (XMD8-92) reduce la proliferación (Yang et al., 2010) y bloquea la motilidad celular, la expresión de MMP-2 y la EMT inducida por TGF- β 1 en células A549 (NSCLC) (Park et al., 2016). Estos resultados han sido confirmados *in vivo*, al comprobar que el silenciamiento de MEK5 o ERK5 bloquea el crecimiento de tumores *xenografts* de células NJH29 de adenocarcinoma pulmonar (SCLC) (Cristea et al., 2020), y que la inhibición de MEK5 o ERK5 reduce el crecimiento de tumores *xenografts* de células A549 (Yang et al., 2010) e impide la aparición de metástasis pulmonares en experimentos de inyección en vena de células A549 (Park et al., 2016).

Mecánicamente, ERK5 interactúa con la proteína nuclear de leucemia promielocítica PML y la fosforila, inhibiendo su función supresora de tumores (Yang et al., 2010). PML modula al supresor tumoral p53 mediante interacción con p53 y MDM2. ERK5 activa interacciona con los cuerpos nucleares PML, interrumpe la interacción PML-MDM2, y bloquea la función del supresor tumoral p53. Por el contrario, el tratamiento con doxorubicina induce la activación de p53 mediada por los PML al promover el secuestro en el núcleo de MDM2 dependiente de los PML. Así, la inhibición de ERK5 potencia el efecto de doxorubicina al aumentar el secuestro en el núcleo de MDM2 y como consecuencia, promueve la activación de p53 mediada por PML lo que conduce a apoptosis *in vitro* y reducción del crecimiento tumoral *in vivo* (Yang et al., 2013).

Recientemente, se ha descrito ERK5 como un regulador de la radiosensibilidad de células de cáncer de pulmón. La activación de ERK5 por la radiación (IR) promueve la activación de Chk1 (*Checkpoint kinase 1*), una serina-treonina quinasa implicada en la reparación del ADN en respuesta a roturas de doble cadena del ADN. Por el contrario, el silenciamiento o la inhibición de ERK5 reduce la proliferación de estas células al inducir el arresto en fase G2/M del ciclo celular y favorecer la apoptosis inducida por IR. *In vivo*, la delección de ERK5 potencia el efecto de la radioterapia y bloquea el crecimiento de tumores *xenografts* de células A549 y LLC, concomitante con un aumento de apoptosis y una reducción de la neovascularización tumoral (Jiang et al., 2019).

ERK5 en carcinoma Hepatocelular (HCC).

El papel de ERK5 en carcinoma hepatocelular (HCC) está bien establecido. Se ha identificado amplificación del gen *MAPK7*, que codifica para ERK5, en el 53% de los tumores primarios de HCC analizados (Zen et al., 2009). Además, en muestras de pacientes con HCC se ha encontrado elevados niveles de ERK5 nuclear tanto en el tejido tumoral como en el tejido cirrótico adyacente, en comparación con el tejido hepático normal. Estos datos sugieren que ERK5 podría mediar en la iniciación del carcinoma hepatocelular, particularmente cuando se desarrolla a partir de una cirrosis (Rovida et al., 2015). En este sentido, un análisis genómico y proteómico masivo comparativo de líneas celulares HCC identificó a ERK5 como uno de los factores diferencialmente expresados en células tumorogénicas, en comparación con las líneas de HCC no tumorogénicas, además de una correlación con la expresión de receptor de EGF y de proteínas de la vía PI3K-Akt-mTORC1 (Zamani et al., 2017).

La línea celular de HCC con mayor amplificación y sobreexpresión de ERK5 (SNU449) presenta ERK5 activa/ fosforilada durante las fases G2/M del ciclo celular, necesaria para la entrada en mitosis y para la proliferación. Por el contrario, el silenciamiento de ERK5 reduce el crecimiento de estas células (Zen et al., 2009). Resultados análogos han sido reportados para las líneas de HCC HepG2 and Huh-7, utilizando el inhibidor de ERK5 XMD8-92. Además, el tratamiento sistémico con XMD8-92 o el silenciamiento de ERK5 reduce el crecimiento de tumores *xenografts* de HepG2 y Huh-7, al reducir los niveles de c-REL, un factor de transcripción de la familia NF- κ B relevante para la proliferación celular del HCC (Rovida et al., 2015). En estos modelos, además, ERK5 media en la migración e invasión inducida por EGF o suero (Rovida et al., 2015).

ERK5 en osteosarcoma.

Se ha observado una elevada expresión de ERK5 en células de osteosarcoma humano, donde promueve la proliferación, la migración y la invasión de estas células (Huang et al., 2017). En algunos tipos celulares de osteosarcoma humano, como las células U2O2, la sobreexpresión de ERK5 induce la expresión de la metaloproteinasas 9 de matriz extracelular (MMP-9), implicada en migración e invasión de células tumorales (Kim et al., 2011). De acuerdo con estos resultados, el silenciamiento de ERK5 en estas células reduce su migración e invasión al promover una reducción de los niveles de expresión del factor de transcripción Slug, implicado en la diferenciación, migración e invasión de células de osteosarcoma (Yue et al., 2014). A falta de confirmar estos resultados en modelos animales de osteosarcoma, la vía de MEK5-ERK5 podría ser una buena diana para terapias dirigidas para este tipo tumoral.

ERK5 en leucemia.

ERK5 media la proliferación de células T leucémicas y es esencial para su supervivencia (Garaude et al., 2006). Entre otros, ERK5 es necesaria para la supervivencia de células B inducida por el factor activante de células B BAFF (Jacque et al., 2015). ERK5 regula positivamente, a través de MEF2C, factores importantes para la diferenciación monocítica en células de leucemia mieloide humana (Wang et al., 2013). Además, ERK5 induce la activación de la vía NF- κ B al promover la retención nuclear de p65/RELA, lo que genera resistencia frente a estímulos apoptóticos (Garaude et al., 2006). También se ha demostrado que la expresión de ERK5 dependiente de BCR-ABL (gen de fusión presente en la mayoría de los pacientes con LMC) aumenta la supervivencia de las células de leucemia mieloide crónica (LMC) (Buschbeck & Ullrich, 2005). Por el contrario, la inhibición o el silenciamiento de la vía MEK5-ERK5 reduce la proliferación e induce muerte apoptótica de líneas celulares derivadas de pacientes con LMC (Tusa et al., 2018) o LMA (Xu et al., 2015; Kang et al., 2018), al promover una reducción de los niveles de expresión de c-myc y ciclina D1 (Kang et al., 2018), o de células T leucémicas al disminuir la acumulación nuclear de p65/RELA (Garaude et al., 2006). Estos hallazgos fueron corroborados *in vivo*, al comprobar que el tratamiento sistémico con el inhibidor de ERK5 XMD8-92 reduce el número de células leucémicas en un modelo de ratón con LMC (Tusa et al., 2018). En este sentido, el silenciamiento de ERK5 reduce el crecimiento de tumores *xenografts* de células T leucémicas (Garaude et al., 2006) y sensibiliza las células de LMA frente al tratamiento quimioterápico estándar con citarabina (Xu et al., 2015).

INTRODUCCIÓN

Como se ha descrito para otros tipos tumorales, ERK5 es una diana del microRNA-143 en células mieloides, y la expresión de ERK5 y miR-143 muestran una correlación inversa en pacientes de LMA. Así, las células mieloides en proceso de diferenciación muestran un aumento de los niveles de miR-143 y bajos niveles de ERK5, lo que compromete el crecimiento celular e induce apoptosis (Hartmann et al., 2018). En células T Jurkat (leucemia linfocítica aguda), la sobreexpresión de miR-143 induce una reducción de los niveles de ERK5, lo que promueve un bucle de retroalimentación positiva que potencia la apoptosis dependiente de caspasas mediada por Fas (Akao et al., 2009).

ERK5 en Mieloma Múltiple (MM).

Las líneas celulares de MM y células plasmáticas de la médula ósea de pacientes con MM expresan elevados niveles de ERK5. ERK5 juega un papel crítico en el MM, dado que media en la proliferación y supervivencia de este tipo tumoral. Así, por ejemplo, ERK5 es necesaria para la proliferación y supervivencia inducidas por la interleucina 6 (IL-6), de forma independiente de las vías de Ras y Src (Carvajal-Vergara et al., 2005).

La expresión de un dominante negativo de ERK5 disminuye la proliferación de las células MM, y sensibiliza estas células de MM frente al tratamiento clínico estándar con dexametasona y con el inhibidor del proteasoma bortezomib (Carvajal-Vergara et al., 2005). De interés, la sobreexpresión de ERK5 induce resistencia al tratamiento con bortezomib, lo que sugiere que aproximaciones terapéuticas encaminadas a reducir los niveles de ERK5 (como fármacos del tipo PROTAC) podrían ser utilizadas para mejorar esta resistencia. En este sentido, y dado el importante papel de las CDKs en la progresión del MM, el nuevo inhibidor dual ERK5/CDKs TG02 ha mostrado resultados prometedores. Este compuesto inhibe la proliferación de varias líneas celulares de mieloma, y muestra una actividad antitumoral en dos modelos de tumores *xenografts* de MM, tanto como agente único como potenciando la muerte apoptótica inducida por los inhibidores del proteasoma bortezomib y lenalidomida (Álvarez-Fernández et al., 2013).

ERK5 en melanoma.

ERK5 se expresa consistentemente tanto en líneas tumorales como biopsias de melanoma maligno, y media en la proliferación de este tipo tumoral. Así, tanto la inhibición farmacológica como el silenciamiento de ERK5 reduce drásticamente el crecimiento de tumores *xenografts* de células con BRAF salvaje o mutado/oncogénico (BRAF-V600E). BRAF oncogénico regula positivamente la expresión, localización nuclear y actividad transcripcional de ERK5, y los inhibidores de ERK5 o MEK5 potencian la acción antitumoral del inhibidor de BRAF-V600E vemurafenib, tanto en líneas celulares como en modelos murinos de tumores *xenografts* (Tusa et al., 2018). De interés, recientemente se ha reportado que ERK5 media en la resistencia al tratamiento con inhibidores de MEK1/2 del melanoma metastásico inducido por BRAF oncogénico (Song et al., 2017).

ERK5 en neuroblastoma (NBL).

ERK5 juega un papel relevante en la proliferación de células de neuroblastoma (NBL) dependiente de la quinasa del linfoma anaplásico ALK. Así, la inhibición farmacológica o el silenciamiento de ERK5 suprimen la

proliferación de líneas celulares de NBL con sobreexpresión de ALK (Umopathy et al., 2014). Mecánicamente, ALK induce la activación y translocación nuclear de ERK5 mediante la vía de señalización PI3K-AKT. Una vez activa, ERK5 promueve la activación transcripcional del factor *MYC*, un oncogén amplificado habitualmente en el neuroblastoma. Por último, el inhibidor de ERK5 XMD8-92 sinergiza con el inhibidor clínico de ALK crizotinib en la reducción de la proliferación de líneas celulares de NBL y de los correspondientes tumores *xenografts* (Umopathy et al., 2014). En el capítulo 2 de la sección de Resultados de esta Tesis Doctoral se muestran evidencias que apuntan a un papel de ERK5 nuclear en la resistencia al tratamiento del NBL con agentes quimioterápicos como el cisplatino, a través de un mecanismo dependiente de p53.

2.2. ERK5 CONTROLA LA SUPERVIVENCIA DE LA CÉLULA TUMORAL

Como se ha mostrado, los niveles de expresión de ERK5 o MEK5 correlacionan inversamente con la supervivencia de pacientes oncológicos con cáncer de próstata, mama, pulmonar, colon, hepatocarcinoma y leucemia. Estos datos han promovido la idea de utilizar la vía de MEK5-ERK5 como una nueva diana en la intervención terapéutica de distintos tipos de cáncer. Así, y como se detalla a continuación, la inhibición farmacológica o el silenciamiento de la vía MEK5-ERK5 generan citotoxicidad en modelos celulares y animales (tumores *xenografts*) (revisado en Gomez et al., 2016). Los resultados que se presentan a continuación están resumidos en la **Tabla 1**.

2.2.1. Los inhibidores de ERK5 o MEK5 inducen toxicidad en células tumorales.

Durante los últimos años, la síntesis de inhibidores de MEK5 y ERK5 ha sido de gran ayuda a la hora de establecer la vía de MEK5-ERK5 como una nueva diana antitumoral. La estructura de estos compuestos se facilita en la **Figura 8**.

Inhibidores de MEK5.

En 2008 se desarrollaron los primeros inhibidores específicos de la vía de MEK5-ERK5, **BIX02188** y **BIX02189**. Estos compuestos son inhibidores competitivos del ATP y están basados en un grupo indolinona-6-carboxamida. Inhiben *in vitro* la actividad catalítica de MEK5 con una IC₅₀ de 4 y 1 nM, respectivamente. Ambos compuestos también inhiben la actividad catalítica de ERK5 con una IC₅₀ de 810 nM y 59 nM respectivamente, sin afectar a otras MAP quinasas estrechamente relacionadas como MEK1/2, MKK4, MKK7, MKK3, MKK6, ERK2, p38 α o JNK2. En ensayos en células HeLa estimuladas con sorbitol (estrés osmótico), estos inhibidores resultan específicos ya que bloquean la fosforilación de ERK5 sin afectar a la fosforilación de las MAP quinasas ERK1/2, p38s o JNKs (Tatake et al., 2008).

BIX02188 induce apoptosis en líneas celulares de leucemia mieloide aguda (LMA) que muestran duplicación interna en tándem del receptor de citoquinas con actividad tirosina quinasa FLT3 (*Fms-like tyrosine kinase-3*) (Razumovskaya et al., 2011). Esta duplicación causa la hiperproliferación de estas células y es una de las dianas para el tratamiento de este tipo de leucemia. Específicamente, el tratamiento con BIX02188 inhibe la activación del eje Akt/mTORC1 inducida por FLT3 (Razumovskaya et al., 2011). BIX02189 también ha mostrado actividad antitumoral en líneas celulares y modelos murinos de leucemia mieloide crónica (Tusa et al., 2018).

INTRODUCCIÓN

BIX02189 anula la motilidad celular y la expresión de la metaloproteínasa MMP-2 en la línea A549 de cáncer de pulmón NSCLC, y reduce la EMT inducida por TGF- β 1. *In vivo*, BIX02189 bloquea la aparición de metástasis pulmonares en experimentos de inyección en vena de células A549. Sin embargo, este efecto no es debido a la inhibición de MEK5, sino a la de TGF- β : BIX02189 se une directamente al sitio de unión de ATP del receptor TGF- β tipo I, actuando como un potente inhibidor competitivo (Park et al., 2016). Estos resultados, y la constatación posterior de la inespecificidad y pobres parámetros farmacocinéticos de los inhibidores BIX02188 y BIX02189, han comportado el abandono del uso de estos inhibidores.

Inhibidores de la vía MEK5-ERK5

TG02. Inicialmente TG02 fue descrito como un inhibidor de las CDKs 1, 2, 7 y 9 que mostraba actividad antiproliferativa en modelos de leucemia mieloide aguda, al inducir el arresto en fase G1 del ciclo celular y apoptosis (Goh et al., 2012). TG02 inhibe a las CDKs con una IC₅₀ de 3-9 nM, pero también inhibe otras tirosina quinasas como Lck, Fyn, JAK2 y FLT3 (IC₅₀ 10-20 nM), y serina-treonina quinasas como p38 y ERK5 (IC₅₀ 40-50 nM). Por ello, hoy en día se considera a TG02 como un inhibidor multiquinasa.

La molécula TG02 ha permitido establecer el papel de ERK5 en el control de la apoptosis y la supervivencia de las células de mieloma múltiple (MM) y de cáncer de mama triple negativo (TNBC). TG02 inhibe la proliferación e induce apoptosis en líneas celulares derivadas de pacientes y en modelos de tumores *xenografts* de MM y TNBC, por un mecanismo que requiere la inhibición de ERK5 (Álvarez-Fernández et al., 2013 y Ortiz-Ruiz et al., 2014, respectivamente). De interés, TG02 potencia la acción antitumoral de los inhibidores del proteasoma bortezomib y lenalidomida en el MM (Álvarez-Fernández et al., 2013), y de los quimioterápicos docetaxel, cisplatino y vinorelbine en el TNBC (Ortiz-Ruiz et al., 2014).

XMD8-92. XMD8-92 fue el primer inhibidor de ERK5 sintetizado. Es un compuesto análogo del ATP, con un grupo central pirimido-benzodiazepinona, que inhibe a ERK5 al competir con la fijación del ATP en el lazo catalítico e impedir la conformación activa (cerrada) del dominio quinasa (Yang et al., 2010). Como ocurre para la mayoría de inhibidores de proteínas quinasas, XMD8-92 no presenta una absoluta especificidad para ERK5, y en ensayos *in vitro* inhibe potentemente otras proteínas quinasas como DCLK1/2 (*Doublecortin-like kinase*), PLK4 (*Polo-like kinase*) y TLK1 (*tousled-like kinase*). En células, XMD8-92 inhibe la activación de ERK5 inducida por EGF con una IC₅₀ de 240 nM, y la activación transcripcional de MEF2C inducida por ERK5, sin afectar la actividad de ERK1/2 incluso a concentraciones elevadas (5 μ M) (Yang et al., 2010). XMD8-92 presenta unos razonables parámetros farmacocinéticos, lo que ha facilitado su uso *in vivo* en modelos animales de cáncer, y la validación de ERK5 como una nueva diana antitumoral. A continuación, se detallan los estudios en los que se ha reportado una actividad antitumoral del XMD8-92.

La administración sistémica de XMD8-92 reduce el crecimiento de tumores *xenografts* de células Hela de cáncer cervical (Yang et al., 2010), A549 de cáncer pulmón NSCLC (Yang et al., 2010; Yang et al., 2013), MDA-MB231 de TNBC (Al-Ejeh et al., 2014), AsPC-1 de adenocarcinoma ductal pancreático (Sureban et al., 2014), HepG2 y Huh-7 de hepatocarcinoma (Rovida et al., 2015), HCT116 de colorrectal (De Jong et al., 2016), células de NBL con sobreexpresión de ALK (Umapathy et al., 2014) y A375 de melanoma maligno (Tusa et al., 2018). El mecanismo de acción varía según el modelo, pero en la mayoría de los casos el XMD8-92 induce arresto en la fase G1 del ciclo celular y apoptosis mediada por la vía intrínseca. Así, por ejemplo, se ha observado que la inhibición farmacológica de ERK5 suele resultar en una reducción de los

niveles de la ciclina D1, concomitante a un aumento de expresión del inhibidor del ciclo celular p21 (Stecca & Rovida, 2019). En referencia al afecto apoptótico, se ha reportado que el XMD8-92 o bien induce un aumento en la expresión de proteínas proapoptóticas de la familia de Bcl-2 como Bim, Bax (Al-Ejeh et al., 2014), BNIP3 y BNIP3L (Song et al., 2015), o bien reduce los niveles de Bcl-2 (Kang et al., 2018). Los mecanismos por los que ERK5 regula la expresión de las proteínas de la familia de Bcl-2 no han sido descritos.

Diferentes estudios han mostrado que la inhibición de ERK5 por XMD8-92 sensibiliza las células tumorales al tratamiento con quimioterapia, radioterapia y terapia dirigida. Así, XMD8-92 sensibiliza tumores colorrectales frente a 5-fluorouracilo, mediante un mecanismo p53-dependiente (Pereira et al., 2016); tumores de cáncer de mama TNBC a diferentes platinos y taxoles (Ortiz-Ruiz et al., 2014); tumores escamosos de piel a doxorubicina (Finegan et al., 2015) y tumores de glioblastoma a temozolamida (Carmell et al., 2018). Recientemente se ha sugerido que esta sensibilización podría deberse a la acción de ERK5 sobre los transportadores ABC, responsables de la resistencia a fármacos. Así, en modelos celulares de línea KB de carcinoma epitelial se ha observado que la inhibición de ERK5 bloquea la actividad del transportador ABCB1, lo que resulta en la potenciación del efecto citotóxico de la doxorubicina (Wang et al., 2020).

La inhibición de ERK5 por XMD8-92 sensibiliza tumores *xenografts* de células A549 y H1299 de cáncer pulmón NSCLC a la radioterapia, resultando en un aumento de la muerte celular apoptótica y una reducción en la neovascularización tumoral (Jiang et al., 2019). Por último, se ha observado que la administración sistémica de XMD8-92 potencia la toxicidad del inhibidor clínico de ALK crizotinib en tumores *xenografts* de células de neuroblastoma que sobreexpresan ALK (Umapathy et al., 2014), y que sinergiza con el inhibidor de Akt ipatasertib en la inhibición de la proliferación y migración de líneas celulares de TNBC (Wright et al., 2020).

A pesar de lo arriba expuesto, hoy en día se desaconseja el uso de XMD8-92 para estudiar el impacto de ERK5 en la célula tumoral. Esto es debido al reciente descubrimiento que ha puesto de manifiesto que el XMD8-92, como numerosos inhibidores de proteínas quinasas ATP-competitivos, es un potente inhibidor de la proteína BRD4 (*Bromodomain-containing Protein 4*) (Ember et al., 2014; Ciceri et al., 2014) una reconocida diana antitumoral (Shi et al., 2019). BRD4 es un co-activador transcripcional que posee dos dominios de unión (bromodominios) a las lisinas acetiladas de las histonas. BRD4 es necesaria para la actividad de CDK9, una proteína quinasa esencial para la activación (fosforilación) de la RNA Polimerasa II que gobierna el inicio de la transcripción génica (Jonkers & Lis, 2015). La inhibición de BRD4 comporta la desregulación de la transcripción génica, uno de los *hallmarks* del cáncer.

INTRODUCCIÓN

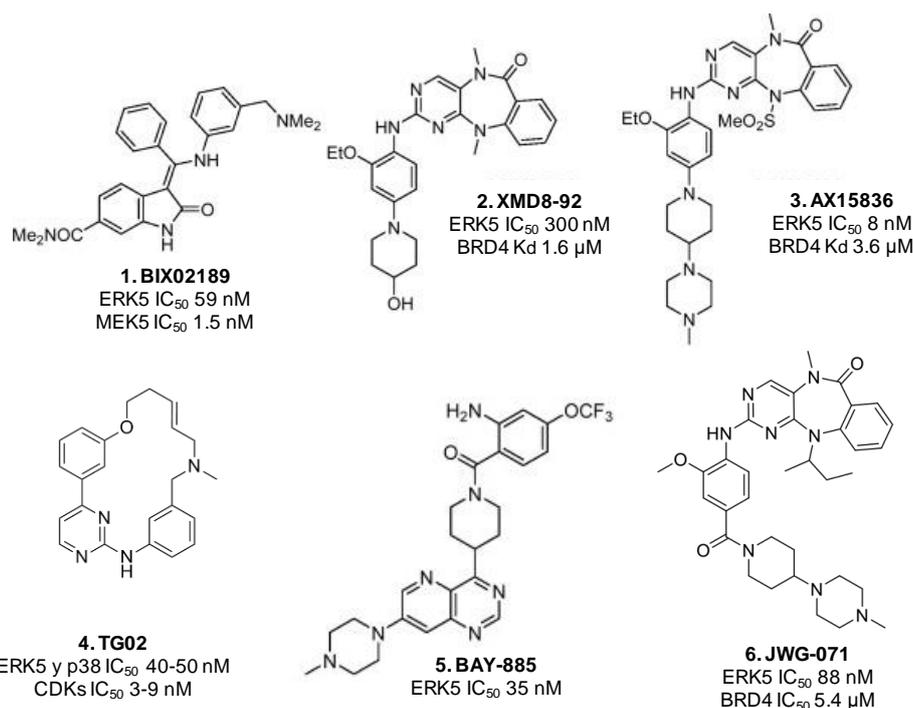


Figura 8. Estructura química de los inhibidores de ERK5 desarrollados durante los últimos años.

JWG-045. JWG-045 es un inhibidor de ERK5 sin actividad BRD4. Al igual que XMD8-92, se trata de un inhibidor ATP-competitivo con un grupo central pirimido-benzodiazepinona. A diferencia de XMD8-92, JWG-045 no presenta actividad anti-BRD4 (Williams et al., 2016). JWG-045 inhibe a ERK5 con una IC₅₀ de 150 nM. JWG-045 reduce la proliferación de células de melanoma que presentan BRAF salvaje o BRAF mutado (V600E), provocando un arresto del ciclo celular en fase G1 y un aumento de expresión del inhibidor de ciclo celular p21 (Tusa et al., 2018). JWG-045 no ha sido probado en experimentos *in vivo*, por lo que se desconocen sus parámetros farmacocinéticos.

AX15836. AX15836 es un inhibidor de ERK5 sin actividad BRD4, con una estructura que presenta un grupo central de pirimido-benzodiazepinona. Este inhibidor bloquea la fosforilación de ERK5 inducida en respuesta a EGF con una IC₅₀ de 9 nM (Lin et al., 2016). Es un inhibidor específico, dado que a una concentración de 1 μM sólo inhibió a ERK5 de un panel de 100 proteínas quinasas. El estudio inicial, que muestra que el AX15836 no inhibe la proliferación de células de mieloma múltiple inducida por IL-6, sirvió para poner en cuestión el papel de ERK5 en la regulación de la proliferación de la célula tumoral (Lin et al., 2016). Sin embargo, este compuesto presenta problemas de solubilidad en medios de cultivos celulares y unas propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas muy mediocres, por lo que no se ha podido evaluar su actividad en modelos animales.

BAY-885. BAY-885 es un inhibidor de ERK5 ATP-competitivo de nueva generación, que presenta un grupo central de piperidina-pirimidina. Este inhibidor surgió del análisis mediante TR-FRET (*time-resolved fluorescence energy transfer*) de una colección de compuestos de Bayer (~3,4 millones de compuestos). Este inhibidor presenta una IC₅₀ de 35 nM para ERK5 *in vitro* y una EC₅₀ de 115 nM para la inhibición de actividad transcripcional de MEF2 en células (Nguyen et al., 2019). Muestra propiedades fisicoquímicas

favorables, pero presenta una estabilidad metabólica baja en hepatocitos de rata y microsomas de hígado humano que dificulta su uso en modelos animales.

2.2.2. El silenciamiento de ERK5 induce toxicidad en células tumorales.

In vitro, el silenciamiento de ERK5 disminuye la proliferación e induce toxicidad en células de adenocarcinoma prostático PC-3 (Ramsay et al., 2011), en células de TNBC MDA-MB231 (Xia et al., 2018; Ortiz-Ruiz et al., 2014), en células metastásicas de mama a las que sensibiliza frente a agentes quimioterapéuticos (Pavan et al., 2018), en células T leucémicas (Garaude et al., 2006), en células de leucemia murina EL4 (Charni et al., 2009) y en células de adenocarcinoma pulmonar (NSCLC) (Sánchez-Fdez et al., 2019; Gavine et al., 2015). En hepatocarcinoma (HCC), el silenciamiento de ERK5 reduce el crecimiento de células SNU449 que poseen elevados niveles de ERK5 (Zen et al., 2009) y de células HepG2 y Huh-7 (Rovida et al., 2015) al disminuir su capacidad mitótica. En modelos de osteosarcoma, el silenciamiento de ERK5 reduce el número de células invasoras, debido a una bajada en la expresión y en la actividad de la proteína MMP-9 (Kim et al., 2011).

In vivo, el silenciamiento de ERK5 reduce el crecimiento de tumores *xenografts* de células de hepatocarcinoma (Rovida et al., 2015), de células de TNBC MDA-MB-231 y Hs-578T (Hoang et al., 2020), de células MCF-7 con MEK5 sobreexpresado y restablece los niveles de expresión de ER- α , y las sensibiliza a la terapia hormonal (Antoon et al., 2013), de células NJH29 de adenocarcinoma pulmonar (SCLC) (Cristea et al., 2020) y de células T leucémicas (Garaude et al., 2006). En tumores *xenografts* ortotópicos de cáncer colorrectal, el silenciamiento de ERK5 reduce las metástasis de ganglios linfáticos (Simões et al., 2015). En mesotelioma maligno, el silenciamiento de ERK5 sinergiza con doxorubicina y cisplatino para reducir el volumen de tumores de *xenografts* de células H2373. El análisis de *microarrays* de DNA de estas células permitió comprobar que el silenciamiento de ERK5 resulta en una reducción de los ARNm de transportadores ABC (*ATP binding Cassettes*), lo que podría explicar la potenciación del efecto citotóxico de la quimioterapia al silenciar ERK5 (Shukla et al., 2013).

INTRODUCCIÓN

Tipo de cáncer	Estrategia	Efecto	Referencias
Cáncer de próstata	Silenciamiento	siERK5 inhibe la proliferación y la invasión de células PC-3, y de tumores <i>xenografts in vivo</i>	Ramsay et al., 2011
Cáncer de mama triple negativo	Silenciamiento Inhibición con XMD8-92, TG02	shERK5, XMD8-92 ó TG02 bloquean la proliferación <i>in vitro</i> y el crecimiento tumoral <i>in vivo</i>	Al-Ejeh et al., 2014; Ortiz-Ruiz et al., 2014; Xia et al., 2018; Hoang et al., 2020
Mieloma múltiple (MM)	Silenciamiento	DN-ERK5 tiene efecto antiproliferativo en células MM	Carvajal-Vergara 2005
	Inhibición con TG02	TG02 induce citotoxicidad en líneas celulares de MM, y reduce del crecimiento de tumores <i>xenograft</i>	Álvarez-Fernández, et al., 2013
Carcinoma Hepatocelular	Silenciamiento Inhibición con XMD8-92	XMD8-92 ó silenciamiento inhibe la migración celular inducida por EGF y reduce el tamaño de tumores <i>xenografts</i>	Rovida et al., 2015
Leucemia	Silenciamiento	shERK5 disminuye la proliferación y bloquea la formación del tumor	Garaude et al., 2006; Charni et al., 2009
Carcinoma pulmonar	Silenciamiento Inhibición con XMD8-92	XMD8-92 ó siERK5 bloquea la proliferación y la angiogénesis <i>in vivo</i> . siERK5 aumenta la apoptosis inducida por la radiación ionizante <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Yang et al., 2010; Jiang et al., 2019 Sánchez-Fdez et al., 2019; Gavine et al., 2015
Neuroblastoma (NBL)	Inhibición con XMD8-92	XMD8-92 reduce el crecimiento de los tumores <i>xenografts</i> NBL	Umapathy et al., 2014
	Silenciamiento	Al silenciar ERK5 bajan los niveles del oncogén n-myc	
Glioma	Silenciamiento	siERK5 disminuye la migración celular inducida por HGF y la capacidad de invasión	Chen et al., 2015
Melanoma	Silenciamiento XMD8-92	XMD8-92 y BIX02189 reducen el crecimiento de células <i>in vitro</i> y de <i>xenografts</i> BRAF mutado (V600E)	Tusa et al., 2018
Mesotelioma maligno	Silenciamiento XMD8-92	shERK5 y XMD8-92 reducen el crecimiento del tumor <i>in vivo</i>	Shukla et al., 2013; Thompson et al., 2017
Osteosarcoma	Silenciamiento	shERK5 reduce la migración e invasión	Kim et al., 2012; Yue et al., 2014
Cáncer de piel	Silenciamiento XMD8-92	XMD8-92 bloquea el desarrollo de tumores y ERK5-KO bloquea la tumorigénesis impulsada por inflamación	Finegan et al., 2015
Adenocarcinoma ductal de páncreas	XMD8-92	XMD8-92 inhibe el crecimiento de tumores <i>xenografts</i> de células AsPC-1	Sureban et al., 2014

Tabla 1. Efecto de la inhibición o el silenciamiento de ERK5 en la proliferación celular y en el crecimiento tumoral.

2.2.3. Implicación de ERK5 en la resistencia a la terapia dirigida contra las MAPK RAS-MEK-ERK

La activación o desregulación de alguno de los componentes de la vía de RAS/RAF/MEK/ERK, implicada en proliferación y supervivencia celular, está presente en numerosos tipos tumorales (Samatar & Poulidakos, 2014). El 30% de los tumores humanos analizados son portadores de alguna mutación en alguno de los genes *RAS* o *RAF* canónicos.

En general, las mutaciones de *KRAS* se encuentran con mayor frecuencia en adenocarcinomas y tumores sólidos (Jančík et al., 2010), como cáncer colorrectal donde un 45% de los pacientes presentan mutaciones en *KRAS* (Vaughn et al., 2011). Por su parte, mutaciones en *NRAS* son prevalentes en diferentes leucemias, carcinoma de tiroides y en el melanoma maligno (donde es excluyente con mutaciones de *BRAF*). En el caso del melanoma, sin embargo, la alteración genética más frecuente es la mutación de *BRAF* V600E, que se da en aproximadamente en el 50% de los pacientes (Schadendorf et al., 2015). Las mutaciones de *NRAS* y *BRAF* resultan en la hiperactivación de las MAPKs clásicas ERK1/2, lo que a su vez promueve la proliferación y supervivencia del melanoma (Cohen et al., 2002). Estas observaciones impulsaron el desarrollo de inhibidores de BRAF-V600 (como vemurafenib, dabrafenib y encorafenib) y de inhibidores de MEK1/2 (como trametinib, cobimetinib y binimetinib) para el tratamiento de pacientes con melanoma. Los inhibidores de la actividad catalítica de BRAF-V600E, si bien poseen actividad antitumoral inicialmente, acaban provocando la activación paradójica de CRAF y de MEK1/2-ERK1/2 que resulta en una mayor proliferación y, en algunos, casos, tumorigénesis (Heidorn et al., 2010; Poulidakos et al., 2010). Aunque la combinación de inhibidores de BRAF-V600E y de MEK1/2 ha mejorado la supervivencia de los pacientes con melanoma metastásico que presentan BRAF mutado, la resistencia generada sigue siendo un obstáculo importante para el beneficio clínico a largo plazo de estas terapias dirigidas (Samatar & Poulidakos, 2014).

Recientemente, el análisis del fosfoproteoma de líneas celulares de melanoma metastásico con mutación BRAF-V600E permitió identificar a ERK5 como una de las proteínas sobre-activadas en respuesta al tratamiento combinado con inhibidores de BRAF-V600E y MEK1/2 (Song et al., 2017). Esta activación es debida a la acción de la proteína tirosina quinasa Src sobre ERK5. De interés, tanto la inhibición farmacológica (XMD8-92) como el silenciamiento (shRNA) de ERK5 bloquean la resistencia de líneas celulares al tratamiento combinado de inhibidores de BRAF-V600E (vemurafenib) y MEK1/2 (trametinib), y reduce el crecimiento de tumores *xenografts* de melanoma metastásico (Song et al., 2017). Posteriormente se estableció que BRAF-V600E oncogénico induce la expresión, localización nuclear y actividad transcripcional de ERK5 en modelos celulares y animales de melanoma metastásico, lo que propone a la vía BRAF-V600E/Src/ERK5 como una diana para el tratamiento del melanoma metastásico resistente a inhibidores de BRAF (Tusa et al., 2018). Sin embargo, otros autores han descrito que son los inhibidores de ERK1/2 los que provocan una activación de la vía de ERK5 en el melanoma metastásico, mediante la activación de la vía de señalización IGF1R-MEK5-ERK5. Así, tanto la inhibición del IGF1R como de ERK5 bloquean reduce el crecimiento de tumores o cultivos 3D de células de melanoma metastásico tratadas con inhibidores de MEK1/2 (Benito-Jardon et al., 2019).

La importancia de la vía de ERK5 como mecanismo de resistencia al tratamiento del melanoma también se ha observado en tumores que presentan mutaciones en *NRAS*. En este caso, la inhibición de MEK1/2 o

INTRODUCCIÓN

ERK1/2 resulta en la activación de ERK5 inducida por el receptor de PDGF. La combinación de inhibidores de MEK1/2 y ERK5 (XMD8-92) inhibe la proliferación líneas celulares de melanoma con mutaciones en *NRAS* y de los correspondientes tumores *xenograft* (Adam et al., 2020).

En cáncer colorrectal (CRR), la inhibición de MEK1/2 o el silenciamiento de ERK1/2 en líneas celulares con *KRAS* mutado resulta en una activación compensatoria de la vía de ERK5, que mantiene la proliferación celular. El tratamiento combinado de inhibidores de MEK1/2 y de ERK5 (XMD8-92), pero no el tratamiento monoterápico, suprime la proliferación en cultivos 3D (organoides) de células CCR con mutaciones en *KRAS* (De Jong et al., 2016). De interés, se han descrito resultados análogos en el modelo de adenocarcinoma ductal pancreático que cursa con mutaciones en *KRAS*. En estas células, la inhibición de ERK1/2 provoca la activación de la vía EGFR-Src-ERK5. ERK5 entonces fosforila el factor de transcripción oncogénico c-Myc en la Ser62. Esta fosforilación estabiliza a c-Myc, lo que conduce a un aumento de la proliferación tumoral, mientras que la inhibición de ERK1/2 y ERK5 interrumpe este mecanismo al desestabilizar la c-Myc. Por último, el tratamiento combinado de SCH772984 (ERK1/2i) y XMD8-92 (ERK5i), pero no de la monoterapia, anula el crecimiento de tumores *xenografts* de células MiaPaCa-2 (Vaseva et al., 2018).

3. CÁNCER DE ENDOMETRIO (EC)

3.1. ENDOMETRIO

El útero está compuesto por tres capas diferenciadas: el **perimetrio**, es la capa más externa que cubre parcialmente el exterior del útero; el **miometrio**, es un tejido muscular exclusivo del útero y tiene la capacidad de expandirse durante el embarazo y contraerse durante de parto; y por último el **endometrio**, la capa más interna del útero (**Figura 9**).

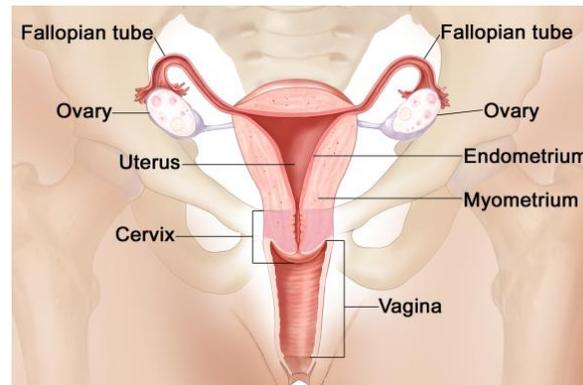


Figura 9. Anatomía del sistema reproductor femenino. Los órganos del sistema reproductor femenino incluyen: útero, ovarios, trompas de Falopio, cérvix o cuello uterino y vagina. El útero está compuesto por el perimetrio, el miometrio y el endometrio (Bethesda, 2021).

El endometrio es un tejido mucoso de naturaleza regenerativa que cubre el interior del útero. Se encuentra formado un epitelio simple con o sin cilios (dependiendo de la fase de ciclo menstrual) y por multitud de vasos sanguíneos y glándulas que se forman y destruyen en cada ciclo menstrual. El endometrio está dividido en dos capas (**Figura 10**):

- Capa basal en la que se localizan los vasos sanguíneos y células madre que generan la capa funcional.
- Capa funcional corresponde a la parte del endometrio formada por glándulas uterinas y estroma que crece durante el ciclo menstrual y finalmente se descama y expulsa al exterior en la menstruación.

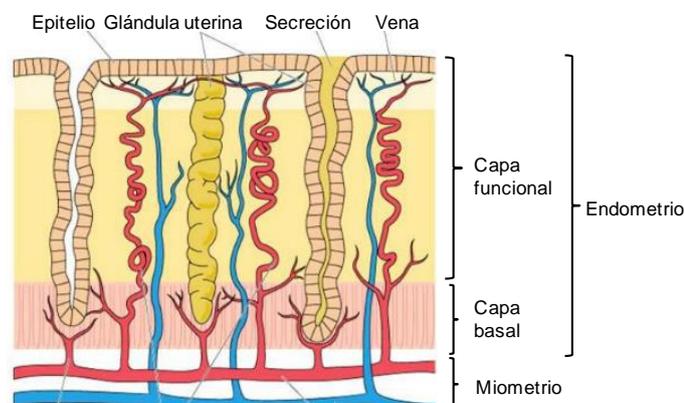


Figura 10. Esquema del endometrio uterino caracterizado por las capas basal y funcional. (Extraído de <http://www.embryology.ch/anglais/gnidation/role01.html>)

INTRODUCCIÓN

El endometrio tiene como función principal permitir la implantación del cigoto o blastocito. Presenta alteraciones cíclicas en sus glándulas y vasos sanguíneos durante el ciclo menstrual en preparación para la implantación del embrión humano y es el lugar donde se desarrolla la placenta. Dado el carácter dinámico de este tejido, como consecuencia de las variaciones de los niveles hormonales, se diferencian cinco tipos de endometrio según el estado del ciclo menstrual: endometrio proliferativo (días 6-14), endometrio secretor (días 15-28), endometrio descamativo (días 1-5), endometrio gestacional, y endometrio atrófico (Bethesda, 2021).

Endometrio proliferativo (días 6-14). Tejido endometrial crece y aumenta de grosor como consecuencia de la estimulación hormonal por estrógenos secretados por los folículos ováricos. El endometrio proliferativo está constituido por glándulas endometriales rectilíneas delimitadas por células que presentan una marcada pseudoestratificación nuclear y alta actividad mitótica. El estroma es predominantemente denso, compuesto por células con escaso citoplasma.

Endometrio secretor (días 15-28). Tejido endometrial presente durante la fase secretora, después de la ovulación. El cuerpo lúteo que queda en el ovario produce progesterona, que hace que el endometrio madure, lo que causa su engrosamiento. Este tipo de endometrio se caracteriza por un aumento de las glándulas uterinas que comienzan a secretar moco y una sustancia rica en glucógeno (vacuolas subnucleares), y por la transformación del estroma que pasa de denso a adenomatoso. Este endometrio favorece la implantación del blastocisto en caso de que haya fecundación del óvulo.

Endometrio descamativo (días 1-5). Si el oocito no ha sido fecundado se da la descamación menstrual del endometrio, que no es uniforme. En esta fase se inicia el ciclo menstrual y comprende desde día 1 al día 5. El endometrio se regenera a partir de la capa basal, que no presenta descamación.

Endometrio gestacional. En el caso en que el blastocisto se implante en el endometrio, las glándulas y el estroma adquieren un fenotipo hipertrófico y secretor. Así, en este tipo endometrial las glándulas están formadas por un epitelio bajo y rico en glicógeno y las células del estroma se vuelven grandes y poligonales con un amplio citoplasma.

Endometrio atrófico. En menopausia y post-menopausia el endometrio no presenta actividad debido a la ausencia de progesterona, ya que no hay ovulación. En esta fase, el endometrio muestra glándulas atróficas, discretamente quísticas, con núcleos pequeños y ausencia de mitosis con un estroma denso.

3.2. CÁNCER DE ENDOMETRIO

El carcinoma de endometrio (EC) es un tumor originado en la capa epitelial interna del útero. Este tipo tumoral es una de las enfermedades ginecológicas más comunes, representando el 4,8% de los cánceres en mujeres. La incidencia de EC es mayor de América del Norte y Europa, principalmente en mujeres posmenopáusicas (**Figura 11**, Morice et al., 2016). En Europa es el cuarto cáncer más común en mujeres después del cáncer de mama, pulmón y colorrectal, y en Estados Unidos tienen una tasa de incidencia anual de 60.000 nuevos casos acompañados de 10.000 muertes al año (Siegel et al., 2018). Esta incidencia

está ligada a factores de riesgo que están relacionados con la exposición excesiva del endometrio a estrógenos. Entre ellos se encuentra la terapia de estrógeno sin oposición, la menopausia temprana, la menopausia tardía, la terapia de tamoxifeno, la nuliparidad, la infertilidad o la falta de ovulación, y el síndrome de ovario poliquístico (Sorosky, 2008). Otros factores de riesgo adicionales son la avanzada edad, la obesidad, la hipertensión, la diabetes mellitus y el cáncer colorrectal hereditario sin poliposis. La presentación más común para el cáncer de endometrio es la hemorragia postmenopáusica. La edad media para el adenocarcinoma de endometrio es 61 años; el 90% de los casos diagnosticados son mujeres mayores de 50 años (Sorosky, 2008).

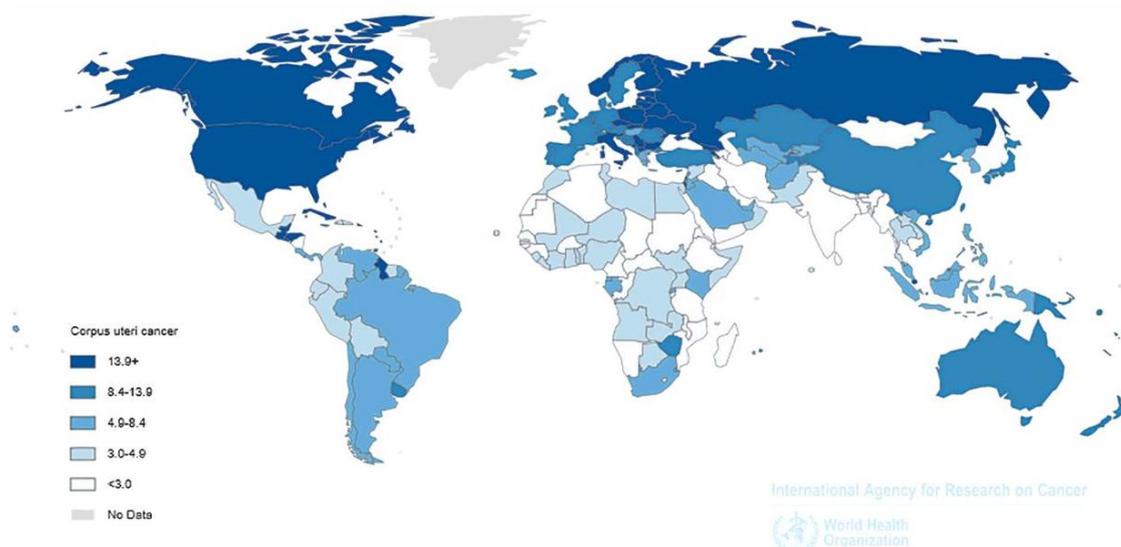


Figura 11. Tasas de incidencia estandarizadas por edad del cáncer de cuerpo uterino. Datos de GLOBOCAN, 2019. La incidencia del cáncer de útero es más alta en América y Europa del Norte, intermedia en el sur de Europa y América, y baja en Asia meridional y oriental y en la mayor parte de África (Sung et al., 2021).

3.2.1. Clasificación del cáncer de endometrio

La primera clasificación de subtipos del carcinoma de endometrio, propuesta por Bokhman en 1983, distingue entre los cánceres de endometrio de tipo I y de tipo II basándose en las características clínicas y hormonales (Tabla 2).

Cáncer de endometrio tipo I. Presenta una histología endometrioide y representa hasta el 80% de los casos. Expresa receptores de estrógenos y/o receptores de progesterona que pueden ser utilizados como diana en la terapia hormonal.

El **cáncer de endometrio de tipo II.** Presenta histología de carcinoma seroso, de células claras o indiferenciadas. Aunque es menos común (10-20%), presenta un peor pronóstico y riesgo mayor de recidiva (Bokhman, 1983; Colombo et al., 2016).

INTRODUCCIÓN

	Tipo I	Tipo II
Incidencia	80%	< 20%
Edad	Pre/peri-menopausia	Posmenopausia, >60 años
Histología	Endometriode	Seroso, células claras
Diferenciación celular	Bajo grado	Alto grado
Invasión miometrial	Mínima	Extensa
Lesión precursora	Hiperplasia endometrial	Atrofia endometrial
Estimulación estrogénica	Relacionado	No relacionado
Desarrollo clínico	Benigno	Agresivo

Tabla 2. Características clínicas y patológicas de los subtipos de cáncer de endometrio que recoge la clasificación de Bokhman en 1983 (Bokhman, 1983).

Recientemente, la OMS ha desarrollado otra clasificación para los cánceres de endometrio, basada en las características histológicas: endometriode (77%); tipo de células mixtas (7%); seroso (8%); carcinosarcoma (3%); célula clara (2%); mucinoso (1%) y otros tipos (1%) (Talhok et al., 2016). Los tumores de tipo endometriode y mucinoso pertenecen a carcinoma endometrial de tipo I de la clasificación de Bokhman, mientras que los serosos, de células claras, carcinosarcomas ó células mixtas se incluyen dentro de carcinoma endometrial de tipo II.

El atlas genómico del cáncer (TGCA) clasifica el carcinoma de endometrio en 4 subgrupos, que reflejan con mayor precisión la biología del tumor subyacente y el resultado clínico: el grupo ultramutado de la ADN polimerasa ϵ (POLE); el grupo hipermutado/microsatélite inestable (MSI); el grupo de número de copias bajo/microsatélite estable, y el grupo de número de copias alto (parecido al seroso) (Levine et al., 2013). Los tres primeros subgrupos se componen principalmente de carcinomas endometrioides, que se aproximan a los tumores de tipo I de Bokhman. Por el contrario, 94 % de los carcinomas serosos, 24 % de los carcinomas endometrioides de alto grado y 62 % de los carcinomas de tipo histológico mixto están incluidos en el subgrupo de número de copias alto (Levine et al., 2013).

El pronóstico y el tratamiento de estos tumores dependerán de la etapa (o estadio) en la que se encuentra el cáncer, y de si sólo se localiza en el endometrio o si se ha diseminado a otras partes del útero u otras partes del organismo. Estos factores son los utilizados por la clasificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO), presentados en la **Tabla 3**. La tasa de supervivencia a los 5 años del cáncer de endometrio es del 75-95% para los tumores en estadio I, 50% para el estadio II, 30% para el estadio III y menos del 5% para el estadio IV (Creasman, 2009).

Estadio IA	El tumor está limitado al endometrio y/o invade menos de la mitad del miometrio.
Estadio IB	Implica la invasión de más de la mitad del miometrio.
Estadio II	Involucrados el endocérnix hasta la capa glandular y el estroma cervical.
Estadio IIIA	Invasión de la membrana serosa o anejos, o citología peritoneal maligna.
Estadio IIIB	Metástasis vaginal.
Estadio IIIC	Metástasis hacia la pelvis o los ganglios linfáticos para-aórticos.
Estadio IVA	Invasión de la vejiga o el aparato digestivo.
Estadio IVB	Metástasis distante, incluye ganglios linfáticos intra-abdominales o inguinales.

Tabla 3. Clasificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) para cáncer de endometrio (Creasman, 2009).

3.2.2. Biología del cáncer de endometrio

El carcinoma endometriode (Tipo I) y el carcinoma de tipo no endometriode o seroso (Tipo II) se caracterizan por albergar distintos tipos de alteraciones moleculares, que principalmente suelen involucrar proteínas de la membrana celular, responsables de la adhesión y la transducción de señales entre células. Los genes más implicados en estas alteraciones son *PTEN*, *KRAS*, *PIK3CA*, *CTNNB1* (*beta-catenina 1*), *CDKN2A*, *TP53*, *HER2/NEU*, *CDH1*, *ERBB2* y *CCND1/E1*. De interés, aproximadamente el 80% de los EC presentan al menos una mutación somática que afecta a vías de señalización intracelular, siendo la vía PI3K-Akt es una de las más frecuentemente mutadas (Gavgani et al., 2018).

El cáncer de endometrio tipo I se asocia generalmente con alteraciones genéticas en *PTEN*, *PI3K*, *KRAS*, *CTNNB1*, y en el promotor de la proteína reparadora de al ADN MLH1 (Minaguchi et al., 2001; Levine et al., 2013). El gen más frecuentemente alterado es el gen supresor de tumores *PTEN* (fosfatasa y tensina homóloga), que se encuentra mutado en el 50% de los EC de tipo I. *PTEN* cataliza la desfosforilación del fosfato en posición 3 del segundo mensajero fosfatidilinositol,3-4-5-trisfosfato (PIP3), y es el principal regulador negativo de la vía PI3K-Akt-mTORC1 implicada en la supervivencia y proliferación celular (Lizcano & Alessi, 2002). La pérdida de función de *PTEN* está asociada con mal pronóstico en el EC, ya que resulta en una mayor formación de adhesiones focales, proliferación, propagación y migración celular (Kanamori et al., 2002). La alteración de *PTEN* es un acontecimiento temprano en el desarrollo del EC, ya que está presente en lesiones precancerosas, y es probable que contribuya al inicio del EC en respuesta a factores de riesgo hormonales (Maxwell et al., 1998). Por otro lado, el 25% de los tumores EC tipo I cursan con sobreexpresión del gen *PI3KCA*, que codifica para la subunidad catalítica de la PI3K. En menor medida, también se han encontrado mutaciones activadoras de *PI3KCA*, a menudo en combinación con la pérdida de función de *PTEN*, que llevan a una activación constitutiva de la vía PI3K/AKT (Cheung et al., 2011). De interés, algunos EC también cursan con mutaciones activantes de *AKT1*, como *AKT-E17K* que genera una Akt que presenta una mayor avidéz por el PIP3 (Cohen et al., 2010).

El oncogén más comúnmente alterado en cáncer de endometrio de tipo I es *K-RAS*, alterado en el 30% de los casos (Okuda et al., 2010). La ganancia de función de *K-RAS* aparece con mayor frecuencia en aquellos EC que presentan inestabilidad de microsatélites (MSI) (Lagarda et al., 2001; Engelsen et al., 2009).

INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo del tumor, la activación de RAS está asociada a un aumento de proliferación y supervivencia celular. Las mutaciones de *K-RAS* ocurren con la misma frecuencia en tumores precedidos o no de hiperplasia, y los resultados epidemiológicos sugieren que la activación de *K-RAS* se encuentra asociada a la progresión maligna de los tumores endometriales sin la necesidad de que exista una hiperplasia previa (Koul et al., 2002). También se han detectado mutaciones activantes de *K-RAS* en hiperplasias endometriales, pero con menor frecuencia que en carcinomas (Sasaki et al., 1993).

El cáncer de endometrio tipo II se asocia generalmente con alteraciones genéticas en *p53*, *p16* y *HER-2/neu*, entre otros (Levine et al., 2013). La alteración genética más común los EC de tipo II es la mutación del gen supresor de tumores *TP53* (Sherman et al., 1995; Tashiro et al., 1997). Las mutaciones en *p53* están presentes en el 90% de los carcinomas serosos (Levine et al., 2013). La proteína *p53* es importante para evitar la propagación de células con ADN dañado. Después de un daño en el ADN, *p53* se acumula en el núcleo y provoca el arresto del ciclo celular al inhibir la fosforilación de Rb mediada por ciclina D1, promoviendo la apoptosis celular (Yin et al., 1999). Así, *p53* mutada da lugar a una proteína no funcional que se acumula en la célula y actúa como un inhibidor de la *p53* salvaje, lo que conduce a la propagación de células aberrantes. Las mutaciones en *TP53* están presentes en el 80% de las lesiones precursoras de los carcinomas serosos. En una fase temprana del desarrollo del carcinoma seroso se produce la mutación de un alelo, y la pérdida del segundo alelo normal se produce en una fase tardía de la progresión del carcinoma (Sherman et al., 1995).

Otras alteraciones genéticas frecuentes en los cánceres de endometrio de tipo II son la inactivación de la proteína *p16* (McCluggage & Jenkins, 2003) y la sobreexpresión de *HER-2/neu* (Villella et al., 2006). La inactivación del gen que codifica para *p16* (*CDKN2A*) se presenta en el 45% de los carcinomas serosos y en algunos cánceres de células claras (Levine et al., 2013). El gen supresor de tumores *CDKN2A* codifica para una proteína reguladora del ciclo celular. Por lo tanto, la inactivación de *p16* conduce a un crecimiento celular incontrolado (Yemelyanova et al., 2009). Por su parte, la sobreexpresión de *HER-2/neu* y la amplificación del gen se encuentran en el 45% y el 70% de los carcinomas serosos, respectivamente (Levine et al., 2013). *HER-2/neu* es un oncogén que codifica para un receptor tirosina-quinasa transmembrana de la familia ERBB. Participa en la señalización celular en respuesta a factores de crecimiento y mitógenos, por lo que su sobreexpresión resulta en una hiperactivación de las vías de señalización Ras-Raf-MEK-ERK1/2, MAPK, PI3K-Akt/mTORC1 y de la vía de las JNKs (Di Fiore et al., 1987).

3.2.3. Terapia contra el cáncer de endometrio

Resección quirúrgica

La terapia estándar de carcinoma de endometrio se basa principalmente en la intervención quirúrgica. La histerectomía total y la extracción de las trompas uterinas son procedimientos estándares, que llevan a una tasa de supervivencia a los 5 años del 90% en la mayoría de los casos, para tumores sin metástasis en los ganglios linfáticos. Este procedimiento se realizaba históricamente por laparotomía, pero en la actualidad las técnicas menos invasivas como la laparoscopia o la cirugía asistida por robot se han convertido en el nuevo estándar quirúrgico. La cirugía para cánceres avanzados y recurrentes requiere

una citorreducción óptima, ya que cualquier resto residual del tumor impedirá un beneficio óptimo de los tratamientos posteriores (Colombo et al., 2016; Morice et al., 2016).

Terapia adyuvante

El tratamiento adyuvante después de la resección quirúrgica depende del riesgo de recurrencia, metástasis y/o persistencia de la enfermedad determinada por el estadio tumoral y los factores de pronóstico.

La quimioterapia es la principal opción en el tratamiento del cáncer de endometrio metastásico o recurrente. Los quimioterapéuticos utilizados son los taxoles paclitaxel y docetaxel, los platinos carboplatino y cisplatino, y el antibiótico doxorubicina. Es frecuente la combinación de dos o más de estos fármacos, siendo las combinaciones más comunes carboplatino/paclitaxel y cisplatino/doxorubicina. Con menos frecuencia se emplean las combinaciones carboplatino/docetaxel y cisplatino/paclitaxel/doxorubicina (Fleming, 2007).

En cáncer de endometrio se aplican dos tipos de radioterapia. La radioterapia pélvica o de rayo externo, y la braquiterapia vaginal o radioterapia de rayo interno (Creutzberg et al., 2011). La radioterapia pélvica se emplea en cáncer de endometrio de estadio I y proporciona una mejora significativa del control local pero sin afectar a la supervivencia global (Creutzberg et al., 2000). Para aquellos cánceres de riesgo intermedio-alto se aplica la braquiterapia vaginal que proporciona un excelente control vaginal con menos morbilidad y mejor calidad de vida que la radioterapia pélvica (Pearcey & Petereit, 2000). La indicación de radioterapia en el adenocarcinoma de endometrio depende de la profundidad de la invasión miometrial, el grado de diferenciación tumoral y la idoneidad de la cirugía.

La quimioterapia clásica y las terapias radioterapéuticas adyuvantes no muestran grandes efectos beneficiosos en la supervivencia general en los casos de tumores de bajo grado, y a menudo se descartan debido a sus posibles efectos secundarios. Sin embargo, hasta la fecha, las terapias combinadas de radioterapia y quimioterapia en EC avanzados o recurrentes han demostrado ser más eficaces, mostrando una tasa de supervivencia mayor que cualquiera de los dos tratamientos por separado (Colombo et al., 2016). Así, en algunas ocasiones en cáncer seroso papilar endometrial y el carcinosarcoma uterino se emplea la terapia llamada *sandwich therapy* que consiste en aplicar ciclos de quimioterapia seguidos de radiación para terminar con ciclos de quimioterapia.

En los últimos años, la quimioterapia está adquiriendo más importancia que la radioterapia como terapia adyuvante para los carcinomas de endometrio avanzado (Colombo et al., 2016; Yoon et al., 2016). Este hecho comenzó con el estudio GOG-122 del Grupo de Oncología Ginecológica japonés, que demostró una superioridad y menor toxicidad de la quimioterapia sistémica (doxorubicina-cisplatino) en comparación con la irradiación abdominal en pacientes con enfermedad avanzada (Randall et al., 2006). Además, el tercer ensayo de radioterapia posoperatoria con pacientes de carcinoma de endometrio de alto riesgo (PORTEC-3) muestra una mejora tanto en la supervivencia general y la supervivencia libre de recidivas en mujeres tratadas con quimioterapia y radioterapia adyuvantes combinadas en comparación con las tratadas sólo con radioterapia (de Boer et al., 2019). En paralelo, el estudio GOG-258 en pacientes con carcinoma de endometrio en estadio III o IVA ha concluido recientemente que la combinación de

INTRODUCCIÓN

quimioterapia y radioterapia no se asocia a una supervivencia sin recaídas más larga que el tratamiento sólo con quimioterapia (Matei et al., 2019).

Terapia hormonal

La terapia endocrina se ha utilizado ampliamente como monoterapia, con tasas de respuesta que varían del 9% al 55% (Kokka et al., 2010). En pacientes con tumores de bajo grado que expresan receptores de estrógeno y/o progesterona, la terapia hormonal puede ser tan eficaz como la quimioterapia, sin los efectos tóxicos de la quimioterapia. La progesterona es el tratamiento hormonal de elección en estas pacientes (Yang et al., 2011). También se utilizan otros fármacos, como moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (tamoxifeno, Thigpen et al., 2001), inhibidores de la aromatasa (Bogliolo et al., 2016) y antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (Dong et al., 2018). Sin embargo, en pacientes con cáncer de endometrio avanzado el uso de terapia hormonal no muestra mejora en la supervivencia (Kokka et al., 2010).

Terapia dirigida

Inhibidores de la vía PI3K-Akt-mTOR y de la vía KRAS-ERK1/2

La vía PI3K-Akt-mTORC es una de las más frecuentemente mutadas en cáncer de endometrio (Gavani et al., 2018) y por esta razón se ha convertido en el centro de las terapias dirigidas contra EC. Los fármacos de esta vía más utilizados son los inhibidores de mTOR ridaforolimus (Tsoref et al., 2014), everolimus (Slomovitz et al., 2010), temsirolimus (Oza et al., 2011; Alvarez et al., 2013), los inhibidores de PI3K, BKM120 (Heudel et al., 2017) y Pilaralisib (Matulonis et al., 2015), los inhibidores duales de PI3K/mTOR (GDC-0980, Makker et al., 2016) y los inhibidores de Akt (MK-2206, Molife et al., 2014). Sin embargo, la monoterapia con inhibidores de la vía PI3K/AKT/mTOR ha mostrado una actividad modesta, con tasas de respuesta <10% en ensayos de fase II para EC avanzado y metastásico (Morice et al., 2016). La excepción la representa temsirolimus, que tuvo una tasa de respuesta del 22% (Fleming et al., 2014). Una limitación del uso de los inhibidores de la vía PI3K/Akt/mTOR en EC es la presencia de numerosos bucles de retroalimentación de la señalización, y la interacción entre diferentes vías de señalización. Esto conlleva la activación sostenida de procesos relevantes para el desarrollo tumoral como el crecimiento celular, la proliferación o la migración. La resistencia a los inhibidores mTORC1 está relacionada con la retroalimentación positiva del complejo mTOR2 (mTORC2) sobre la vía de Akt (Hay, 2005; O'Reilly et al., 2006). Por ello, en la actualidad se están evaluando inhibidores duales de mTORC1/mTORC2 en ensayos clínicos. Sin embargo, en numerosos casos los tumores de endometrio generan resistencia a los inhibidores de la vía PI3K/Akt/mTOR mediante la hiperactivación de la vía RAS/RAF/MEK1/ERK (Bregar & Growdon, 2016). La inhibición de Akt y mTORC1 comporta la pérdida de los mecanismos de *feedback* negativos que controlan la señalización de factores de crecimiento y de supervivencia en su punto más apical, los receptores con actividad tirosina quinasa. La pérdida de este mecanismo acaba provocando la activación no canónica de los receptores, que, en el caso del EC conlleva una activación constitutiva de la vía de la MAP quinasa clásica (Gao et al., 2009; Wang et al., 2016).

Por todo ello, se ha propuesto el uso combinado de inhibidores de MEK1/2 para prevenir la resistencia a los inhibidores de la vía PI3K/Akt/mTORC1. Sin embargo, y como ya se ha demostrado para pacientes con

cáncer de mama, la combinación de inhibidores de MEK1 y de la vía PI3K/Akt/mTOR muestra altos niveles de toxicidad en los pacientes con EC enrolados en un estudio en fase I, lo que ha impedido su posterior desarrollo en fase clínicas posteriores (Westin et al., 2019).

Anti-HER2/neu

HER2/neu está sobreexpresado en el 25% de los tumores de EC de tipo seroso (Levine et al., 2013), lo que ha promovido el uso de HER2 como diana para el EC seroso que cursa con sobreexpresión de este receptor. Los estudios iniciales con trastuzumab (anticuerpo monoclonal dirigido contra HER2/neu) mostraron pobres resultados en ensayos de fase II en pacientes con cáncer de endometrio avanzado recurrente HER2 positivo (Jewell et al., 2006; Fleming et al., 2010). Sin embargo, su combinación con la quimioterapia estándar carboplatino/paclitaxel (C/P) han mostrado buenos resultados en un reciente estudio: trastuzumab en combinación con C/P mejoró la supervivencia global (OS, 29.6 vs 24.4 meses) y la supervivencia libre de progresión (PFS, 8 vs 12.9) de pacientes EC en estadio III y IV (Fader et al., 2020).

Antiangiogénicos

La expresión de VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular) está incrementada en el 50-90% de los cánceres de endometrio, y generalmente correlaciona con tumores de un grado más alto, mayor infiltración miometrial y menor supervivencia (Levine et al., 2013). Se han estudiado varios agentes antiangiogénicos para el tratamiento del cáncer de endometrio, como el bevacizumab, el cediranib o el cabozantinib. Todos ellos han demostrado una tasa de respuesta entre el 3 y el 18% como agentes únicos en cáncer de endometrio (Gehrig & Bae-Jump, 2010).

El bevacizumab, un anticuerpo monoclonal contra VEGF-A, ha sido el agente antiangiogénico más estudiado en el cáncer de endometrio. Se evaluó por primera vez como agente único en cáncer de endometrio recurrente (GOG 229-E) donde mostró una tasa de respuesta del 13,5%, con un 40,4% de mujeres que permanecían libres de progresión a los 6 meses (Aghajanian et al., 2011). En este tipo de pacientes, la combinación de bevacizumab con el inhibidor de mTORC1 temsirolimus (GOG 229-G) produjo una tasa de respuesta del 24,5%, pero acompañada de una toxicidad muy elevada (Gehrig & Bae-Jump, 2010). También se ha evaluado la combinación de bevacizumab con quimioterapia (carboplatino y paclitaxel) frente a quimioterapia como terapia única. La administración de bevacizumab aumentó significativamente la supervivencia libre de progresión (PFS), aunque produjo un significativo aumento de episodios de cardiotoxicidad (Lorusso et al., 2015). Sin embargo, los resultados de un reciente y amplio estudio (MITO END-2) no muestran un efecto beneficioso del bevacizumab en combinación con carboplatino-paclitaxel en pacientes con cáncer de endometrio recurrente (Lorusso et al., 2019).

De lo arriba expuesto se deduce la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para mejorar el pronóstico del avanzado. En esta Tesis Doctoral, hemos estudiado el papel de ERK5 en la proliferación y supervivencia del EC. Nuestros resultados sugieren que el uso de fármacos inhibidores de ERK5 podría ser de utilidad para mejorar el tratamiento quimioterapéutico del cáncer endometrioide.

OBJETIVOS

Durante los últimos años se han reportado numerosas evidencias que muestran que ERK5 es necesaria para la proliferación y la viabilidad tumoral, y que su inhibición tiene efectos antitumorales. Sin embargo, la mayoría de estas evidencias experimentales se han conseguido utilizando inhibidores de ERK5 que posteriormente han demostrado no ser específicos. Entre otros, estos inhibidores de ERK5 también afectan a la actividad del regulador transcripcional BRD4, una conocida diana antitumoral. Este hecho ha supuesto que recientemente se haya puesto en cuestión el papel de ERK5 como regulador de la proliferación y de la supervivencia tumoral.

Nuestra hipótesis se basa en que la vía de ERK5 es una diana antitumoral y que su modulación farmacológica con inhibidores específicos (sin actividad BRD4) puede ser de utilidad para el tratamiento del cáncer. Para ello se establecen los siguientes objetivos:

- 1. Obtener y caracterizar un inhibidor específico de ERK5 de nueva generación, sin actividad BRD4.**
- 2. Investigar el impacto de la inhibición específica de ERK5 en la proliferación y supervivencia de la célula tumoral, así como el mecanismo de acción implicado. Para ello, se utilizarán modelos de cáncer endometrioide y cervical, no caracterizados hasta la actualidad.**
- 3. Realizar el desarrollo preclínico preliminar del inhibidor de ERK5 como compuesto antitumoral, tanto como monoterapia como en combinación con quimioterapia estándar.**

Diversos trabajos han mostrado que la localización nuclear de ERK5 correlaciona con agresividad tumoral y mal pronóstico. Por otra parte, en distintos paradigmas tumorales se ha observado una relación funcional entre ERK5 y la proteína supresora de tumores p53. Así, la inhibición o el silenciamiento de ERK5 sensibilizan a las células tumorales a la quimioterapia, por un mecanismo dependiente de p53. Sin embargo, hasta la fecha no se ha explorado el papel de ERK5 en la adquisición de un fenotipo de resistencia mediada por p53.

Nuestra hipótesis consiste en que ERK5 nuclear confiere resistencia a quimioterapia en modelos tumorales que expresan p53 funcional. Para ello, se empleará el paradigma del neuroblastoma humano utilizando líneas celulares quimiosensibles que muestran p53 funcional y líneas celulares quimiorresistentes que presentan p53 no funcional. Con esta finalidad, se proponen los siguientes objetivos:

- 1. Caracterizar la actividad y localización nuclear de ERK5 en líneas de neuroblastoma quimiosensibles y quimiorresistentes.**
- 2. Investigar el impacto de ERK5 nuclear en la adquisición de resistencia al tratamiento con cisplatino en células de neuroblastoma.**

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES

Las líneas celulares utilizadas fueron adquiridas del ATCC (*American Type Culture Collection*), ECACC (*European Collection of Authenticated Cell Cultures*) y colaboradores. Para cada línea celular se generaron alícuotas a partir de un vial inicial, que se conservaron en tanques de nitrógeno líquido (-180°C) y se congelaron en presencia de medio de cultivo suplementado con 10% de DMSO (medio de congelación). Para el proceso de congelación, las células fueron tripsinizadas (Gibco; 0,05% tripsina/0,53 mM EDTA), resuspendidas en medio de congelación y transferidas a un criotubo que fue incluido en un contenedor Cryo Freezing (Nalgene) con alcohol isopropílico. Este contenedor fue conservado 48h a -80°C. Este sistema permite congelar las células con un descenso de temperatura de 1-3°C/min. Tras 48h a -80°C, los criotubos fueron transferidos a un tanque de nitrógeno líquido. Para la descongelación de las células, el volumen contenido en un vial (1ml) fue resuspendido en 4-5ml de medio de cultivo 10% FBS atemperado a 37°C y centrifugado a 200g. Ese pellet fue resuspendido en medio de cultivo 10% FBS y transferido a un *flask* de 25 cm². Cuando alcanzaron el 80-90% de confluencia, fueron levantadas por tripsinización y transferidas a un nuevo *flask* de 75 cm². Todas las líneas celulares utilizadas en este estudio se mantuvieron en crecimiento en medio completo en incubador con atmósfera húmeda, 5% de CO₂ a 37°C.

1.1. Líneas celulares utilizadas

Con el objetivo de caracterizar el compuesto JWG-071 en un amplio espectro de modelos tumorales, en este trabajo se han empleado líneas celulares que cubren un abanico de carcinomas de diferentes orígenes y con un perfil de mutaciones diversas.

Células Ishikawa: procedentes de adenocarcinoma de endometrio humano. Línea celular PTEN *null* que presenta mutaciones en p53, entre otras. Medio de cultivo: MEM (Sigma), 5% suero fetal bovino (Gibco), 2mM L-glutamina (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma).

Células AN3CA: células metastásicas de adenocarcinoma de endometrio humano. Línea celular PTEN *null* que presenta mutaciones en p53, entre otras. Medio de cultivo: DMEM (Gibco), 10% suero fetal bovino (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma).

Células HeLa: derivadas de carcinoma epitelial de cérvix humano. Presentan niveles de expresión elevados para ERK5, Cdc37 y Hsp90 β , por lo que representan un modelo celular eficaz para estudiar el papel de ERK5. Medio de cultivo: DMEM (Gibco), 10% suero fetal bovino (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma).

Células IMR-32: derivadas de neuroblastoma procedente de masa abdominal humana. Presentan *n-myc* amplificado y p53 funcional. Medio de cultivo: IMDM (Gibco), 10% suero fetal bovino (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma), 1% Insulina-Transferrina-Selenio (Gibco).

Células SH-SY5Y: derivadas de neuroblastoma procedente de médula ósea humana. Presentan *n-myc* no amplificado y p53 funcional. Medio de cultivo: DMEM F-12 (Gibco), 15% suero fetal bovino (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma).

MATERIALES Y MÉTODOS

Células CHLA-90: línea celular procedente de neuroblastoma derivado de médula ósea humana obtenida pos-trasplante de médula ósea. Presentan *n-myc* no amplificado y p53 no funcional. Medio de cultivo: IMDM (Gibco), 20% suero fetal bovino (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma), 1% Insulina-Transferrina-Selenio (Gibco).

Células SK-N-BE(2): derivadas de neuroblastoma procedente de médula ósea humana. Presentan *n-myc* amplificado y p53 no funcional. Medio de cultivo: IMDM (Gibco), 20% suero fetal bovino (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma), 1% Insulina-Transferrina-Selenio (Gibco).

Células SK-N-AS: derivadas de neuroblastoma procedente de médula ósea humana. Presentan *n-myc* no amplificado y p53 no funcional. Medio de cultivo: IMDM (Gibco), 20% suero fetal bovino (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma), 1% Insulina-Transferrina-Selenio (Gibco).

Células LA1-5s: línea celular de neuroblastoma procedente de la cresta neural humana de un progenitor no neuronal (ya que derivan de la línea LA-N-1, neuroblastoma de médula ósea). Presentan *n-myc* amplificado y p53 no funcional. Medio de cultivo: IMDM (Gibco), 20% suero fetal bovino (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma), 1% Insulina-Transferrina-Selenio (Gibco).

LN-18: línea celular procedente de células de glioblastoma humano de grado IV, del lóbulo temporal derecho. Las células LN-18 presentan sobreexpresión del receptor EGF. Medio de cultivo: DMEM (Gibco), 10% suero fetal bovino (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma).

Células C4-2: línea celular derivada de las células LnCaP que han estado cultivadas en ausencia de andrógenos y que se han convertido en células independientes de hormona. Presentan mutaciones en *PTEN*, entre otros. Medio de cultivo: RPMI (Gibco), 10% suero fetal bovino (Gibco), 2 mM L-glutamina (Gibco), 10 mM HEPES (Gibco), 1 mM piruvato sódico (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma).

Células MiaPaca2: procedentes de adenocarcinoma ductal pancreático humano. Presentan mutaciones en *KRAS* y *TP53*, entre otros. Medio de cultivo: DMEM (Gibco), 10% suero fetal bovino (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma).

Células A549: procedentes de adenocarcinoma pulmonar humano de tipo NSCLC (*Non-Small Cell Lung Cancer*). Presentan mutaciones en *KRAS*, entre otras. Medio de cultivo: DMEM (Gibco), 10% suero fetal bovino (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma).

Células MEF: fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) inmortalizados. En este estudio se utilizaron líneas células MEF inmortalizadas provenientes de ratones transgénicos salvajes y deficientes para *Bax* y *Bak* (*BAX/BAK*^{-/-}), cedidas por el Dr. Víctor Yuste (Facultad Medicina, UAB). Medio de cultivo: DMEM (Sigma), 10% suero fetal bovino (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma).

Células HEK-293T: Procedentes de células de riñón embrionario humano. Difieren de las células HEK-293 parentales en que expresan el antígeno T SV40 que asegura la rápida replicación episomal de plásmidos como el pcDNA3.1. Esta línea fue utilizada en los experimentos que requirieron la expresión de proteínas recombinantes, dada su alta eficiencia de transfección. Medio de cultivo: DMEM (Gibco), 10% suero fetal bovino (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina (Gibco).

1.2. Tratamiento de las células

EGF: Factor de crecimiento epidérmico (Sigma). Disuelto en agua destilada estéril. Se utilizó para inducir proliferación celular. Para inducir la activación de ERK5 endógena, 24 horas después de sembrar las células el medio completo fue sustituido por medio sin FBS durante 16 horas, previamente al tratamiento con el inhibidor JWG-071 (1 hora) seguido de incubación con 100 ng/ml de EGF.

XMD8-92: Inhibidor no específico ERK5 (Tocris). Compuesto disuelto en DMSO. Las células fueron tratadas en un rango de 1-10 μ M en función del tipo de experimento.

JWG-071: Inhibidor específico de ERK5 (Prof. Nathanael Grey, Dana Farber Cancer Institut, USA). Compuesto disuelto en DMSO. Las células fueron tratadas en un rango de 1-10 μ M dependiendo del tipo de experimento.

AX-15836: Inhibidor específico de ERK5 *in vitro* (MedChem Express). Compuesto disuelto en DMSO y utilizado a 1 μ M en ensayos de proliferación.

Q-VD-OPh: Inhibidor de caspasa-3 (APEXBio). Compuesto disuelto en DMSO. Las células fueron pretratadas durante 1-2 horas con Q-VD-OPh a una concentración de 10-20 μ M (varía según la línea celular).

Estaurosporina (STP): Potente inhibidor de proteínas quinasas como PKC, PKA (Sigma). Compuesto disuelto en DMSO. Las células fueron tratadas con 1 μ M STP durante 24h como control positivo de muerte apoptótica.

BAY 11-7082: Inhibidor de las IKKs (inhibe la activación de NF- κ B; Medchem Express). Compuesto disuelto en DMSO. Las células fueron tratadas con 10 μ M BAY-117082 durante 24h.

Paclitaxel: Quimioterapéutico estándar para el carcinoma de endometrio, cáncer de cérvix y neuroblastoma (Medchem Express). Compuesto disuelto en DMSO..

Cisplatino: Quimioterapéutico estándar para cáncer de cérvix y neuroblastoma (Sigma). Compuesto disuelto en H₂O 0.9% NaCl.

Carboplatino: Quimioterapéutico estándar para el carcinoma de endometrio (Medchem Express). Compuesto disuelto en PBS.

Todos los tratamientos fueron aplicados en medio de cultivo 0.5% FBS para mantener las mismas condiciones en las que se realizó el tratamiento con JWG-071.

1.3. Ensayo de viabilidad celular (MTT)

Los ensayos de viabilidad celular se llevaron a cabo mediante ensayo colorimétrico, utilizando MTT (bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol, Sigma). El MTT atraviesa la membrana plasmática y es reducido por las células metabólicamente activas para formar cristales de formazán de color violeta. Debe existir una proporcionalidad directa entre el grado de reducción de MTT y el número de células vivas. Una vez aplicado el tratamiento correspondiente, el medio de cultivo fue aspirado, se añadió el reactivo MTT disuelto en medio de cultivo completo a una concentración de 0.5 mg/ml (stock a

MATERIALES Y MÉTODOS

3.5 mg/ml en agua destilada) y las células fueron incubadas entre 40-50 minutos a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se aspiró la solución de MTT y se añadió DMSO para romper las membranas celulares y así liberar los cristales de formazán violetas, quedando disueltos en el DMSO. Finalmente, la absorbancia fue determinada utilizando un lector de microplacas Synergy HT (Bio Tek laboratorios, Inc.) a una longitud de onda de medida de 560 nm y una de referencia de 620 nm.

1.4. Ensayo de proliferación por contaje celular

La proliferación celular se midió mediante un contaje automático de células. Se sembraron 25.000 células/ pocillo en una placa de 12 pocillos. 24h después de la siembra, las células fueron contadas para obtener el número de células por pocillo y este valor fue señalado como el punto inicial de proliferación (día 0). Las células fueron contadas también a día 4 o punto final utilizando un contador de células automático, TC10™ (BioRad). Las células se recogieron, se centrifugaron, el pellet se resuspendió en 10 µl de PBS y se mezcló con 10 µl de Trypan Blue. Finalmente, 10 de esos 20 µl fueron cargados en la cámara de contaje y las células fueron contadas usando el contador de células.

1.5. Ensayo de proliferación mediante incorporación de BrdU

El porcentaje de células en fase S fue determinado mediante el marcaje de células con el análogo estructural de la timidina, 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU), un método que permite cuantificar las células en las que se produce síntesis de DNA. 24 horas después de ser tratadas con 10 µM de JWG-071, las células fueron incubadas con una solución de BrdU 3 µg/mL durante 16 horas. Las células fueron fijadas durante 20 minutos a temperatura ambiente con 2 ml de etanol frío al 70%. Para disgregar el pellet celular el etanol fue añadido gota a gota agitando en vórtex simultáneamente. Una vez fijadas, las células se lavaron con 1 mL de tampón de lavado (**Tabla 4**) y se centrifugaron durante 5 minutos a 1,000 g. Debido a que el anticuerpo anti-BrdU utilizado solo detecta el BrdU incorporado en un ADN monocatenario, el precipitado celular se incubó con 100 µL de solución de desnaturalización durante 20 min. El tampón de desnaturalización fue removido por centrifugación con 1 mL de tampón de lavado. Para neutralizar los ácidos remanes, el pellet se resuspendió en 500 µL de borato sódico (Na₂B₄O₇) pH 8.5 durante 2 minutos. Nuevamente las células fueron lavadas y centrifugadas para proceder a la incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo primario anti-BrdU (BD Biosciences) diluido 1:200 en tampón de dilución. Se lavó una vez más y a continuación se incubó durante 20 minutos con el anticuerpo secundario Alexa fluor 488 donkey anti-mouse IgG diluido 1:1000. A partir de este momento las células fueron preservadas de la luz. El precipitado celular se lavó y se resuspendió en 500 µL de PBS y el número de células que presentaron BrdU incorporado fue determinado en citómetro de flujo Beckman Coulter FC 500, a una longitud de onda de 488 nm.

Tampón	Composición
Tampón de lavado	1% BSA en PBS
Tampón de desnaturalización	2 M de HCl
Tampón de dilución	0.5% BSA; 0.5% Tween-20 en PBS

Tabla 4. Composición de los tampones utilizados en ensayos de electroforesis y de inmunoblot.

1.6. Ensayo de formación de colonias

La formación de colonias fue medida mediante la cuantificación de las colonias teñidas con cristal violeta. El cristal violeta es un colorante sintético que se une a las proteínas y al ADN de células adheridas. Dado que las células adherentes (Hela o Ishikawa) se desprenden de las placas de cultivo cuando son sometidas a un tratamiento que induce muerte celular, se puede usar la tinción con cristal violeta para detectar las células vivas y la capacidad de formar colonias de las mismas. Debe existir una proporcionalidad directa entre la tinción con cristal violeta y el número de colonias vivas. Una vez aplicado el tratamiento correspondiente durante 14 días, el medio de cultivo fue aspirado, se lavó con PBS y seguidamente las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos. A continuación, las células se tiñeron con una solución de cristal violeta al 0.5% durante 50 min y pasado ese tiempo el colorante fue retirado añadiendo H₂O destilada para eliminar el exceso. Finalmente, se procedió al contaje manual de las colonias escaneando la placa de cultivo empleada y utilizando el software Image J.

2. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

2.1. Lisis y cuantificación de proteína

Después de aplicar los tratamientos oportunos, los cultivos celulares fueron lavados 2 veces con PBS y lisados con tampón de lisis RIPA frío (25 mM Tris-HCl pH 7.9, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 5 mM pirofosfato sódico, 1 mM ortovanadato, 0.5% (p/v) ácido desoxicólico, 0.1% (p/v) SDS, 1% (p/v) NP-40). Todo el proceso de extracción fue realizado en hielo para mantener la temperatura baja y así evitar la degradación proteica. Las células fueron desprendidas de la placa con ayuda de un *scraper* (Sarstedt), sonicadas (3 ciclos de 15 segundos), y los lisados celulares centrifugados a 12,000 g durante 12 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido fue separado y conservado a -20°C. Para los ensayos de actividad quinasa, las células fueron lisadas en tampón de lisis NP-40 (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,27 M sacarosa; 1 mM ortovanadato sódico, pH 10; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 10 mM glicerofosfato sódico; 50 mM NaF; 5 mM pirofosfato sódico; 1% (w/v) NP-40; 0,1% β-mercaptoetanol; *Cocktail* inhibidor de proteasas (Sigma). Los lisados fueron igualmente centrifugados a 12,000 g durante 12 minutos a 4°C y los sobrenadantes resultantes guardados a -20°C hasta su uso.

La concentración proteica de las muestras fue determinada mediante el método Bradford, usando el colorante *Coomassie Blue* G-250 (Pierce) y BSA como estándar, y lectura de absorbancias en espectrofotómetro (LAN OPTICS) a una longitud de onda de 595 nm.

2.2. Extracción proteica de tumores *xenografts*

Los tumores extraídos de los ratones fueron pesados, se les añadió tampón RIPA en una relación de 1:10 (gramo tumor: ml RIPA) y se incubó a 4°C durante 10 minutos. A continuación, se procedió a homogenizar mecánicamente las muestras con ayuda de un *pestle* eléctrico (Sigma). Es importante eliminar los grumos en la medida de lo posible. La suspensión resultante fue incluida en hielo y sonicada (ciclos de 15 segundos para evitar el calentamiento de la muestra). Se realizaron tantos ciclos de sonicación como fueron necesarios para obtener un lisado lo más transparente posible. Por último, los lisados fueron

MATERIALES Y MÉTODOS

sometidos a dos ciclos de centrifugación consecutivos a 15,000 g durante 12 minutos a 4°C, con la finalidad de precipitar los detritus celulares y tisulares y eliminarlos de la muestra. Los sobrenadantes correspondientes fueron recuperados en tubos eppendorfs nuevos, y una vez determinada la concentración de proteína fueron conservados a -20°C hasta su análisis.

2.3. Extracción de proteínas de biopsias de pacientes oncológicos

Las muestras extraídas de biopsias de pacientes con cáncer endometroide (zona tumoral y peritumoral) fueron lisadas con tampón de lisis RIPA: 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA pH 8, 1% (p/v) Tritón X-100, 0.1% (p/v) SDS, *cocktail* de inhibidores de fosfatasa (Sigma) y de proteasas (Sigma). Los homogenados correspondientes a la fracción tumoral y no tumoral de cada paciente fueron disgregados, sonicados (3 ciclos de 15 segundos), y centrifugados a 15,000 g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido fue separado y conservado a -20°C hasta su uso.

2.4. Fraccionamiento subcelular

Para la separación de las fracciones citosólicas y nucleares, las células fueron cultivadas en placas de 10 cm. Después de efectuar los correspondientes tratamientos, las células fueron lavadas con PBS, recogidas con ayuda de un *scraper* y centrifugadas 5 minutos a 200 g. El pellet obtenido fue resuspendido en 0.5 ml de tampón de fraccionamiento (250 mM sacarosa, 1 mM EGTA, 10 mM HEPES-HCl, pH 7.4) e incubado durante 10 minutos en hielo. A partir de aquí, es importante trabajar en hielo para evitar la degradación proteica. A continuación, las células fueron homogenizadas mecánicamente aplicando 50 *strokes* con un homogenizador de vidrio de teflón (DD Biolab). Seguidamente, el homogenizado fue centrifugado durante 5 minutos a 2,000 g. El sobrenadante (citoplasma) fue separado en un nuevo tubo. El pellet (núcleos) fue resuspendido en tampón de fraccionamiento y se aplicó una nueva centrifugación de 5 min a 2,000 g tanto del citoplasma como de los núcleos. Esta centrifugación sirve para limpiar la fracción nuclear y para eliminar cualquier contaminación de núcleos que tengamos en la fracción citoplasmática. La fracción citosólica fue conservada a -20°C. El pellet nuclear fue resuspendido en 250 µl de tampón RIPA, incubado 10 minutos en hielo y homogenizado haciendo pasar la suspensión 5 veces a través de una jeringa de 25G. Por último, los núcleos fueron sonicados y centrifugados durante 12 minutos a 12,000 g para eliminar las membranas nucleares. El sobrenadante resultante de esta centrifuga corresponde a la fracción nuclear y fue conservado a -20°C.

2.5. Técnicas electroforéticas para la detección de proteínas

Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida

Para resolver las proteínas procedentes de los lisados celulares y tisulares se utilizó la electroforesis desnaturante en gel de SDS-Poliacrilamida, empleando el sistema Mini Portean III de Bio-Rad. Las muestras se prepararon a la concentración deseada en tampón de muestra (**Tabla 4**) conteniendo 5% de β-mercaptoetanol, se calentaron durante 5 minutos a 95°C y se resolvieron por electroforesis en geles de diferente porcentaje de acrilamida en función del peso molecular de las proteínas de interés. En cada

carril se cargaron entre 5-30 μg de proteína y se aplicó un voltaje constante de 150V durante 70-80 min (composición de tampón de electroforesis en la **Tabla 5**).

Tampón	Composición
Tampón de muestra	25 mM Tris-HCl pH 6.8; 2% p/v SDS; 10% glicerol, 10 mM DTT; 0.002% p/v azul de bromofenol
Tampón de electroforesis	25 mM Tris-HCl; 192 mM Glicina; 20% SDS
Tampón de transferencia	25 mM Tris-HCl; 192 mM Glicina; 20% metanol
TBS-Tween	20 mM Tris-HCl pH 7.6; 150 mM NaCl; 0.2% Tween
Tampón de bloqueo	TBS-Tween, 5% leche desnatada (detección de proteína total) TBS-Tween, 5% BSA (detección de residuos fosforilados)

Tabla 5. Composición de los tampones utilizados en ensayos de electroforesis y de inmunoblot.

Electrotransferencia de proteínas: Inmunoblot

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (poro de 0.45 μm , Merck Millipore) utilizando el sistema de *Mini Trans-Blot Electrophoresis Transfer Cell* (Bio-Rad), empleando tampón de transferencia (**Tabla 5**) y aplicando un voltaje constante de 100V durante 90 minutos. La validación de la transferencia fue realizada mediante tinción de la membrana de nitrocelulosa con el colorante Ponceau (Sigma). La membrana con las proteínas transferidas fue bloqueada con tampón de bloqueo (**Tabla 5**) durante una hora en agitación constante ya temperatura ambiente. A continuación, la membrana fue incubada con el correspondiente anticuerpo primario diluido en tampón de bloqueo durante toda la noche a 4°C y en agitación. A continuación, la membrana fue sometida a tres lavados de 5 minutos con tampón TBS-Tween (**Tabla 5**), y se incubó durante una hora a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa en TBS-Tween 5% leche desnatada. Por último, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con tampón TBS-Tween y las proteínas se visualizaron por quimioluminiscencia, empleando el reactivo *Clarity Western ECL substrate* de Bio-Rad, y utilizando para revelar película fotográfica *Medical X-Ray Filmn* (Agfa).

La **Tabla 6** muestra los anticuerpos primarios empleados en este trabajo y la concentración a la que fueron usados. Los anticuerpos secundarios utilizados (Pierce, ThermoFisher Scientific) fueron: goat anti-rabbit (31460), goat anti-mouse (31430).

MATERIALES Y MÉTODOS

Anticuerpo primario	Producido en	Suministrado por	Concentración
Actina	Ratón	Santa Cruz, sc-47778	WB 1:5,000
AKT	Conejo	Cell Signalling, 9272	WB 1:5,000
Fosfo-AKT (S473)	Conejo	Cell Signalling, 9271	WB 1:1,000
Bak	Conejo	Cell Signalling, 12105	WB 1:1,000
Bax	Ratón	BD Biosciences, 556467	WB 1:1,000
Bcl-2	Ratón	Cell Signalling, 15071	WB 1:1,000
Bim	Conejo	Cell Signalling, 2933	WB 1:1,000
BrdU	Ratón	BD Pharmingen	IF 1:200
Caspasa 3 fragmento	Conejo	Cell Signalling, 9661	WB 1:500 IHC 1:200
CDK4	Ratón	Cell Signalling, 12790	WB 1:1,000
CDK6	Ratón	Cell Signalling, 3136	WB 1:1,000
Ciclina D3	Ratón	Cell Signalling, 2936	WB 1:1,000
CREB-1	Ratón	Santa Cruz, sc-186	WB 1:200
ERK1/2	Conejo	Cell Signalling, 4695	WB 1:8,000
Fosfo-ERK1/2	Conejo	Cell Signalling, 4376	WB 1:5,000
ERK5	Conejo	Cell Signalling, 3372	WB 1:1,000
ERK5	Ratón	Santa Cruz, sc-398015	IF 1:200
Fosfo-ERK5	Conejo	Invitrogen, 44612	WB 1:1,000
GAPDH	Ratón	Invitrogen, AM4300	WB 1:100,000
GST	Conejo	Santa Cruz, sc-459	IC 1:500
Hsp90- β	Conejo	Invitrogen, PA3-012	WB 1:10,000
IKK- α	Ratón	Cell Signalling, 11930	WB 1:1,000
IKK- β	Conejo	Cell Signalling, 8943P	WB 1:1,000
IKK- γ /NEMO	Ratón	Cell Signalling, 2695	WB 1:1,000
IKB- α	Ratón	Cell Signalling, 4814	WB 1:1,000
JNK	Conejo	Cell Signalling, 9252	WB 1:1,000
Fosfo-JNK	Conejo	Cell Signalling, 4668	WB 1:1,000
Ki67	Conejo	Cell Signalling, 5365	IHC 1:600
MEK5 (E-3)	Ratón	Santa Cruz, sc-365198	WB 1:250
p21	Ratón	Milipore	WB 1:1,000
p53	Ratón	Cell Signalling, 48818	WB 1:1,000
p65	Conejo	Cell Signalling, 8242	WB 1:1,000
Fosfo-p65	Conejo	Cell Signalling, 3033	WB 1:1,000
PARP fragmento	Conejo	Cell Signalling, 5625	WB 1:1,000
PUMA	Conejo	Cell Signalling, 12450	WB 1:1,000
S6	Conejo	Cell Signalling, 2217	WB 1:20,000
Fosfo-S6	Conejo	Cell Signalling, 4858	WB 1:40,000

Tabla 6. Anticuerpos primarios empleados en este trabajo. WB: Western Blot; IHC: Inmunohistoquímica; IC: Inmunocitoquímica; IF: Inmunofluorescencia.

3. ENSAYO DE ACTIVIDAD QUINASA ERK5

Los ensayos de actividad quinasa se realizaron a partir de muestras purificadas mediante ensayos de *pull-down*, o bien con la proteína ERK5 activa pura (preparada anteriormente en el laboratorio). En el primer caso, se utilizaron lisados de células Hela o HEK-293T que sobreexpresaban diferentes proteínas fusionadas a GST, FLAG o HA y que fueron incubados con la resina correspondiente durante 1 hora. Tras la incubación, se realizaron 2 lavados con tampón de lisis con 0.5 M NaCl y dos lavados con tampón quinasa (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1mM EDTA, 0.1 mM EGTA) procurando dejar en el último lavado un volumen total de 15 μ L de tampón quinasa. En el segundo caso, se incluyó directamente en un tubo eppendorf 200 ng de proteína ERK5 recombinante activa pura preparada en nuestro laboratorio (Erazo et al., 2013).

En todos los casos, las reacciones se iniciaron con la adición de los sustratos acetato de magnesio (10 mM concentración final) y 0.1 mM 32 P-[γ -ATP] (GE Healthcare, 500 cpm/pmol) y 200 mM del péptido sustrato de ERK5 PIMtide (ARKKRRHPSGPPTA, sintetizado por JPT Peptide Technologies, Alemania) (Erazo et al., 2013). En el caso de los ensayos con la proteína ERK5 pura, se añadieron concentraciones crecientes de los inhibidores de ERK5 o BDR4 que se querían testar. El volumen de reacción fue de 50 μ l para ensayos de actividad ERK5 de lisados celulares, y de 30 μ l para ensayos con proteína ERK5 pura. Las reacciones fueron realizadas a 30°C en agitación continua (1000 rpm) en un agitador *thermomixer* (Eppendorf). La reacción fue detenida mediante la aplicación de 40 μ L (lisados) o 30 μ L (ERK5 pura) de la reacción sobre un papel (2x2 cm) de fosfo celulosa P81 (Whatman, un péptidos básicos) que fueron depositados en un contenedor con 50 mM de ácido fosfórico (**Figura 11**). Después de varios lavados, los papeles fueron secados y la radioactividad incorporada se cuantificó mediante contaje Cerenkov en un contador de centelleo Wallac-II (GE HealthCare). Como blanco de reacción, se utilizó una mezcla de reacción que carecía del péptido PIMtide. Los datos de actividad presentados en miliUnidades corresponden a la cantidad de enzima que cataliza la fosforilación de 1 pmol de sustrato (PIMtide) en 1 minuto.

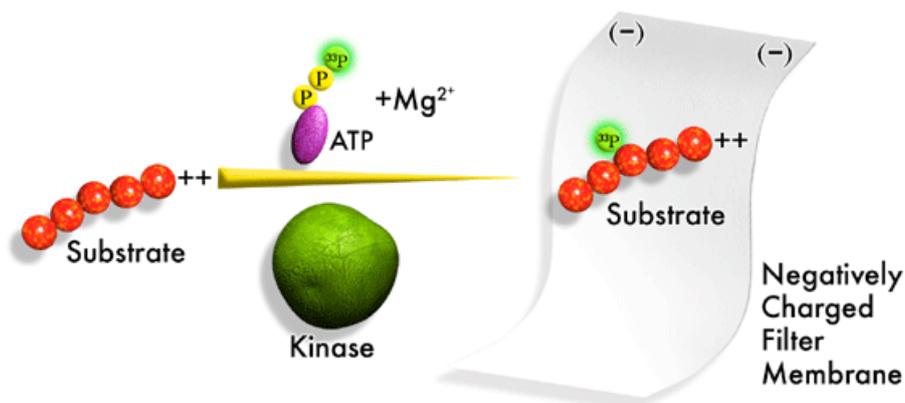


Figura 11. Esquema representativo de un ensayo radiométrico enzimático. Extraído de <https://www.ppu.mrc.ac.uk/>

4. INMUNOCITOQUÍMICA

Para realizar los ensayos de inmunofluorescencia, se sembraron células en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos pre-tratados con poli-L-lisina (40 µg/ml, Sigma) durante 1h a 37°C para favorecer la adhesión celular. Una vez aplicado el tratamiento correspondiente, se lavaron las células con PBS y se fijaron en una solución de 4% de paraformaldehído durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de tres lavados de 5 minutos con PBS, las células se permeabilizaron con tampón 1 (**Tabla 7**) durante 7 minutos. Tras un lavado de 5 minutos con PBS, se incubó con tampón 2 (**Tabla 7**) durante 15 minutos, y se bloqueó 1 h con tampón 3 (**Tabla 7**). Seguidamente, las células fijadas fueron incubadas con el correspondiente anticuerpo primario diluido en tampón 4 (**Tabla 7**) durante 16 h en cámara húmeda a 4°C. Después de 5 lavados de 5 minutos con PBS, los cubreobjetos se incubaron durante 45 minutos con el correspondiente anticuerpo secundario (conjugado a fluorescencia), diluido en tampón 4 (**Tabla 7**). La incubación se realizó temperatura ambiente en cámara húmeda, protegida de la luz. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron Alexa fluor 594 chicken anti-mouse IgG y Alexa fluor 488 anti-rabbit IgG (Invitrogen). A partir de este punto las células inmunoteñidas fueron preservadas de la luz para evitar la excitación de los fluorocromos. Se aplicaron 5 lavados con PBS, y los núcleos fueron teñidos durante 5 minutos con 5 ng/ml de Hoescht 33259 (Invitrogen) disuelto en agua milliQ. Finalmente, se lavaron los cubreobjetos 4 veces con PBS para eliminar el exceso de Hoescht y se realizó el montaje de las preparaciones con medio de montaje Fluorosave™ (Calbiochem). Las preparaciones se visualizaron mediante microscopía de fluorescencia en un microscopio Nikon Eclipse 90i, o por microscopía confocal en un microscopio Leica TCS SP5 (Leica Microsystems).

Tampón	Composición
Tampón 1	0.02% saponina en PBS
Tampón 2	0.01% saponina; 10 mM Glicina en PBS
Tampón 3	0.01% saponina; 10 mM Glicina; 5% BSA en PBS
Tampón 4	0.01% saponina; 1% BSA en PBS

Tabla 7. Composición tampones utilizados para inmunofluorescencia de cultivos celulares.

5. DETERMINACIÓN DE LA MUERTE APOPTÓTICA

Análisis por citometría de flujo: incorporación de Anexina V y de yoduro de propidio

La muerte celular fue caracterizada mediante análisis de citometría de flujo, que permite monitorizar la incorporación de Anexina V (apoptosis) y de yoduro de propidio (necrosis). Para ello, se sembraron 4×10^5 células en discos de 60 mm. Una vez finalizado el tratamiento aplicado, las células se lavaron con PBS y a continuación fueron tripsinizadas. Las células desadheridas fueron resuspendidas en 2 ml de PBS y centrifugadas 5 minutos a 200 g a 15°C. El pellet obtenido fue resuspendido en 1 ml de una solución de *binding buffer* 1x (diluido en H₂O a partir de *binding buffer* 10x, Invitrogen, 88-8007-72) y centrifugado 5 minutos a 200 g. El nuevo pellet fue resuspendido en 100 µl de *binding buffer* 1x y se añadieron 5 µl de

ioduro de propidio (Invitrogen) y 5 μ l de Anexina V (Invitrogen). Esta mezcla fue agitada e incubada 15 minutos a temperatura ambiente protegida de la luz. A partir de este paso, las muestras fueron protegidas de la luz en todo momento. Finalizado el tiempo de incubación, se añadieron 400 μ l de *binding buffer* 1x y las muestras se analizaron en el citómetro de flujo (Beckman Coulter FC 500; longitud de onda de excitación 488 nm para el ioduro de propidio y 635 nm para Anexina V). Se contaron 20,000 eventos totales por condición y se cuantificó la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda de emisión de 670 nm para el Ioduro de propidio y de 660 nm para Anexina V.

Tinción de nuclear con Hoescht 33258

El tipo de muerte celular fue evaluada mediante análisis de la morfología nuclear, utilizando Hoescht 33258, un colorante fluorescente de ADN. Se sembraron células en una placa de 12 pocillos, y después de realizar el tratamiento, el medio de cultivo fue aspirado y se añadieron 200 μ l/pocillo de solución fijadora con tinción nuclear (4% paraformaldehído, 0,1% NP40, 1 μ g/mL Hoechst 33258 (Invitrogen)), diluida en PBS. Se incubó durante al menos 10 minutos a 4°C evitando la exposición a la luz. Los núcleos se visualizaron mediante microscopía de fluorescencia en un microscopio Nikon Eclipse 90i (Nikon) a una longitud de onda de emisión de 446 nm, una longitud de onda de excitación de 390 nm y utilizando el filtro DAPI.

6. TRANSFECCIÓN DE DNA EN CÉLULAS DE MAMÍFERO

En función del tipo celular se utilizaron dos métodos de transfección: polietilenamina (PEI, MW 25,000, (Santa Cruz) para células HEK-293T y HeLa) o Lipofectamina 2000 (ThermoFisher) para células IMR-32, SH-SY5Y, Ishikawa y AN3CA. La **Tabla 8** incluye un listado de los vectores de expresión utilizados en este trabajo.

Vector	Proteína de fusión	Procedencia
pEBG2T	GST	Prof. Philip Cohen. MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee,UK)
pEBG2T	GST-ERK5 WT	Prof. Philip Cohen. MRC Protein Phosphorylation Unit (Dundee,UK)
pEBG2T	GST-ERK5 5E	Dra. Ana Cuenda. Centro Nacional de Biotecnología-CSIC (Madrid,Spain)
pCMV5	HA-MEK5DD	Dr. Eusike Nishida. Kyoto University (Japan)
pDSL	NEMO-FLAG	Dr. Xavi Dolcet. IRB, Lleida
pEIGW-SK	SR-IK β	Dr. Miguel Segura. VHIR, Barcelona
pGL4	Luciferase-AP1 promoter	Stratagene
pGL4	Luciferase-NF-kB promoter	Stratagene
pG13-luc	Luciferase-p53 promoter	Stratagene
pRL-CMV	Renilla	Promega

Tabla 8. Vectores de expresión utilizados en este trabajo y su procedencia

Transfección con Polietilenamina (PEI)

La técnica de transfección con polietilenamina (PEI) se basa en la formación de un complejo DNA-polímero catiónico. La polietilenamina es un polímero policatiónico formado por monómeros de etilenamina. Específicamente, en este trabajo se ha utilizado el polímero lineal de 25 kDa. Los cationes de los grupos amino del polímero interactúan con las cargas negativas de los grupos fosfatos del DNA y lo condensan sobre sí, favoreciendo la entrada del DNA en la célula. El *stock* de PEI fue preparado a una concentración de 1 mg/ml en agua a pH 7 (neutralizada con HCl) y alicuotado en viales de 1 ml que fueron guardados a -80°C. La relación DNA:PEI ($\mu\text{g}:\mu\text{l}$) que permite obtener niveles óptimos de transfección varía para cada línea celular, por lo que es necesario un trabajo experimental previo. En este trabajo se ha optimizado el uso de PEI en las siguientes líneas celulares: HeLa (relación DNA:PEI 1 $\mu\text{g}:$ 5 μl) y HEK-293T (relación DNA:PEI 1 $\mu\text{g}:$ 8 μl). La eficiencia de transfección fue del 90% para las células HEK-293T y del 80% para las células HeLa. Las células a transfectar fueron sembradas en placas de 10 cm a una confluencia del 60%. A las 24h post-siembra, el vector a transfectar fue diluido en 1 ml de medio DMEM sin suero, se añadió el PEI, se agitó en vórtex y se dejó reposar 15 minutos a temperatura ambiente para permitir la interacción DNA-PEI. Finalmente, la mezcla se añadió gota a gota a las células, que se incubaron durante 48 horas a 37°C antes de ser lisadas.

Transfección con Lipofectamina 2000

Esta técnica se ha utilizado para transfectar las células IMR-32, SH-SY5Y, AN3CA e Ishikawa, dado que el uso del polímero PEI resulta en un bajo rendimiento de transfección. La técnica de transfección mediante lipofectamina (Lipofectamine™ 2000) se basa en el uso de liposomas catiónicos. Las cargas positivas de los liposomas interactúan con los grupos fosfatos del DNA, formando una estructura en la que el DNA queda envuelto. Los liposomas que contienen DNA presentan carga neta positiva lo que permite superar la repulsión electrostática frente a la membrana plasmática (carga negativa). Al fusionarse con la membrana se permite la liberación del DNA en el interior de la célula. El método de transfección con lipofectamina permite alcanzar un alto rendimiento pero, sin embargo, presenta una mayor citotoxicidad que la técnica del PEI.

Las células fueron sembradas en placa de diferentes tamaños pocillos a una confluencia del 60%. A las 24h post-siembra se procedió a preparar la mezcla de transfección. Se transfectó 1 μg de DNA por cada pocillo placa de 6 pocillos. La relación de μg DNA: μl lipofectamina fue de 1:3 para las células Ishikawa, IMR-32 y SH-SY5Y, y de 1:4 para las células AN3CA. En un tubo eppendorf se añadió 1 μg de DNA en 250 μl de medio OPTIMEM (Gibco) y en otro tubo 3 ó 4 μl de lipofectamina sobre 250 μl de medio OPTIMEM. Ambos tubos se agitaron por separado y se dejaron reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Tras ese tiempo, la mezcla de lipofectamina se añadió sobre la mezcla de DNA, se agitó suavemente y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Finalmente, la mezcla (500 μl) se añadió gota a gota sobre las células a transfectar. El medio de transfección se cambió por medio completo 4 horas después de la transfección (la lipofectamina es altamente tóxica y una incubación más larga provocaría la muerte celular). Las células se incubaron con medio fresco durante 48 h a 37°C.

Para el silenciamiento de NEMO se emplearon distintos siRNAs (**Tabla 9**) y se llevó a cabo una transfección utilizando lipofectamina en la relación marcada por cada casa comercial.

siRNA	Referencia	Secuencia
esiNEMO	EHU032271 (Sigma)	CACTCCCTGTGAAGCTCTCCAGCATCATCGAGGTCCCATCAGGTGGGGAAAGA TGCTGTTCCAGGCGCACACTAGTCTACAAGGCCAGAGCTTCTGGAAGGGGGC ACCCTTGCCCTGTTGGATGAATAGGCACCTCTGGAAGAGCCAACTGTGTGAGA TGGTGCAGCCCAGTGGTGGCCCGGCAGCAGATCAGGACGTAAGTGGGCGAAGA GTCTCCTCTGGGGAAGCCAGCCATGCTGCACCTGCCTTCAAGAGCTCCGAGATGCCATC CTGAGACCTCCAGCGCTGCCTGGAGGAGAATCAAGAGCTCCGAGATGCCATC CGGCAGAGCAACCAGATTCTGCGGGAGCGCTGCGAGGAGCTTCTGCATTTCCA AGCCAGCCAGAGGGAGGAGAAGGAGTTCTCATGTGCAAGTCCAGGAGGCC AGGAACTGGTGGAGAGACTCGGCCTGGAGAAGCTCGATCTGAAGAGGCAGA AGG
siRNA NEMOs	AM51331 (ThermoFisher Scientific)	Mezcla de 6 siRNAs que codifican para los exones 8 y 10 de las diferentes isoformas de NEMO. Secuencias no facilitadas por la casa comercial.

Tabla 9. Secuencias y referencias de los siRNAs utilizados en el silenciamiento génico de NEMO/IKK- γ humana en este trabajo.

7. BIOLOGÍA MOLECULAR

7.1. Amplificación de DNA

La amplificación de plásmidos se realizó en bacterias DH5 α supercompetentes para la transformación de DNA. Todos los procedimientos fueron efectuados bajo quemador Bunsen para evitar contaminaciones. Los *stocks* de bacterias supercompetentes fueron generados por Sergio Espinosa en nuestro laboratorio. Se crecieron las bacterias DH5 α en 250 μ l de medio LB (*Luria Broth Base*, 25 g/L en H₂O destilada y autoclavada; Invitrogen) durante 16 h a temperatura ambiente. A continuación, el cultivo fue incubado en hielo durante 10 minutos y centrifugado a 1,000 g durante 10 minutos a 4°C. El pellet se incubó con 80 ml de tampón TB (10 mM PIPES, 15 mM CaCl₂, 55 mM MnCl₂, 250 mM KCl pH 6.7 (KOH)) durante 10 minutos en hielo y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. El pellet generado fue resuspendido en tampón TB con 7% DMSO, alícuotado y congelado rápidamente en nitrógeno líquido. Las alícuotas fueron conservadas a -80°C.

En este trabajo se ha empleado la transformación bacteriana por *shock* térmico. Para ello, a un tubo eppendorf con 100 μ l de bacterias supercompetentes se le añadieron 10 ng del plásmido a amplificar. El tubo eppendorf fue incubado en hielo durante 30 minutos y seguidamente 2 minutos a 42°C sin agitación (*shock* térmico). A continuación, se añadieron 400 μ l de medio LB y se incubó a 37°C durante 40 minutos a 1000 rpm. Transcurrido este tiempo, se plaqueó 50 μ l de cultivo transformado en una placa de petri con ayuda de un asa de siembra. La placa utilizada contiene LB-agar (Invitrogen) con el correspondiente antibiótico de selección. La placa de petri fue incubada a 37°C durante 16 horas. Se tomaron colonias aisladas y se resuspendieron por separado en tubos falcon de 15 ml que contenían 1 ml de medio LB con el antibiótico de selección. Los incubaron los cultivos a 37°C y 250 rpm durante 6-8, y se incluyó uno de los cultivos crecidos en un erlenmeyer que contenía 250 ml de medio LB con antibiótico de selección, que

MATERIALES Y MÉTODOS

fue incubado a 37°C y 250 rpm durante 16 horas. Finalmente, el cultivo fue centrifugado a 3,500 rpm durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y el pellet de bacterias congelado a -20°C hasta que fue procesado para purificar el DNA plasmídico de interés. Para llevar a cabo esta purificación se empleó el kit comercial *Qiagen Plasmid Purification Midprepi kit* (Qiagen, ThermoFisher Scientific). Una vez obtenido el DNA, fue disuelto en H₂O destilada autoclavada, y cuantificado en Nanodrop (ThermoFisher Scientific). El DNA fue conservado a -20°C.

7.2. Producción de lentivirus para silenciar la ERK5 celular o para sobreexpresar el mutante constitutivamente nuclear ERK5-5E.

Para silenciar de manera estable y eficiente la proteína ERK5 endógena se utilizaron vectores lentivirales pLKO.1 que codifican para diferentes shRNAs específicos para ERK5. En un inicio, se evaluaron cinco plásmidos pLKO.1 que contienen un shRNAi diferente y específico para distintas secuencias del mRNA de MAPK7 humano (gen que codifica a ERK5 humana) (Sigma, **Tabla 10**). Para determinar la eficiencia del silenciamiento de la ERK5 endógena, células HEK-293T fueron transfectadas con cada uno de ellos y los lisados obtenidos fueron analizados por inmunoblot.

shRNAi	Referencia	Secuencia
1	TRCN0000196956/pLKO.1	CCGGGCTCTCTTGCATGAGTATACCTCGAGGTATACTCAT GCAAAGAGAGCTTTTTTG
2	TRCN0000010261/pLKO.1	CCGGCCGCCCTTTCGACTTTCCTTTCGAGAAAGGCAAA GTCAAAGGGCGGTTTTT
3	TRCN0000010275/pLKO.1	CCGGGCCAAGTACCATGATCCTGATCTCGAGATCAGGATC ATGGTACTTGGCTTTTT
4	TRCN0000010262/pLKO.1	CCGGGCTGCCCTGCTCAAGTCTTTCGAGCAAAGACTT GAGCAGGGCAGCTTTTT
5	TRCN0000197264/pLKO.1	CCGGGTTTCATCTCAGACCCACCTTTCGAGAAAGGTGGG TCTGAGATGAACCTTTTTTG

Tabla 10. Secuencias y referencias de los shRNAs usados para silenciar ERK5 endógena en este trabajo

Por otra parte, con la finalidad de sobreexpresar de manera estable y eficiente el mutante de ERK5 constitutivamente nuclear (ERK5-5E), la secuencia de este mutante se introdujo en el plásmido lentiviral FG12. En esta forma de ERK5 se introdujeron mutaciones de manera que los 5 principales residuos autofosforilados de la cola C-terminal (Ser567, Ser720, Ser731, Thr733 and Ser803) fueron mutados a un residuo de glutámico.

En ambos casos se utilizó el mismo protocolo para la producción de los lentivirus. Se emplearon dos plásmidos derivados del genoma del virón HIV-1, a los que se les han eliminado los genes accesorios *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef* para evitar su efecto virulento. El primer vector es el de empaquetamiento, psPAX2, que contiene un promotor CAG, que permite la eficiente expresión de las proteínas de empaquetamiento *Gag*, *Pol*, *Tat* y *Rev*. El plásmido pMD2G (de envuelta viral) codifica para la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV), su expresión es esencial debido a la alta estabilidad que confiere. Las

partículas lentivirales fueron generados en células HEK-293T (alta eficiencia de transfección) mediante la co-transfección de los vectores del virión (psPAX2 y PMD2G) y del plásmido de interés, es decir, cada uno de los shRNA de ERK5, el vector pLKO.1 vacío, el plásmido FG12 ERK5-5E o el plásmido FG12 vacío (**Figura 12**). La transfección fue realizada utilizando PEI con una variación del método antes descrito.

Por cada lentivirus a producir se sembraron tres discos de 10 cm de células HEK-293T al 70-80 % de confluencia. Una hora antes de la transfección se cambió el medio por medio sin suero y sin antibiótico. Cada placa fue transfectada con una mezcla de 30 μg de DNA (15 μg de shRNA-ERK5 ó FG12 ERK5-5E, 5.3 μg de pMD2.G y 9.7 μg de psPAX2, diluidos en 970 μl de NaCl 150 mM estéril) y 200 μl de PEI en 800 μl de NaCl 150 mM estéril. Esta mezcla se agitó en vórtex y después de 10 minutos a temperatura ambiente se añadió a las células gota a gota. Al cabo de 4 horas el medio fue sustituido por 10 ml de medio fresco completo (el medio de las células a infectar). A las 48h pos-transfección se recolectó el medio celular conteniendo las partículas víricas. Este medio fue centrifugado 5 minutos a 200 g con el fin de eliminar el debris celular, fue filtrado usando un diámetro de filtro de 0.45 μm y finalmente fue alicuotado en eppendorf de 1 ml. Este medio conteniendo las partículas víricas fue conservado a -80°C hasta su uso.

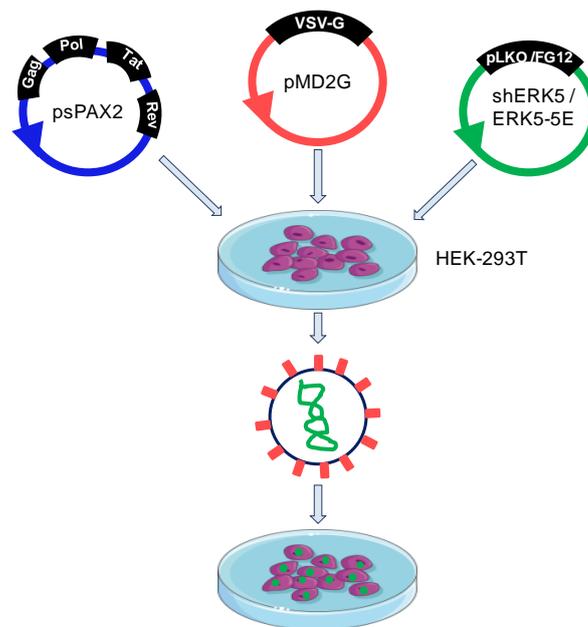


Figura 12. Representación esquemática de los vectores y protocolo utilizados para la generación de lentivirus shRNA de ERK5 y lentivirus ERK5-5E.

7.3. Infección de células con lentivirus shRNAi para ERK5 o para ERK5-5E

Se utilizaron lentivirus para silenciar la expresión de ERK5 de células Ishikawa y AN3CA. Para ello se sembraron células en placas de 10 cm, que fueron infectadas con una mezcla de medio y lentivirus en relación 1:1, respectivamente. Los virus se dejaron en el medio durante 24 horas, tras las cuales el medio fue sustituido por medio fresco. Tres o cuatro días después de la infección las células fueron lisadas y procesadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Por su parte, los lentivirus para sobreexpresar ERK5 constitutivamente nuclear (ERK5-5E) se utilizaron para sobreexpresar ERK5 nuclear en células IMR-32 y SH-SY5Y. Para ello se sembraron placas de 10 cm, que fueron infectadas con una mezcla de medio y lentivirus en relación 1:2. Los virus se dejaron en el medio durante 24 horas, tras las cuales el medio fue sustituido por medio fresco. Cuatro días después de la infección las células fueron sometidas a los tratamientos indicados, lisadas y procesadas.

7.4. Ensayo de gen reportero luciferasa para la actividad transcripcional de los promotores de AP-1, NF- κ B y p53

Este procedimiento experimental fue realizado para determinar el efecto de ERK5 sobre la actividad transcripcional de AP-1, NF- κ B p65 y p53. Con este objetivo se utilizaron los vectores: gen reportero pGL4-AP1 luciferasa, que expresa el gen de la luciferasa bajo control de tres secuencias consenso del promotor de AP1 (Stratagene); el vector del gen reportero pGL4.32[luc2P/NF- κ B-RE/Hygro]-luciferasa que expresa 5 copias de un elemento de respuesta de NF- κ B fusionado al gen de la luciferasa (Stratagene) y el vector de gen reportero pG13-P53-luciferase que expresa el gen del promotor de p21 fusionado al gen de la luciferasa (Stratagene).

- En el caso de pGL4-AP1-luc, células HeLa sembradas en placas de 12 pocillos fueron transfectadas con 1 μ g de DNA total: 500 ng de pGL4-AP1-luc, 450 ng del DNA de interés (GST-ERK5, HA-MEK5DD o ambos en relación 1:1) y 50 ng del vector pRL-CMV-Renilla luciferasa (Promega).
- En el caso de pGL4-NF κ B-luc, células Ishikawa sembradas en placas de 12 pocillos fueron transfectadas con 500 ng de DNA total: 450 ng de pGL4-NF κ B-luc y 50 ng del vector pRL-CMV-Renilla luciferasa (Promega).
- En el caso de pG13-P53-luc, células IMR-32 o SH-SY5Y sembradas en placas de 12 pocillos fueron transfectadas con 1 μ g de DNA total: 500 ng de pG13-p53-luc, 450 ng de GST-ERK5-5E y 50 ng del vector pRL-CMV-Renilla luciferasa (Promega).

Como control de transfección se utilizó renilla, de manera que los valores de actividad renilla permiten normalizar los valores de actividad luciferasa en función del grado de transfección de cada pocillo.

24 horas post-transfección, las células fueron tratadas con vehículo (DMSO o agua), o con JWG-071 o cisplatino. Una vez finalizados los tratamientos, se procedió a la lectura de la actividad luciferasa empleando el kit comercial *Dual Luciferase Reporter Assay System* (Promega). Las células fueron lavadas con PBS y lisadas con *Passive Lysis Buffer* (tampón de lisis incluido en el kit de Promega) e incubadas durante 15 minutos en agitación intensa. Para la lectura de las actividades de luciferasa y Renilla se utilizaron placas opacas de 96 pocillos, añadiendo a cada pocillo 25 μ l de lisado y 50 μ l del *Luciferase Assay Reagent*, (substrato de la luciferasa, kit Promega). Terminada la primera lectura, se añadieron 50 μ l de tampón Stop&Glo (Promega), que inhibe la señal generada por la luciferasa y aporta el sustrato que inicia la reacción catalizada por la renilla, y se realizó una segunda lectura. Las lecturas de luminiscencia se efectuaron en el lector de microplacas *Clarity™* (BioTek Instruments). Los datos obtenidos se presentan en valores de actividad luciferasa normalizados por la actividad de la Renilla.

7.5. Generación de células Ishikawa CRISPR MEK5^{-/-}

Para generar células CRISPR/Cas9 MEK5^{-/-} se empleó un kit comercial de Santa Cruz Technology. Las células Ishikawa fueron transfectadas con dos plásmidos: sc-401688, que contiene los pequeños ARN guías (sgARN) y el gen de la endonucleasa Cas9; y sc-401688-HDR, que contiene un gen de resistencia a puromicina que permite selección de células donde se han producido las roturas de doble cadena inducidas por Cas9. 48h después de la transfección, las células se trataron con 1 µg/ml de puromicina (Sigma), que permite seleccionar las células que incorporan el plásmido HDR. Al cabo de 3 semanas se recogieron las colonias observadas en las placas y se sembraron en placas de 48 pocillos. Tras alcanzar la densidad deseada, las células se expandieron tanto en una placa de 12 pocillos para obtener muestras para el análisis de inmunoblot, como en una placa de 6 pocillos para seguir cultivando los clones seleccionados. Tras el análisis de inmunoblot, los clones positivos de MEK5^{-/-} se expandieron, se alicuotaron y se almacenaron a -180°C.

7.6. Extracción de RNA total de células en cultivo

Para el aislamiento de RNA total se sembraron 2 discos de 60 mm para cada condición. Para llevar a cabo este protocolo se utilizó una zona libre de RNAsas, evitando contaminaciones. Después de aplicar los tratamientos de interés, las células fueron lavadas con PBS y tripsinizadas. Una vez despegadas, se recogieron las células con PBS y se centrifugaron a 200 g durante 5 minutos. El RNA total fue extraído de los pellets celulares utilizando el kit *RNeasy® Mini Kit* (Qiagen), siguiendo las instrucciones marcadas por la casa comercial. Los pellets celulares fueron homogenizados empleando 350 µl de *buffer RLT* (Qiagen), una solución que contiene tiocianato de guanidina que lisa las células e inactiva rápidamente las nucleasas, y se pasaron 20 veces por una aguja 20G. Una vez homogenizado, se añadió al lisado el mismo volumen de etanol 70%, se agitó y se transfirió a una columna que captura el ARN (Qiagen). Se aplicaron diversos lavados con tampones de lavado (Qiagen) y finalmente se eluyó el ARN. Los ARNs fueron conservados a -80°C.

7.7. PCR cuantitativa por transcripción reversa (RT-qPCR)

Para la obtención del cDNA a partir del ARN total aislado se utilizó el kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (ThermoFisher Scientific). Se utilizó 1 µg de ARN de cada condición por reacción. Para preparar el mix de reacción se siguieron las indicaciones de la casa comercial. Las condiciones de reacción fueron: 10 minutos a 25°C (unión de los cebadores), 120 minutos a 37°C (transcripción reversa) y 5 minutos a 85°C (inactivación de la transcriptasa inversa). El termociclador utilizado fue un PTC-100™ (MJ Research, Inc.). El cDNA fue conservado a -20°C hasta ser utilizado para la PCR cuantitativa (qPCR). Las reacciones para la qPCR fueron realizadas mediante el uso de TaqMan Gene Expression Master Mix (ThermoFisher Scientific). Las sondas (ThermoFisher Scientific) utilizadas para la detección de los amplicones de interés fueron las siguientes: NEMO/IKBK human (Hs00415849_m1) y GAPDH human (Hs03929097_g1). Se emplearon 200 ng de cDNAs de las células en cultivo tratadas *in vitro*. La amplificación fue llevada a cabo en el laboratorio de análisis y fotodocumentación, de electroforesis, autorradiografías y luminiscencia de la UAB, en un termociclador Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad). El protocolo

MATERIALES Y MÉTODOS

seguido fue: 50°C 2 min, 95°C 10 min, y 40 ciclos de 95°C 15 s, 60°C 1 min. Los dispositivos fueron controlados con el software Bio-Rad CFX Manager v3.1.

8. GENERACIÓN DE TUMORES *XENOGRAFTS*

Para la generación de tumores *xenograft* de células Ishikawa se utilizaron ratones hembra atímicos de la cepa Hsd: Athymic Nude-Foxn1nu de 6 semanas de edad. Los ratones fueron adquiridos con 5 semanas de edad y fueron mantenidos en cuarentena durante una semana antes de iniciar el trabajo experimental. Al trabajar con ratones inmunodeprimidos y con células tumorales humanas, la manipulación se llevó a cabo en una sala de seguridad biológica de nivel 2 en el módulo SPF (*Specific Pathogen Free*) del servicio de estabulario de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB). Todos los procedimientos realizados con animales en este trabajo han sido aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal y Humana (CEEAH) de la UAB.

8.1. Amplificación e inyección de células

El número de células necesarias para generar los tumores *xenografts* viene definido por el número de ratones y por el número de células a inyectar para la generación del tumor. En el caso de las células Ishikawa (carcinoma de endometrio), después de un experimento previo de escalado, el número de células por tumor se definió en 4×10^6 .

La amplificación de las células se inició una semana antes del día definido para la inyección. Las células fueron crecidas en flascos de cultivo T75 y mantenidas en una confluencia máxima del 80% con la finalidad de asegurar un ritmo proliferativo óptimo. El día de la inyección, se lavaron las células una vez con PBS, se tripsinizaron, se resuspendieron en medio MEM 5% FBS y se recogieron en tubos falcon de 50 ml. De cada tubo falcon se cogieron 10 μ l de la suspensión celular para el conteo celular (*trypan blue* en cámara de *neubauer*). En paralelo al conteo, los tubos falcon se centrifugaron 5 minutos a 200g a 10°C, y los pellets celulares se lavados con PBS y centrifugados de nuevo 5 minutos a 200 g. Por último, se resuspendió las células en medio MEM sin FBS (es importante que el medio utilizado sea libre de suero ya que si no podría provocar irritación cutánea en los ratones). El volumen de medio adicionado viene determinado por el total de células recogidas. En este caso, se prepararon a una concentración de $66,6 \times 10^6$ células/ml (4×10^6 células en 60 μ l). Se preparó un eppendorf con 60 μ l de suspensión celular por cada ratón, que fueron conservados y transportados en hielo hasta el estabulario.

Una vez en el estabulario, se trabajó siempre bajo cabina de seguridad biológica, donde se mezclaron los 60 μ l de suspensión celular de cada eppendorf con el mismo volumen de matrigel (Matrigel™ Matrix, Corning). Los 120 μ l de cada eppendorf fueron inyectados subcutáneamente en el flanco derecho de cada ratón, empleando para ello una aguja de 25G.

Los ratones fueron mantenidos en jaulas incluidas en estanterías con un sistema de ventilación independiente. La medida de volumen tumoral se realizó cada dos días utilizando un pie de rey electrónico (FST, Fine Science Tools), determinando el ancho y el largo del tumor. La fórmula utilizada para el cálculo del volumen tumoral fue: $(\text{largo} \times \text{ancho}^2)/2$. Cuando los tumores alcanzan un volumen aprox. de 100 mm³ fueron randomizados en los diferentes grupos de tratamiento.

8.2. Tratamiento y seguimiento de los ratones

Los tratamientos *in vivo* utilizados en este proyecto fueron JWG-071 y el quimioterapéutico Paclitaxel. El JWG-071 se preparó en una disolución al 30% de β -ciclodextrina (Sigma, H107), y se administró a una concentración de 30 o 50 mg/Kg (volumen administrado: 100 μ l/ ratón). La administración fue realizada diariamente por vía intraperitoneal durante el tiempo indicado. En el caso del quimioterápico paclitaxel, fue administrado diluido 10% DMSO y 90% PBS a una concentración de 15 mg/kg (volumen administrado 200 μ l). El paclitaxel fue administrado por vía intraperitoneal dos veces por semana.

Los volúmenes tumorales fueron determinados tres veces por semana. Los ratones fueron eutanasiados cuando los tumores alcanzaron un volumen superior a 1000 mm³ o ulceraron. Paralelamente, también se hizo un seguimiento del peso de los animales (tres veces por semana) para monitorizar su estado de salud y evaluar la toxicidad del fármaco administrado. Un descenso de un 20% respecto al peso inicial del ratón fue considerado motivo de punto final.

8.3. Necropsia y obtención de muestras

Los ratones fueron eutanasiados por dislocación cervical en la cabina de extracción de gases situada en la sala de necropsias del servicio de estabulario de la UAB. Para realizar la necropsia lo más rápidamente posible, fueron eutanasiados en grupos de cuatro animales como máximo y fueron procesados por dos personas trabajando en paralelo, en cabina de extracción de gases. Los animales fueron diseccionados para extraer el tumor y evaluar el estado general de los órganos. Los tumores fueron extraídos y fragmentados en tres porciones destinadas al análisis proteico, a la extracción de RNA y al análisis inmunohistoquímico. Los fragmentos destinados a la extracción de proteína y RNA fueron incluidos en tubos eppendorfs conservados a -80°C hasta ser procesados. El fragmento tumoral destinado al análisis inmunohistoquímico (normalmente la zona central del tumor) fue incluido en un casete y fijado en formaldehído al 4% entre 6-16h, dependiendo del grosor de la muestra. Transcurrido este tiempo, los casetes fueron lavados con agua destilada durante 5 minutos y finalmente conservados en etanol 70% hasta ser incluidos en parafina.

8.4. Inmunohistoquímica

Los casetes de tumores fueron enviados al Laboratorio de Histología del *Institut de Neurociències UAB* y fueron deshidratados e incluidos en bloques de parafina. Los bloques de tumores fueron cortados en secciones de 3 μ m de grosor y colocados en portaobjetos. Estos cortes fueron calentados a 37°C durante 16-18 horas en estufa, para asegurar que quedaban bien pegados al portaobjetos. Se conservaron a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

El día del procesamiento, los cortes fueron calentados en estufa a 60°C durante 5 minutos para asegurar la adherencia al portaobjetos. Seguidamente, fueron desparafinados aplicando tres lavados de 10 minutos con xileno y rehidratados con tres lavados con etanol 100% (8 minutos totales), dos lavados con etanol 95% (5 minutos totales) y un último lavado de 5 minutos con agua destilada. A continuación, se procedió a inactivar la peroxidasa endógena para evitar que interfiriera con la detección de la actividad peroxidasa asociada al anticuerpo secundario. Para bloquear la peroxidasa endógena, los bloques fueron incubados

MATERIALES Y MÉTODOS

durante 5 minutos con peróxido de hidrógeno al 3% (diluido en agua destilada de un stock comercial al 30%, Sigma). Se aplicó un lavado con agua destilada y se procedió al desenmascaramiento antigénico. Como consecuencia del proceso de fijación del formaldehído, se generan un número elevado de interacciones (como puentes de metilo) entre proteínas del tejido que pueden enmascarar los epítomos de interés. Se aplicó un protocolo de recuperación antigénica inducido por calor. Los cortes fueron incluidos en cubetas con citrato sódico pH 6, incluidas a su vez en un baño a 95°C durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, los cortes se dejaron enfriar durante 20 minutos a temperatura ambiente para que las proteínas recuperen su estructura secundaria y terciaria. A partir de este punto se aplicaron dos protocolos diferentes para el anticuerpo fragmento caspasa 3 y el anticuerpo ki67, ya que en el caso de caspasa es necesario amplificar la señal.

Fragmento de caspasa 3: Se aplicaron tres lavados de 5 minutos con PBS-Tween 0.05% (permeabilización suave). Para amplificar la señal de caspasa 3, se utilizó un sistema de detección basado en estreptavidina/biotina (ABC modificado). Se procedió a inactivar la biotina endógena para que no interfiriera con la señal asociada al anticuerpo secundario. El bloqueo se realizó en dos etapas utilizando *Dako Avidin/Biotin Block* (X0590): primero los cortes fueron incubados con avidina (durante 15 minutos) que bloquea la biotina endógena, y a continuación fueron incubados con biotina (durante 15 minutos) que bloquea la avidina añadida. Tras tres lavados de 5 minutos con PBS-Tween 0.5%, las proteínas se bloquearon con suero de cabra al 5% diluido en PBS-Tween 0.5% durante 40 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se incubó con el anticuerpo primario (fragmento de caspasa 3, 1:200) en cámara húmeda durante 16-18 horas a 4°C. Los cortes fueron lavados tres veces con PBS-Tween 0.5% (5 minutos/lavado) e incubados con el anticuerpo secundario biotinilado diluido en suero de cabra al 5% diluido en PBS-Tween 0.5% (preparado según el kit de ABC de *Vectastain Elite*, Dako) durante 40 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Tras tres lavados de 5 minutos con PBS-Tween 0.5%, los cortes fueron incubados durante 20 minutos con el reactivo ABC de *Vectastain Elite* preparado con una gota de la solución A (estreptavidina) y una gota de la solución B (peroxidasa biotinilada) en 2.5 ml de PBS (preparado 30 minutos antes de su aplicación).

Ki67: Se aplicaron tres lavados de 5 minutos con PBS-Tween 0.05% (permeabilización suave). Para una permeabilización más intensa se aplicó un lavado más con PBS-Triton X-100 0.5% durante 20 minutos. El bloqueo se realizó con suero de cabra al 5% diluido en PBS-Tween 0.5% durante 1h a temperatura ambiente. Seguidamente, se incubó con el anticuerpo primario (Ki67 1:600) en cámara húmeda 16-18 horas a 4°C. Se realizaron tres lavados con PBS-Tween 0.5% (5 minutos/lavado) y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, Anti-Rabbit Ig-HRP (ThermoFisher), 1:350 diluido en suero de cabra al 5% diluido en PBS-Tween 0.5% durante 40 minutos en cámara húmeda. En este punto, se vuelven a encontrar los protocolos para los anticuerpos anti-caspasa 3 y anti-Ki67. Tras tres lavados de 5 minutos con PBS-Tween 0.05%, los cortes se incubaron con DAB (3,3'-diaminobenzidina, sustrato de la peroxidasa asociada al anticuerpo secundario que lleva asociado un cromógeno) durante 5 minutos para el fragmento de caspasa 3, y durante 2.5 minutos para Ki67 a temperatura ambiente (el DAB se utiliza siempre bajo campana de extracción de gases debido a su toxicidad). La reacción se paró realizando tres

lavados de 5 minutos con agua destilada. Para visualizar bien el tejido, se realizó una contraincubación con hematoxilina de Meyer durante 2 minutos a temperatura ambiente, y seguidamente se limpiaron con agua del frigo. Los cortes fueron deshidratados sumergiéndolos en alcoholes de graduación creciente: 70% (1x 3 minutos), 95% (2x 3 minutos), 100 % (3x 3 minutos), y con tres lavados de 10 minutos con xileno para eliminar el agua residual. Finalmente, las preparaciones se cubrieron con un cubreobjetos utilizando como medio de montaje DPX (Sigma). Estas preparaciones fueron conservadas a temperatura ambiente y visualizadas por microscopía de campo claro, utilizando un microscopio Nikon Eclipse 80i (Nikon) del *Institut de Neurociències UAB*.

9. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO. MICROARRAYS DE mRNA.

Para realizar el análisis transcriptómico se utilizaron dos líneas celulares de neuroblastoma quimiorresistentes, SK-N-BE(2) y CHLA-90, que fueron infectadas con tres lentivirus diferentes: shRNA control, shRNA-ERK5#1 y shRNA-ERK5#2. El análisis se realizó por triplicado para cada condición. Después de 72 h de infección, las células fueron lisadas y se extrajeron el ARN total utilizando el kit *RNeasy® Mini Kit* (Qiagen). A continuación se hibridaron 200 ng de ARN en los correspondientes *microarrays* utilizando el kit de etiquetado e hibridación terminal GeneChip WT (Affymetrix). Se utilizó el sistema de Clariom S Assay (Affymetrix), que permite el análisis de >20,000 genes humanos bien anotados, ya que sólo detecta los exones presentes en todos los transcritos expresados a partir de un solo *locus*. Los chips fueron procesados en una estación Affymetrix GeneChip Fluidics 450 y escáner 3000 de Affymetrix, y la normalización de los datos brutos (archivos CEL) se realizó con el algoritmo *Robust Multichip Average* (Irizarry et al., 2003). Para filtrar y realizar los análisis de expresión diferencial, se consideró un T-test moderado ($p < 0,05$) y un umbral de cambio (>33% de cambio reproducible).

El análisis de los componentes principales fue generado por el software Partek Genomics Suite 6.6 (Partek Inc). Las anotaciones funcionales de las listas de genes resultantes se realizaron utilizando las bases de datos KEGG (Kanehisa & Goto, 2000; Kanehisa et al., 2012) y Gene Set Enrichment Analyses (GSEA) (Subramanian et al., 2005). Los *heatmap* se generaron mediante la normalización de los valores de expresión de la mediana y la transformación de \log_2 , y se convirtieron en colores utilizando el software MultipleExperimentViewer (TM4, Saeed et al., 2003).

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis y procesado de imágenes fue realizado con los software Image J 1.51p 22 (Wayne Rasband, National Institutes of Health), GraphPad Prism v.8.02 y PowerPoint de Microsoft. La significancia estadística de los datos obtenidos fue determinada utilizando el programa GraphPad Prism v.8.02. Se utilizó el análisis de varianza ANOVA seguido por el test de corrección Tukey de comparaciones múltiples, o un test de t de Student bilateral. Para el cálculo de índice de combinación (CI) se utilizó el programa CompuSyn, basado en el método de Chou-Talalay (Chou, 2010). Se considera que existe una diferencia significativamente estadística cuando $P < 0.05$. Los grados de significancia se representarán como: * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

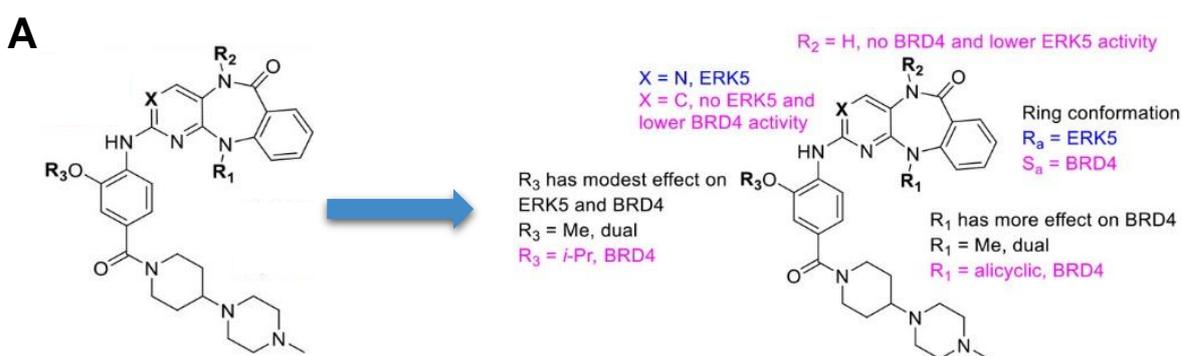
RESULTADOS

CAPÍTULO I

**ACTIVIDAD QUINASA DE ERK5: NUEVA DIANA PARA MODULAR LA
POLIFERACIÓN Y SUPERVIVENCIA DEL CÁNCER ENDOMETRIOIDE**

1. ANTECEDENTES. DESARROLLO DEL NUEVO INHIBIDOR DE ERK5 JWG-071.

Diversos grupos de investigación han puesto de manifiesto que un número significativo de inhibidores de proteínas quinasas ATP-competitivos presentan una importante inespecificidad, dado que son capaces de unirse al dominio de unión acetil-lisina de BRD4 (*Bromodomain-containing protein 4*) e inhibir su actividad. Éste es el caso de XMD8-92, que tiene una K_i para BRD4 similar a la que presenta para ERK5. Con la finalidad de obtener un inhibidor puro de ERK5 (sin actividad BRD4), se inició una colaboración con el grupo del Prof. N.S. Gray (Dana Farber Cancer Institute, MA, USA). Wang y colaboradores diseñaron una biblioteca de 40 compuestos, utilizando como andamiaje el grupo pirimido-benzodiazepinona del XMD8-92. La síntesis de estos inhibidores se realizó mediante análisis sistemático de la relación estructura-actividad, probando distintos sustituyentes en la posición R1, R2 y R3 (**Figura 13A**). Nuestro laboratorio se encargó de realizar la determinación de las respectivas IC_{50} (ensayos radiométricos utilizando ERK5 pura y ^{32}P -ATP), y EC_{50} (ensayos de actividad ERK5 en células HeLa). La **Figura 13B** recoge algunos de los 40 inhibidores generados con los distintos sustituyentes (R1, R2 y R3), así como los datos de afinidad de los distintos compuestos para las proteínas BRD4, ERK5 o LRRK2 (*Leucine-rich repeat kinase 2*, importante en el sistema nervioso y la mayor responsable de Parkinson hereditario). En esta tabla se pone de manifiesto que la introducción de un grupo voluminoso como el *sec*-butilo en posición R1 y un metilo en la posición R2 confiere especificidad para la inhibición de ERK5. De todos los compuestos estudiados, JWG-071 resultó ser el más específico, con una IC_{50} de 88 nM para ERK5, y de 6 μ M para BRD4. También se evaluó el efecto inhibitorio *in vitro* de JWG-071 a una concentración de 1 μ M en un panel de 468 quinasas humanas. JWG-071 inhibió completamente la actividad de dos proteínas quinasas: ERK5 y DCLK1 (*Doublecortin Like Kinase 1*). JWG-071 también inhibió un 70% la actividad LRKK2. En ensayos celulares, JWG-071 inhibió la actividad ERK5 con una EC_{50} de 20 nM, sin afectar a la actividad de BRD4 ($EC_{50} > 10 \mu$ M) (Wang et al., 2018).



B

Compound	R ₁	R ₂	R ₃	X	BRD4 IC ₅₀ (μ M)	ERK5 IC ₅₀ (μ M)	LRRK2 IC ₅₀ (μ M)	Cellular EC ₅₀ BRD4 (μ M)	Cellular EC ₅₀ ERK5 (μ M)
XMD11-50 (LRRK2-IN-1)	Me	Me	Me	N	0.703 \pm 0.01	0.114 \pm 0.011	0.034 \pm 0.002	1.989 \pm 0.299	0.16 \pm 0.04
JWG-048	Et	Me	Me	N	1.33 \pm 0.05	0.173 \pm 0.037	0.004 \pm 0.001	2.625 \pm 0.540	0.022 \pm 0.004
JWG-046	<i>i</i> -Pr	Me	Me	N	4.59 \pm 0.14	0.125 \pm 0.026	0.054 \pm 0.004	ND	0.014 \pm 0.004
JWG-071	<i>s</i> -Bu	Me	Me	N	5.42 \pm 0.18	0.088 \pm 0.005	0.109 \pm 0.014	>10	0.020 \pm 0.003
JWG-069	Cyclo butyl	Me	Me	N	0.201 \pm 0.007	0.075 \pm 0.009	0.021 \pm 0.001	0.116 \pm 0.001	0.019 \pm 0.005
XMD17-26	Cyclo pentyl	Me	Me	N	0.760 \pm 0.012	0.082 \pm 0.009	0.095 \pm 0.010	0.664 \pm 0.014	0.080 \pm 0.002
JWG-112	<i>s</i> -Bu	H	Me	N	25.7 \pm 1.8	>10	1.59 \pm 0.37	ND	ND
JWG-049	<i>i</i> -Pr	Me	Et	N	2.50 \pm 0.07	0.069 \pm 0.007	0.114 \pm 0.011	ND	0.025 \pm 0.007
JWG-114	<i>i</i> -Pr	Me	<i>i</i> -Pr	N	0.862 \pm 0.065	0.421 \pm 0.007	0.235 \pm 0.034	ND	ND
XMD17-109 (ERK5-IN-1)	Cyclo pentyl	Me	Et	N	0.217 \pm 0.008	0.162 \pm 0.006	0.171 \pm 0.030	ND	0.09 \pm 0.03
JWG-047	Cyclo pentyl	Me	<i>i</i> -Pr	N	0.135 \pm 0.004	0.160 \pm 0.008	0.296 \pm 0.031	0.465 \pm 0.012	0.032 \pm 0.009
AX15836	SO ₂ Me	Me	Et	N	>100	0.012 \pm 0.002	0.942 \pm 0.569	ND	0.036 \pm 0.004
DFCI-2-208	Me	Me	Me	C	5.21 \pm 0.14	>10	>10	ND	ND
JWG-115	Cyclo pentyl	Me	<i>i</i> -Pr	C	1.08 \pm 0.05	>10	>3.3	ND	ND
JQ-1					0.064	>10	>10	0.228	ND

Figura 13. Desarrollo de JWG-071, un nuevo inhibidor específico de ERK5 sin actividad BRD4. A, Estructura química del anillo pirimido-benzodiazepinona utilizado. Se marcan las principales modificaciones de los grupo R y X, y su impacto en la especificidad ERK5/BRD4. B, Tabla que muestra los valores de inhibición para BRD4, ERK5 y LRRK2 de los compuestos generados más destacados, tanto en ensayos *in vitro* utilizando proteína pura (IC₅₀) como en ensayos celulares (EC₅₀). JQ1, inhibidor específico de BRD4. Me, metil; Et, etil; Pr, prohil; Bu, butil. ND, no detectable.

La **Figura 14A** muestra la estructura química del JWG-071, donde se observa que se trata de un derivado del grupo pirimido-benzodiazepinona con un grupo sec-butilo en el anillo de 7 miembros, unido a una anilina, una piperidina y, finalmente, una piperazina. También se realizó *in silico* una simulación tridimensional de la unión de JWG-071 al centro activo de ERK5. Como se observa en la **Figura 14B**, el anillo pirimido-benzodiazepinona encaja perfectamente en el bolsillo del centro activo (dominio de unión al ATP), mientras que los dos anillos de metil-piperazina quedan excluidos. La **Figura 14C** muestra las correspondientes curvas dosis-respuesta de los ensayos radiométricos de inhibición *in vitro* para los compuestos JWG-071, AX-15836 (inhibidores puros de ERK5, Wang et al., 2018; Lin et al., 2016), respectivamente) y JQ-1 (inhibidor específico de BRD4, Wang et al., 2018. JWG-071 y AX-15836 presentaron unos valores de IC₅₀ de 91 y 14 nM, respectivamente, por lo que se catalogaron como inhibidores de ERK5. JQ-1 no afectó a la actividad de ERK5 (IC₅₀ > 10 μ M), confirmando que es un inhibidor específico de BRD4.

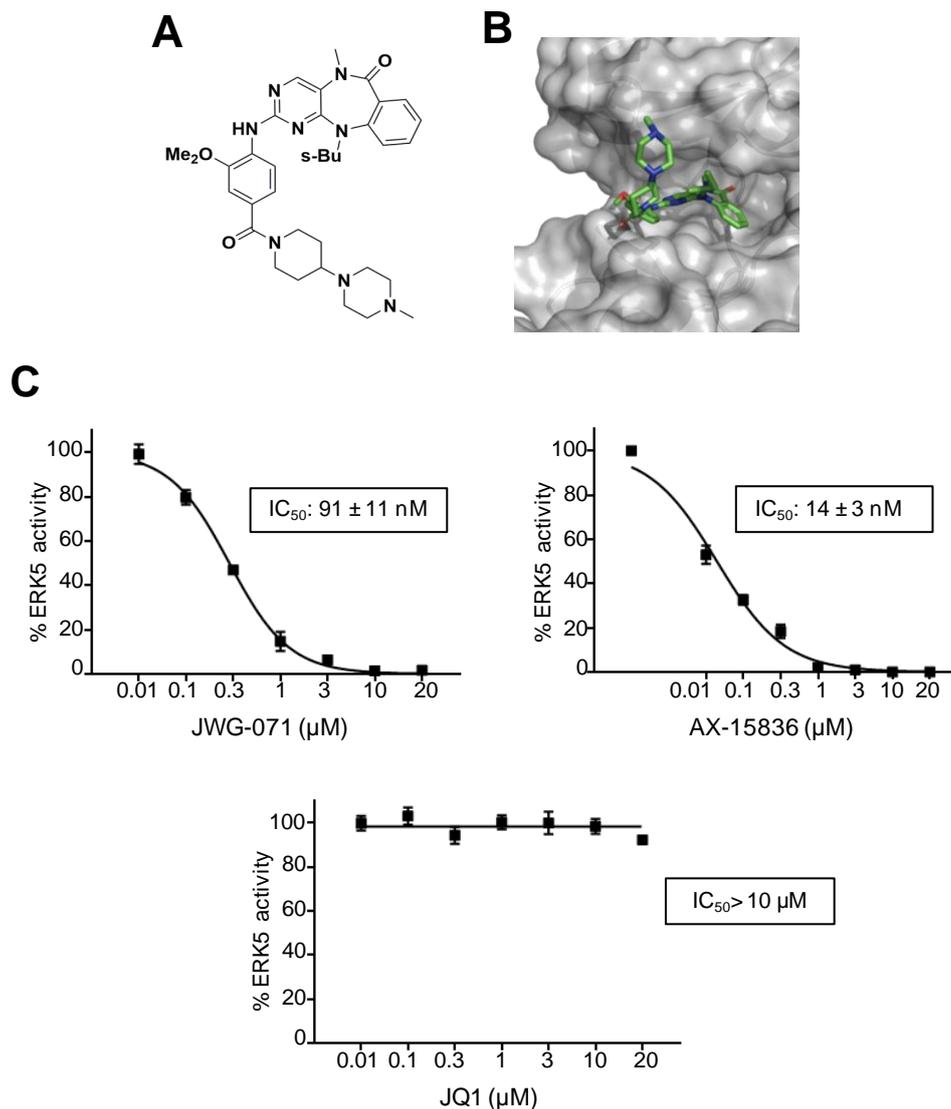


Figura 14. El nuevo inhibidor específico de ERK5, JWG-071. **A**, Estructura química del JWG-071. **B**, Modelo tridimensional de la unión de JWG-071 al centro activo de ERK5. **C**, Ensayos radiométricos de actividad quinasa de ERK5. La actividad ERK5 se determinó utilizando 200 ng de ERK5 y 0.1 mM ^{32}P -ATP- Mg^{2+} y 200 mM PIMtide como sustratos, según el protocolo descrito en la sección de Materiales y Métodos. En los casos indicados, se incubó con las concentraciones indicadas de los inhibidores de ERK5 JWG-071, AX-15836, o el inhibidor de Brd4 JQ1.

2. DESARROLLO PRECLÍNICO DEL JWG-071. EFECTO SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

2.1. JWG-071 inhibe la proliferación celular basal de células de cáncer ginecológico.

Evidencias experimentales apuntan a que ERK5 mediaría en la proliferación en cáncer, debido a que la inhibición de ERK5 tiene un efecto antiproliferativo en una amplia variedad de líneas celulares tumorales (revisado en Gomez et al., 2016). Sin embargo, la mayoría de estas observaciones fueron realizadas utilizando el inhibidor XMD8-92. Dado que XMD8-92 también afecta a BRD4 (una proteína que regula la

proliferación de la célula tumoral, (Tanaka et al., 2016)), numerosos autores han cuestionado recientemente el papel de ERK5 en la proliferación celular. La obtención de JWG-071, un inhibidor de ERK5 sin actividad BRD4, nos permitió abordar este punto.

Se realizaron ensayos de proliferación celular mediante tinción de cristal violeta. JWG-071 inhibió la proliferación basal de células Ishikawa (carcinoma endometrial) y HeLa (carcinoma de cérvix) con una IC₅₀ de 5 y 7,5 μM, respectivamente (**Figura 15A**). También se realizaron ensayos de formación de colonias (clonogénicos) a 14 días, que permitieron evaluar la capacidad de las células de dividirse y formar colonias. JWG-071 inhibió eficientemente la formación de colonias de células Ishikawa y HeLa con una IC₅₀ de 7 y 5 μM, respectivamente (**Figura 15B**).

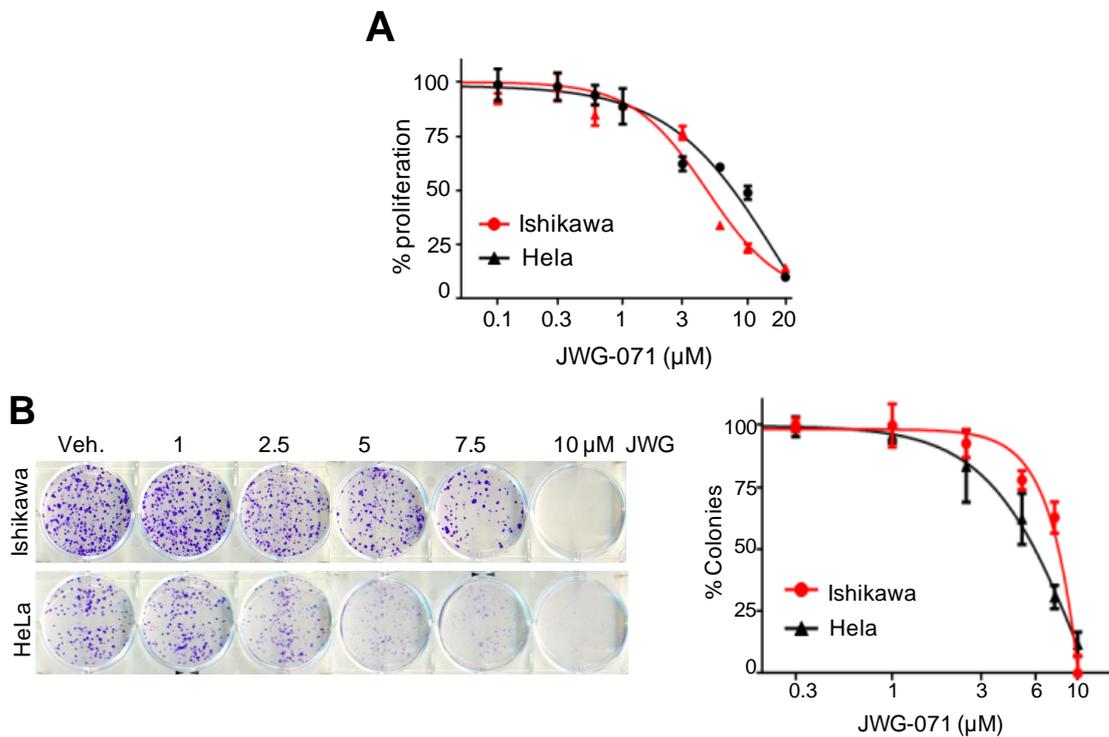


Figura 15. El inhibidor específico de ERK5 JWG-071 inhibe la proliferación de líneas tumorales humanas. A, Ensayo de proliferación (cristal violeta). Células HeLa o Ishikawa fueron tratadas durante 48 horas con JWG-071 a las concentraciones indicadas. Los valores corresponden a las medias \pm SD de ensayos realizados en cuatuplicado, y representativo de tres experimentos independientes. **B,** Ensayo de formación de colonias. Células HeLa (800/pocillo) o Ishikawa (1,000/pocillo) fueron sembradas e incubadas en medio completo y tratadas con JWG-071 a las concentraciones indicadas durante 14 días. Las colonias fueron visualizadas mediante tinción con cristal violeta (panel izquierdo) y cuantificadas (panel derecho). Se muestran los valores medios \pm SD de ensayos realizados en triplicado.

Estos resultados fueron confirmados mediante ensayos de incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) por citometría de flujo, que permiten cuantificar las células en proliferación. JWG-071 redujo en un 25% la proliferación de células Ishikawa (**Figura 16A**). De acuerdo con estos resultados, la incubación de células Ishikawa con JWG-071 resultó en una reducción de los niveles de ciclina D3 y de quinasas CDK4 y CDK6, y en un aumento de los niveles del inhibidor de ciclinas p21 (**Figura 16B**), lo que indica que la inhibición de ERK5 compromete la transición de la fase G1 a S del ciclo celular, como se ha reportado para cáncer de mama (Perez-Madriral et al., 2012). Estos resultados, en su conjunto, demuestran que ERK5 media la proliferación basal del cáncer ginecológico endometrial y cervical.

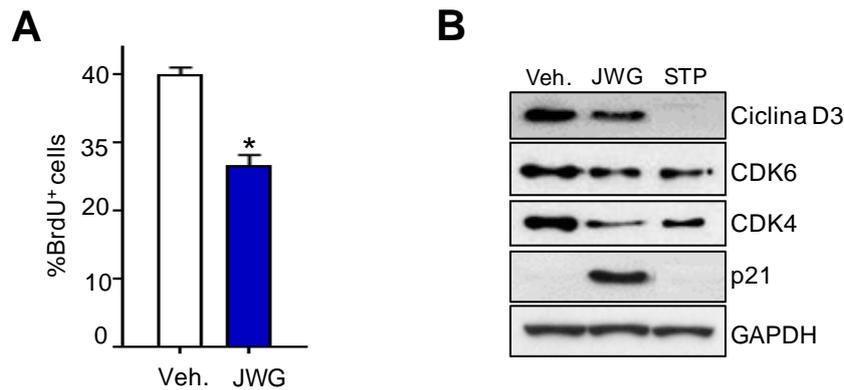


Figura 16. JWG-071 inhibe la proliferación de líneas tumorales humanas. **A**, Ensayo de proliferación (incorporación con BrdU). Células Ishikawa fueron tratadas con vehículo (Veh.) o JWG-071 10 μ M. 24 horas después se incubaron con BrdU durante 16 horas, y la incorporación de BrdU fue monitorizada mediante citometría de flujo utilizando anticuerpo anti-BrdU, según el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Se muestra el porcentaje de células BrdU positivas obtenido en dos experimentos diferentes (media \pm SD). * $P < 0.05$ **B**, Células Ishikawa fueron tratadas con vehículo (Veh.), JWG-071 10 μ M (JWG) o estaurosporina 1 μ M (STP) durante 24 h. Las células fueron lisadas y se analizó por inmunoblot los niveles de proteínas de ciclo celular ciclina D3, CDK6, CDK4 y p21. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes.

2.2. JWG-071 inhibe la proliferación inducida por EGF en células de cáncer ginecológico.

En uno de los primeros trabajos realizados sobre la funcionalidad de ERK5, Kato y colaboradores demostraron que la actividad quinasa ERK5 mediaba en el aumento de proliferación inducido por el factor de crecimiento epidérmico EGF (Kato et al., 1998). Para ello, los autores utilizaron un mutante dominante negativo de ERK5, pero no realizaron experimentos farmacológicos o de silenciamiento. En este trabajo, hemos estudiado el efecto del inhibidor JWG-071 en la proliferación celular inducida por EGF. Para ello, se utilizaron como modelo las líneas celulares HeLa e Ishikawa, procedentes de carcinomas cuya proliferación depende de la señalización de EGF (Berkers et al., 1991; Gong et al., 1991).

En primer lugar, se analizó si el JWG-071 era capaz de inhibir la activación de ERK5 mediada por EGF. La activación del ERK5 puede ser monitorizada mediante ensayos de inmunoblot. ERK5 activa se autofosforila en su cola C-terminal en múltiples sitios, lo que resulta en la aparición de una banda superior (~130 kDa) correspondiente a la proteína activa hiperfosforilada. En la **Figura 17A** se muestra cómo la estimulación con EGF induce una activación de ERK5, reflejada con la aparición de una segunda banda con retraso electroforético. Esta banda fue inhibida completamente al incubar con una concentración de 0.3 μ M de JWG-071. Los correspondientes valores de EC_{50} fueron de 61 nM (HeLa) y 47 nM (Ishikawa). JWG-071 no afectó a la fosforilación de ERK1/2 inducida por EGF, indicando que la acción inhibitoria del JWG-071 sobre la proliferación inducida por EGF es específica de ERK5. A continuación, se realizaron ensayos de conteo celular. Tanto JWG-071 como el inhibidor específico de ERK5 AX-15836 abolieron el aumento de proliferación inducido por EGF en ambas líneas celulares (**Figura 17B**). Estos resultados, en su conjunto, reflejan que la inhibición específica de ERK5 compromete la proliferación inducida por EGF en carcinomas ginecológicos.

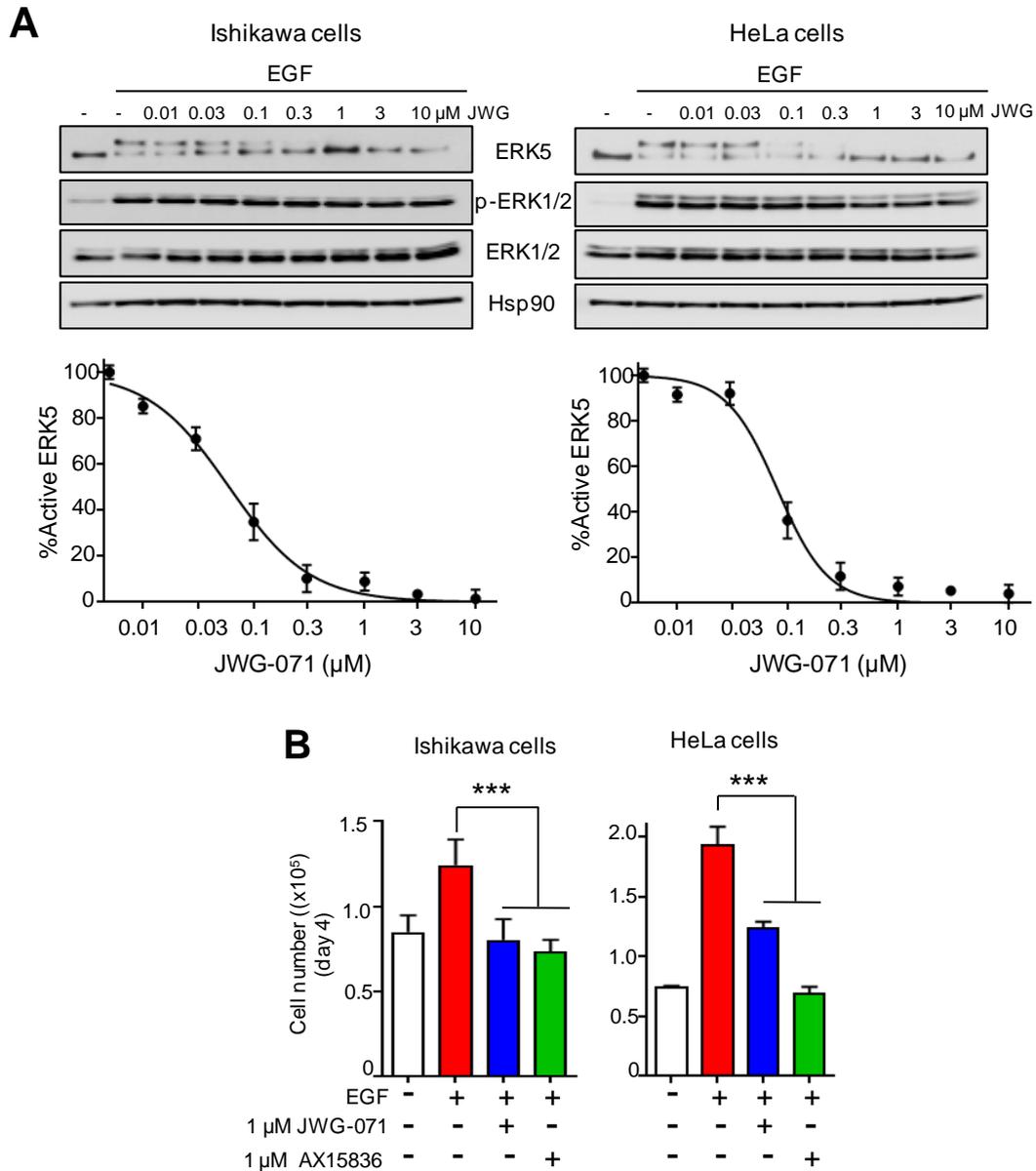


Figura 17. Los inhibidores específicos de ERK5 JWG-071 y AX15836 inhiben la activación de ERK5 y la proliferación celular inducida por EGF. A, Células Ishikawa o HeLa fueron pretratadas 1 h con JWG-071 a las concentraciones indicadas, y estimuladas con 100 ng/ml de EGF durante 20 minutos, según se describe en la sección Materiales y Métodos. Las células fueron lisadas y se analizó por inmunoblot los niveles de ERK5, pERK1/2, ERK1/2 y Hsp90 (control de carga). Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes. Las curvas inferiores corresponden a la cuantificación de los niveles de ERK5 activa (banda electroforética superior), que fueron normalizados respecto a los niveles de Hsp90. Cada punto es la media \pm SD de tres experimentos independientes. **B,** Ensayo de proliferación mediante conteo de células. Células Ishikawa y HeLa fueron pretratadas 24h con 1 μ M de JWG-071 o de AX15836, y estimuladas con vehículo (Veh.) o con 100 ng/ml de EGF. A los 4 días, las células fueron levantadas y contadas utilizando *Tripán Blue* y un contador de células automático según lo descrito en Materiales y Métodos. Se muestra el índice de proliferación a día 4, determinado dividiendo el número de células a día 4 entre el número de células a día 0. Se muestran los valores medios \pm SD de tres experimentos independientes, realizados en cuatuplicado. *** $P < 0.001$

Como se ha indicado en la sección de Introducción, la activación de ERK5 conlleva su translocación nuclear y la consecuente activación de factores de transcripción implicados en la proliferación, como el factor AP-1 (Terasawa et al., 2003; Morimoto et al., 2007). Con el fin de evaluar el papel de JWG-071 en la translocación nuclear de ERK5 inducida por EGF, se realizaron experimentos de fraccionamiento subcelular. La incubación con 100 ng/ml EGF durante 30 min resultó en la fosforilación de las poblaciones citosólica y nuclear de ERK5, mientras que la preincubación con JWG-071 no sólo inhibió la activación de ERK5 inducida por EGF, sino que resultó en una drástica bajada de la población nuclear de ERK5 (**Figura 18A**). Estos resultados demuestran que el JWG-071 inhibe la translocación nuclear de ERK5 inducida por EGF.

En paralelo se realizaron ensayos de gen reportero con la finalidad de valorar el efecto de JWG-071 sobre la actividad transcripcional de AP-1, un factor de transcripción regulado por ERK5 y que media en la proliferación celular inducida por EGF (Kato et al., 1998). Como se esperaba, la sobreexpresión de MEK5-DD (una forma constitutivamente activa de MEK5) y ERK5 en células HeLa resultó en un aumento de ~12 veces de la actividad transcripcional de AP-1, que se vio reducida significativamente en respuesta al tratamiento con JWG-071 3 μ M (**Figura 18B**).

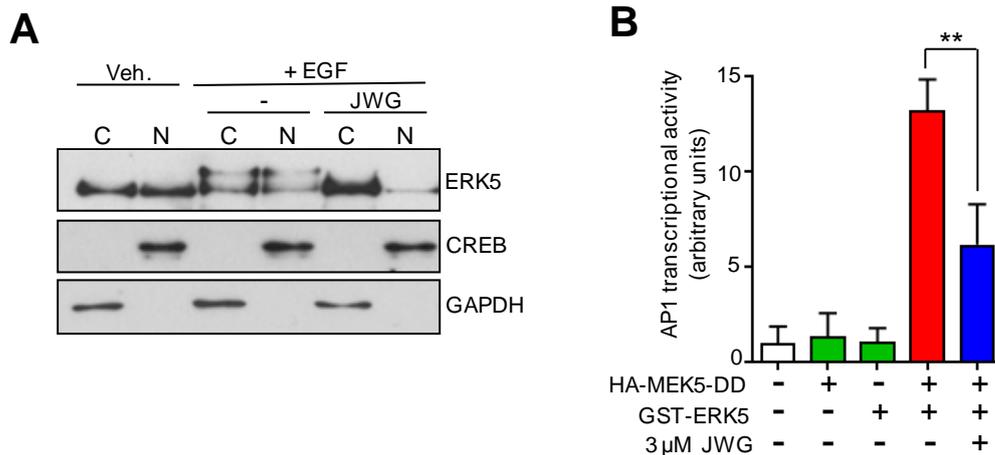


Figura 18. JWG-071 previene la translocación nuclear de ERK5 inducida por EGF, y reduce la actividad transcripcional de AP-1 mediada por ERK5 activa. **A**, Fraccionamiento subcelular de células HeLa. Se prepararon fracciones citosólicas (C) y nucleares (N) de células HeLa tratadas 1 hora con vehículo (Veh.) o con 3 μ M JWG-071 (JWG), previa estimulación con vehículo (Veh.) o 100 ng/ml de EGF durante 20 minutos, según se describe en la sección Materiales y Métodos. La localización de ERK5 en cada condición se analizó mediante inmunoblot. Las proteínas GAPDH y CREB fueron utilizadas como marcadores de la fracción citosólica y nuclear, respectivamente. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes. **B**, Ensayo de actividad transcripcional de AP-1. Células HeLa fueron co-transfectadas con los vectores AP1-luciferasa, pRL-CMVRenilla y los vectores indicados. 24 horas post-transfección las células fueron tratadas con 3 μ M JWG-071. 24 horas después, las células fueron lisadas y se determinó la actividad luciferasa mediante ensayo gen reportero usando el kit *Dual Luciferase Reporter Assay* de Promega. Se muestran los valores medios \pm SD de cuatro experimentos diferentes, realizados en duplicado y normalizado utilizando los valores de la Renilla. ** $P < 0.005$

Por último, y con la finalidad de obtener evidencias genéticas del papel de la actividad de ERK5 en la proliferación de células tumorales en respuesta a EGF, se utilizaron células Ishikawa estables que carecen del gen que codifica para MEK5, la única quinasa activadora de ERK5. Estas células fueron generadas en nuestro laboratorio por Sergio Espinosa, mediante tecnología CRISPR/Cas9 y utilizando un kit comercial de

Santa Cruz Technology y selección con puomicina (ver Material y Métodos). Como era de esperar, las células control Ishikawa MEK5^{+/+} mostraron una activación aguda de ERK5 (banda electroforética retrasada) a los 20 minutos, que desapareció completamente a los 60 minutos. Sin embargo, las células Ishikawa CRISPR/Cas9 MEK5^{-/-} no mostraron activación de ERK5 en respuesta a EGF (**Figura 19A**). Esta ausencia de activación no se debió a un defecto en la activación del receptor del EGF, puesto que la MAP quinasa clásica ERK1/2, AKT y la proteína ribosomal S6 (sustrato de mTORC1) resultaron normalmente activadas/fosforiladas en las células MEK5^{-/-} estimuladas con EGF (**Figura 19A**). En paralelo, se llevó a cabo un ensayo de proliferación mediante contaje celular en respuesta a EGF en estas células. Como era de esperar, las células MEK5^{+/+} control mostraron una tasa de proliferación basal más alta y un incremento de ~2 veces del índice de proliferación en respuesta a la estimulación con EGF. Las células carentes de MEK5 (MEK5^{-/-}) presentaron una tasa de proliferación basal baja en comparación con las células MEK5^{+/+} control, y su ratio de proliferación no aumentó en respuesta a EGF (**Figura 19B**). Estos resultados, en su conjunto, permiten concluir que ERK5 media en la proliferación basal e inducida por EGF, en células tumorales derivadas de carcinomas ginecológicos.

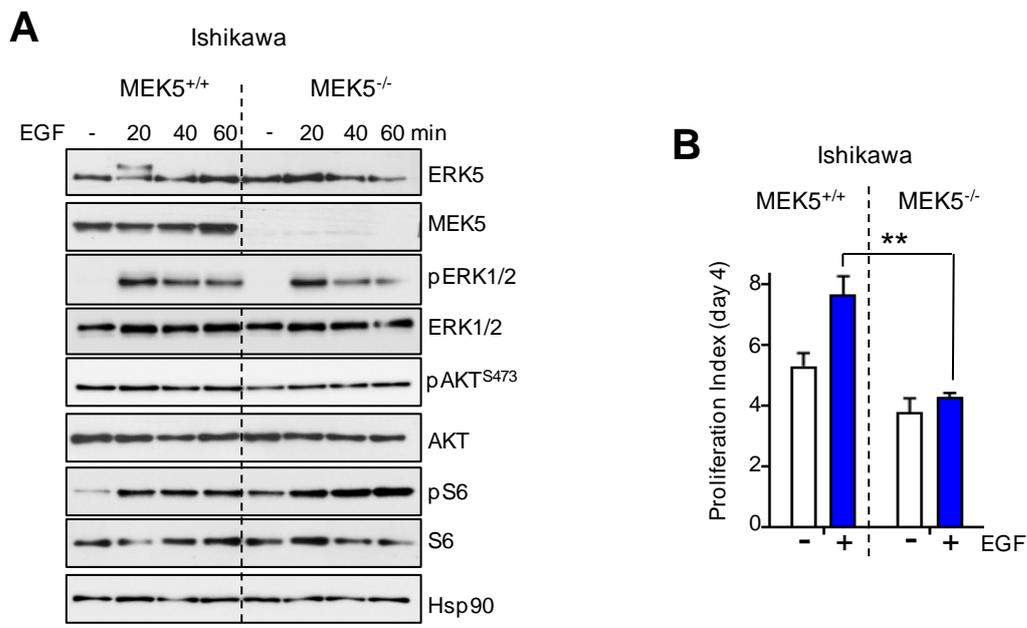


Figura 19. Las células MEK5 CRISPR/Cas9 KO no muestran activación de ERK5 en respuesta a EGF. A, Células Ishikawa MEK5^{+/+} y MEK5^{-/-} fueron estimuladas con 100 ng/ml de EGF durante 20, 40 y 60 minutos., y los niveles de las proteínas indicadas se monitorizaron mediante inmunoblot. Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos independientes. **B,** Ensayo de contaje celular. Células Ishikawa MEK5^{+/+} y MEK5^{-/-} fueron estimuladas con vehículo (Veh.) o con 100 ng/ml de EGF. A los 4 días, las células fueron levantadas y contadas utilizando *Tripan Blue* y un contador de células automático según lo descrito en Materiales y Métodos. El índice de proliferación a día 4 fue determinado dividiendo el número de células a día 4 entre el número de células a día 0. Se muestran los valores medios ± SD de tres experimentos independientes, realizados en cuatuplicado. ** p < 0.05

2.3. La inhibición farmacológica (JWG-071) o genética (células CRISPR-MEK5^{-/-}) de la actividad quinasa de ERK5 reduce la proliferación celular *in vivo*.

Los resultados obtenidos utilizando líneas celulares tumorales nos animaron a realizar los correspondientes ensayos *in vivo*. Durante el desarrollo preclínico de un fármaco es importante demostrar su eficacia *in vivo*, en modelos de animales. En primer lugar, se realizó el estudio farmacocinético de JWG-071 en ratones Swiss albino. El fármaco JWG-071 presenta muy buena biodisponibilidad (84%), así como una rápida absorción (T_{max} 1 hora), un pico de concentración elevado (C_{max} : 2169 ng/ml para PO y C_{max} : 315 ng/ml para IV), una vida media $T_{1/2}$ de 4.34 horas, un amplio volumen de distribución (V_{ss} : 3.35 L/kg) y un ratio de eliminación de 10.03 mL/min/kg (**Figura 20A**). Las **Figuras 20B y 20C** muestran la concentración de JWG-071 en plasma sanguíneo respecto al tiempo después de una administración intravenosa u oral. En ambos casos, se observa una gran área bajo la curva lo que corresponde a una concentración de fármaco elevada a lo largo del tiempo (AUC: 18,252 para PO y 2,186 para IV). Estos datos reflejan que JWG-071 posee unos excelentes parámetros farmacodinámicos.

A

Parameter	Unit	IV	PO
Dose	mg·kg ⁻¹	1	10
T_{max}	hr	-	1.00
^a C_o/C_{max}	ng mL ⁻¹	315.93	2169.72
AUC _{last}	hr*ng mL ⁻¹	2148.04	18132.64
AUC _{inf}	hr*ng mL ⁻¹	2186.19	18252.53
$T_{1/2}$	hr	4.34	-
CL	mL min ⁻¹ kg ⁻¹	10.03	-
V_{ss}	L kg ⁻¹	3.35	-
F^b	%	-	84

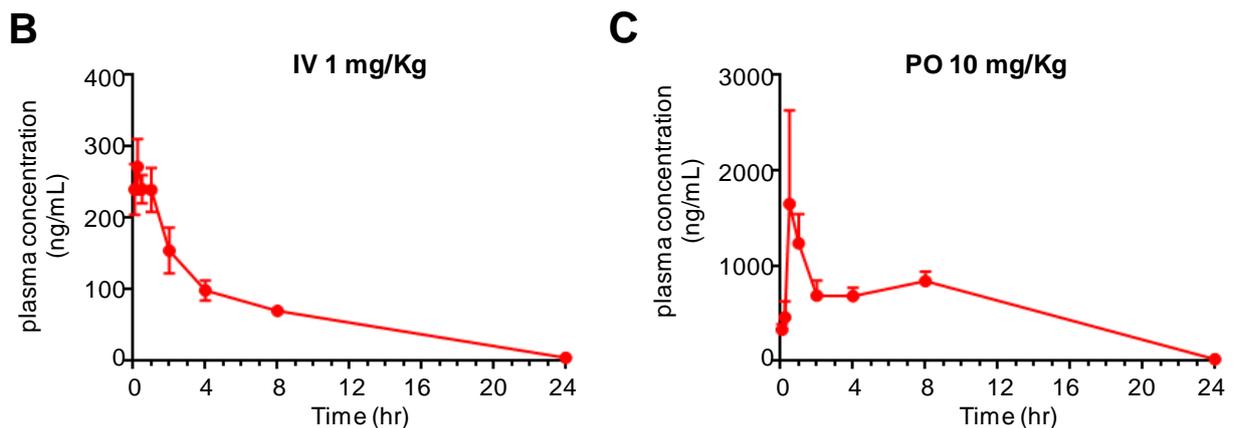


Figura 20. El inhibidor específico de ERK5 JWG-071 presenta óptimos parámetros farmacocinéticos. A, Tabla resumen de los parámetros farmacocinéticos de JWG-071 en ratones macho Swiss albino. T_{max} , tiempo en el que se alcanza la concentración máxima (C_{max}). AUC. Área debajo de la curva. $T_{1/2}$, vida media en plasma. CL, volumen de aclaramiento plasmático. F^b , biodisponibilidad oral. IV, intravenoso; PO, oral. **B-C,** Cinética de la concentración de JWG-071 en plasma después de inyección intravenosa (B) o administración oral (C).

Con el objetivo de evaluar el efecto anti-proliferativo y la toxicidad de JWG-071 en modelos animales, se llevó a cabo un ensayo en ratones atímicos *nude*. Estos ratones fueron inyectados subcutáneamente con 4×10^6 células Ishikawa. Cuando los tumores alcanzaron un volumen aproximado de 100 mm^3 , se trataron diariamente con vehículo (β -ciclodextrina) o JWG-071 por vía intraperitoneal durante 7 días, con la idea de analizar el efecto anti-proliferativo del JWG-071. Para analizar el posible efecto tóxico del JWG-071 se realizó un seguimiento del peso corporal de los ratones (Figura 21A). Se comprobó que el JWG-071 a la dosis utilizada (50 mg/Kg) no genera toxicidad. Este hecho fue corroborado con la inspección ocular de los tejidos (necropsia), que no mostraron signo alguno de alteración. La Figura 21B muestra que el JWG-071 administrado a diario por vía intraperitoneal reduce significativamente el crecimiento de los tumores *xenografts* de células Ishikawa. Los tumores obtenidos a tiempo final (7 días) fueron analizados mediante tinción inmunohistoquímica del marcador de proliferación Ki67. La cuantificación de la tinción obtenida de cortes representativos de los tumores mostró que el tratamiento con JWG-071 resulta en una reducción significativa de la expresión proteica de Ki67 (Figura 21C). Estos resultados muestran que la inhibición farmacológica de ERK5 tiene un efecto anti-proliferativo *in vivo*, en tumores *xenografts* humanos de carcinoma de endometrio.

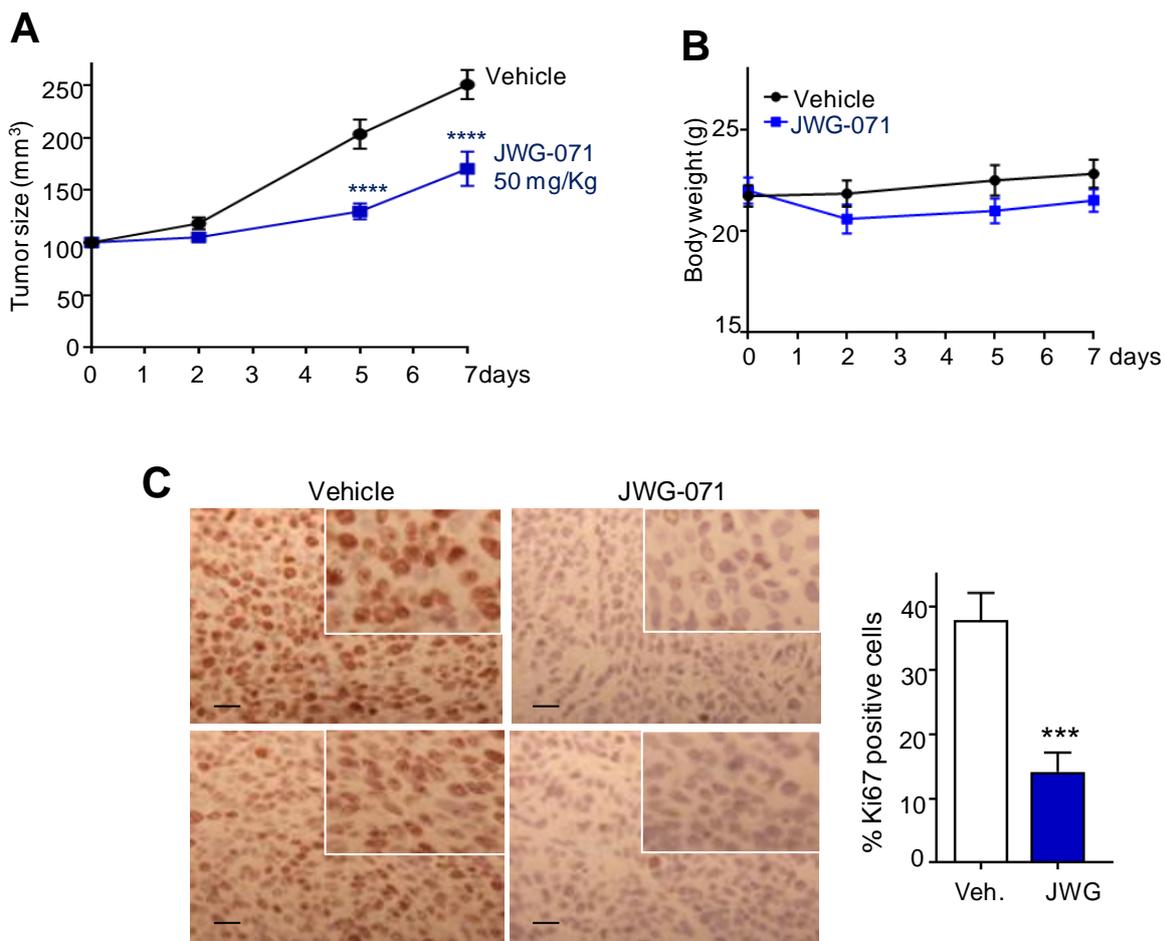


Figura 21. JWG-071 inhibe el crecimiento de tumores *xenografts* de cáncer endometrioide. **A**, Curva de crecimiento tumoral. Ratones atímicos *nude* fueron inyectados subcutáneamente con 4×10^6 células Ishikawa. Cuando los tumores alcanzaron un volumen aproximado de 100 mm^3 , se trataron diariamente con vehículo (β -ciclodextrina) o JWG-071 por vía intraperitoneal. **B**, Curva de variación del peso de los ratones. N = 6 para cada condición. Se muestran los valores medios \pm SEM. Se obtuvieron datos de la medida tumoral y del peso cada dos

días. **C**, La expresión del marcador de proliferación celular Ki67 en los tumores fue determinada mediante tinción inmunohistoquímica. Imágenes representativas de dos tumores diferentes para cada condición. Barra de escala, 100 μm . El histograma muestra la cuantificación de 4 campos por tumor, y un total 6 tumores por grupo. Los resultados son la media \pm SD. *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ de los tumores tratados frente al vehículo.

A continuación, se estudió el papel de ERK5 en la proliferación celular basal mediante una aproximación genética, utilizando las células Ishikawa MEK5^{+/+} y MEK5^{-/-} generadas en el laboratorio. Se llevaron a cabo ensayos de proliferación mediante conteo de células a diferentes días de incubación. La curva de crecimiento de las células MEK5^{-/-} mostró una reducción significativa en el número de células, en comparación con las células MEK5^{+/+} (**Figura 22A**). En paralelo, se realizó un ensayo de formación de colonias de estas células. La **Figura 22B** muestra imágenes representativas de cada línea celular, teñidas con cristal violeta, donde se aprecia una reducción significativa (50%) en el número de colonias generadas por las células MEK5^{-/-}, en comparación con las células control MEK5^{+/+}.

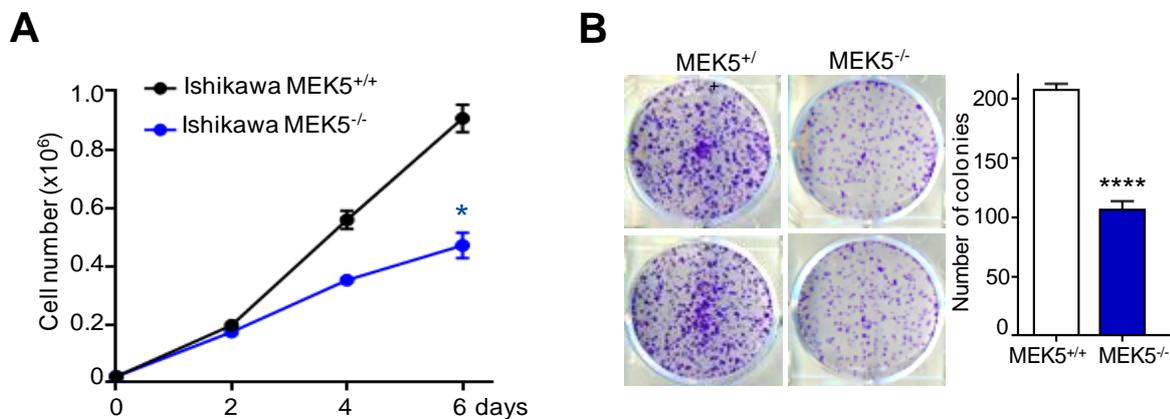


Figura 22. La depleción genética de MEK5 resulta en una menor proliferación basal de células Ishikawa. **A**, Ensayo conteo celular. Células Ishikawa MEK5^{+/+} y MEK5^{-/-} fueron sembradas, y las células viables fueron contadas a 24h post-siembra (día 0), ó 2,4 o 6 días después. Se muestran los valores medios \pm SD de dos experimentos independientes, realizados en cuatuplicado. **B**, Ensayo de formación de colonias. Células Ishikawa MEK5^{+/+} y MEK5^{-/-} (1000/pocillo) fueron sembradas e incubadas en medio completo durante 14 días. Las colonias fueron visualizadas mediante tinción con cristal violeta (panel izquierdo) y cuantificadas (panel derecho). El histograma muestra los valores medios de número de colonias \pm SD. Ensayos realizados en cuatuplicado. * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$

Los resultados obtenidos en modelos celulares fueron validados *in vivo* utilizando modelos de tumores *xenografts* de las líneas Ishikawa MEK5^{+/+} y MEK5^{-/-}. Ratones hembra atímicos *nude* fueron inyectados subcutáneamente con 4×10^6 de células Ishikawa MEK5^{+/+} o MEK5^{-/-}, y el crecimiento tumoral fue monitorizado durante 21 días. Los tumores *xenografts* de células MEK5^{-/-} mostraron una reducción significativa (85%) del crecimiento, con respecto a los tumores de células MEK5^{+/+} (**Figura 23A**). La **Figura 23B** muestra imágenes representativas de los tumores recogidos, donde se observa que los tumores *xenografts* de células MEK5^{-/-} presentan un menor tamaño que los procedentes de células MEK5^{+/+}. El crecimiento de estos tumores no afectó al peso corporal de los animales (**Figura 23C**). Por último, el correspondiente análisis inmunohistoquímico de los tumores demostró una reducción en la tinción del marcador de proliferación Ki67 en los tumores MEK5^{-/-}, indicando una menor tasa de proliferación (**Figura 23D**). Estos resultados, en su conjunto, demuestran que ERK5 juega un papel clave en la proliferación del carcinoma endometriode, tanto en líneas celulares como *in vivo*.

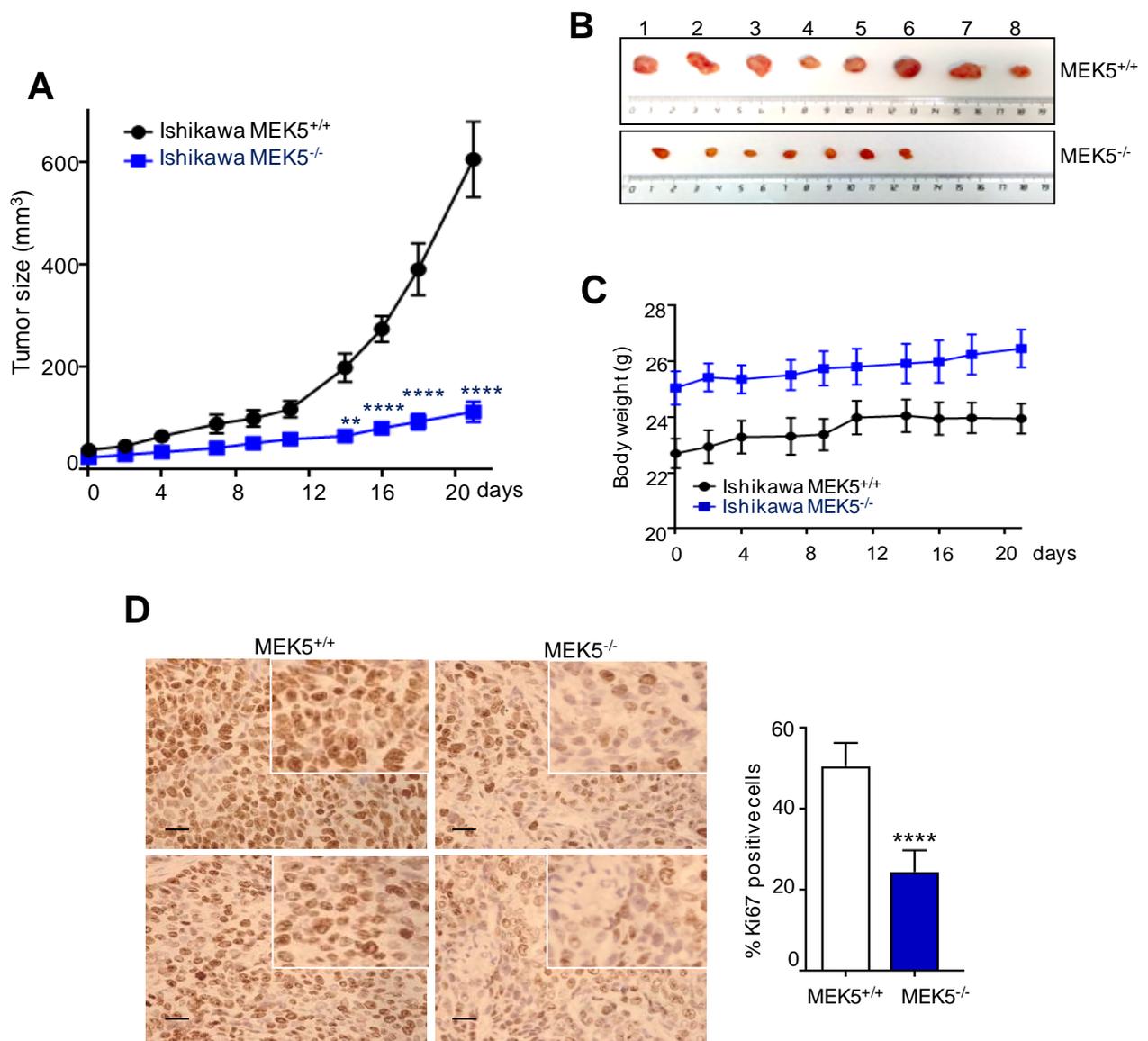


Figura 23. La depleción genética de MEK5 reduce el crecimiento de tumores *xenografts* humanos de endometrio. **A**, Curva de crecimiento tumoral. Se inyectaron subcutáneamente 4×10^6 células Ishikawa MEK5^{+/+} o MEK5^{-/-} en ratones atímicos *nude*. **B**, Imagen de los tumores extraídos de cada grupo. **C**, Curva de variación del peso de los ratones. Se obtuvieron datos de la medida tumoral y del peso cada dos días. N=8 para MEK5^{+/+} y N=7 para MEK5^{-/-}. **D**, Tinción inmunohistoquímica de Ki67 de los tumores *xenografts* de células Ishikawa MEK5^{+/+} y MEK5^{-/-}. Se muestra la tinción de dos tumores representativos. Barra de escala, 100 μ m. El histograma muestra la cuantificación de 4 campos por tumor, y un total 8 tumores (MEK5^{+/+}) o 7 tumores (MEK5^{-/-}). Los resultados son la media \pm SD. *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ de los tumores MEK5^{-/-} frente a los MEK5^{+/+}

3. DESARROLLO PRECLÍNICO DEL JWG-071. EFECTO CITOTÓXICO EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER GINECOLÓGICO HUMANO.

3.1. La inhibición de ERK5 compromete la viabilidad celular e induce apoptosis *in vitro*.

Con la finalidad de caracterizar la posible acción citotóxica del compuesto JWG-071, se optó por modelos de cáncer ginecológico en los que no se ha descrito el rol de ERK5 en su progresión y/o supervivencia. Específicamente, este trabajo se centra en modelos de cáncer endometrial y, en menor medida, de cáncer cervical; dos tipos tumorales que suelen concurrir con sobreexpresión del receptor de EGF (EGFR).

Con el fin de caracterizar el papel de ERK5 en carcinoma de endometrio y de cérvix, en primer lugar se llevó a cabo un estudio de los niveles de expresión de ERK5. La búsqueda bibliográfica en la base de datos de cánceres humanos *the Human Protein Atlas* reveló una alta expresión de la proteína ERK5 en cáncer de endometrio. La mayoría de las muestras clínicas de este tipo tumoral presentan niveles significativamente elevados de ERK5 en comparación con otros tipos de tumores, como cáncer de pulmón o melanoma (**Figura 24**). Con respecto al cáncer de cérvix, los datos recogidos en esta base de datos revelan unos niveles de expresión de ERK5 entre medios y altos en la mayoría de las muestras clínicas analizadas (**Figura 24**).

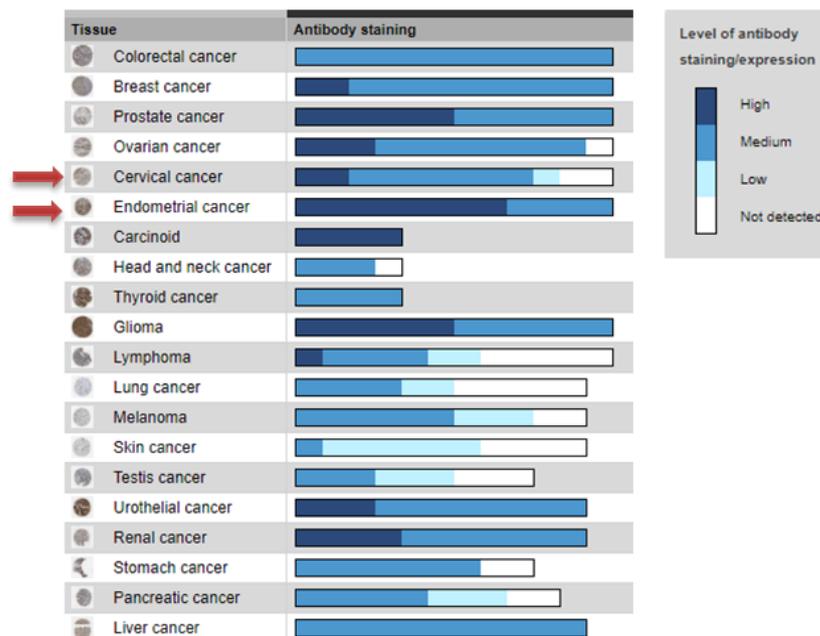


Figura 24. Expresión de la proteína ERK5 en diferentes cánceres humanos. Niveles de expresión de la ERK5 medidos por tinción inmunohistoquímica en muestras de pacientes oncológicos. Extraído de <https://www.proteinatlas.org>.

En paralelo se evaluaron los niveles de mRNA de ERK5. Para ello, se utilizó la base de datos cBioportal. Las correspondientes representaciones Kaplan-Meier, que muestran la supervivencia global de pacientes oncológicos en función de niveles de mRNA de ERK5 bajos o altos, sugieren que la sobreexpresión de ERK5 correlaciona con una menor supervivencia en cáncer endometrial y cervical (**Figura 25**).

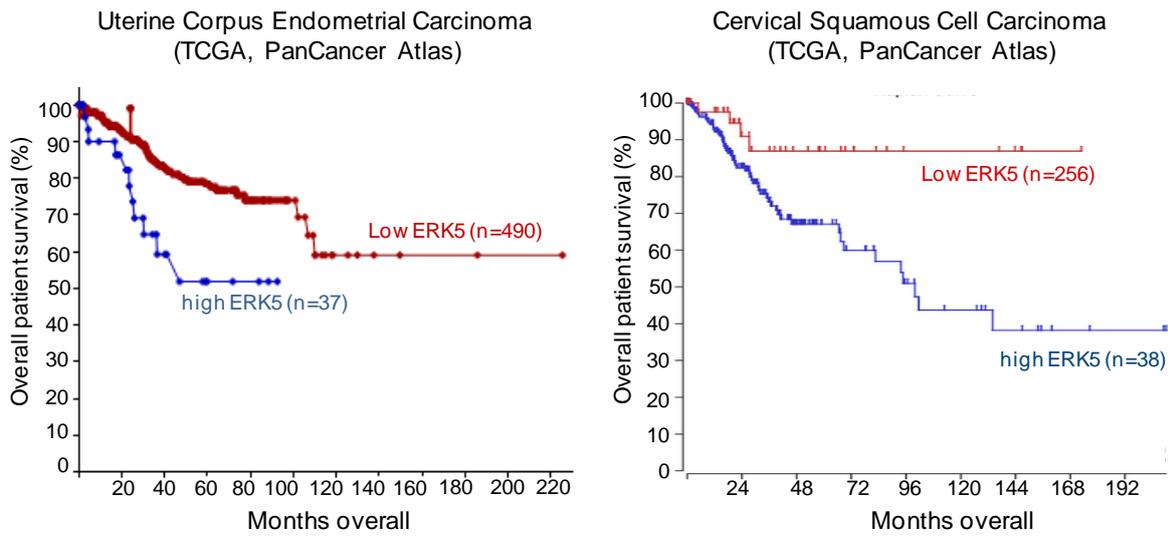
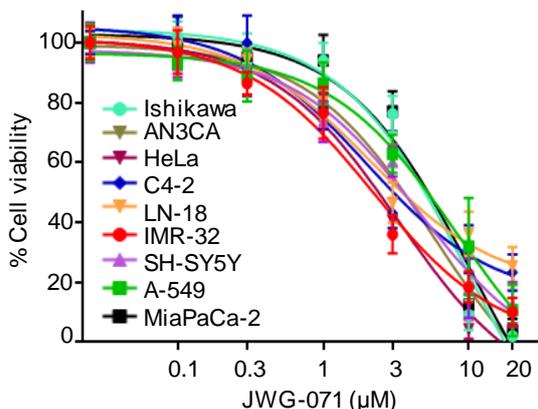


Figura 25. La sobreexpresión de ERK5 correlaciona con una menor supervivencia en pacientes de carcinoma endometrial y cervical. Representación Kaplan-Meier que muestra la supervivencia global de pacientes con cáncer de endometrio (**panel izquierdo**) o cáncer cervical (**panel derecho**), en función de una expresión de mRNA normal (rojo) o alta (azul) para ERK5. Cáncer de endometrio: 490 pacientes con ERK5 normal; 37 pacientes con elevada ERK5. Cáncer de cérvix: 256 pacientes con ERK5 normal; 38 pacientes con elevada ERK5. Datos obtenidos de *cBioportal for cancer genomics* (<https://www.cbioportal.org/>).

Con el objetivo de caracterizar el inhibidor específico de ERK5 JWG-071, se decidió evaluar el efecto de la inhibición de ERK5 sobre la viabilidad de un amplio espectro de líneas tumorales humanas de distinta estirpe (**Figura 26**). En paralelo, se estudió también el efecto citotóxico del inhibidor de ERK5 XMD8-92, utilizado hasta la fecha por numerosos autores (Yang et al., 2010) en las mismas líneas tumorales con el fin de comparar ambos inhibidores. A diferencia de JWG-071, XMD8-92 es inhibidor no específico de ERK5 ya que también presenta actividad anti-BRD4 (Wang et al., 2018). Estos ensayos permitieron constatar un mayor efecto citotóxico de JWG-071, en comparación con XMD8-92. La **Figura 26** muestra las correspondientes curvas dosis-respuesta y una tabla que recoge los valores de IC₅₀ obtenidos en las diferentes líneas tumorales. Los valores de IC₅₀ oscilaron entre 2- 5 μM para el JWG-071 y entre 7- 13 μM para el XMD8-92.



Cell Line	IC ₅₀ (μM) JWG-071	IC ₅₀ (μM) XMD8-92
Ishikawa (endometrial)	3.2 ± 0.8	13.4 ± 3.5
AN3CA (endometrial)	4.1 ± 0.6	-
Hela (cervical)	2.9 ± 0.7	8.9 ± 1.8
C4-2 (prostate)	2.2 ± 0.3	4.8 ± 1.1
LN-18 (glioblastoma)	2.9 ± 0.4	9.9 ± 3.1
IMR-32 (neuroblast.)	1.9 ± 0.3	6.7 ± 1.8
SH-SY5Y (neuroblast.)	4.2 ± 1.4	8.7 ± 2.2
A-549 (lung)	4.9 ± 1.1	7.1 ± 0.9
MiaPaCa-2 (pancreatic)	4.6 ± .0.5	-

Figura 26. El inhibidor específico de ERK5 JWG-071 reduce la viabilidad de diferentes células tumorales humanas. Ensayo de viabilidad celular (MTT). Curvas de viabilidad de distintas líneas tumorales humanas tratadas durante 72 h con JWG-071 a las concentraciones indicadas (**panel izquierdo**). La tabla muestra los valores de IC₅₀ (media ± SD) de la citotoxicidad inducida por JWG-071 en líneas tumorales (**panel derecho**). Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes.

Con la finalidad de establecer la especificidad de JWG-071, se realizó un estudio en el que se determinó el grado de inhibición para 468 proteínas kinasas humanas, en ensayos *in vitro* (KinomeScan) utilizando una concentración de JWG-071 de 1 μM. JWG-071 apenas afectó a la actividad de las quinasas analizadas, con excepción de la *double-courtin like kinase 1* DCLK1 (Wang et al., 2018). DCLK1 es una serina-treonina quinasa poco estudiada. Presenta dos dominios de unión a microtúbulos, y está sobreexpresada en algunos tumores humanos, como el adenocarcinoma pancreático ductal. Recientemente, se ha propuesto DCLK1 como una nueva diana antitumoral (Ferguson et al., 2020). Con la finalidad de descartar que la citotoxicidad inducida por JWG-071 fuera debida a una inhibición de DCLK1, se evaluó la viabilidad celular al tratar con un inhibidor específico de DCLK1, DCLK1-IN-1 (Ferguson et al., 2020). Los correspondientes ensayos (MTT) en las líneas de carcinoma de endometrio Ishikawa y AN3CA mostraron que concentraciones de DCLK1-IN-1 que inhiben específicamente DCLK1 (IC₅₀ = 279 nM) no tuvieron efecto sobre la viabilidad de las células de carcinoma de endometrio empeladas como modelo en este trabajo (**Figura 27, derecha**). Así, por ejemplo, se tuvo que llegar a una concentración de 5 μM (no específica) para obtener una reducción de la viabilidad del 20% (**Figura 27, izquierda**). Estos resultados sugieren que la citotoxicidad inducida por JWG-071 no es debida a la inhibición de DCLK1.

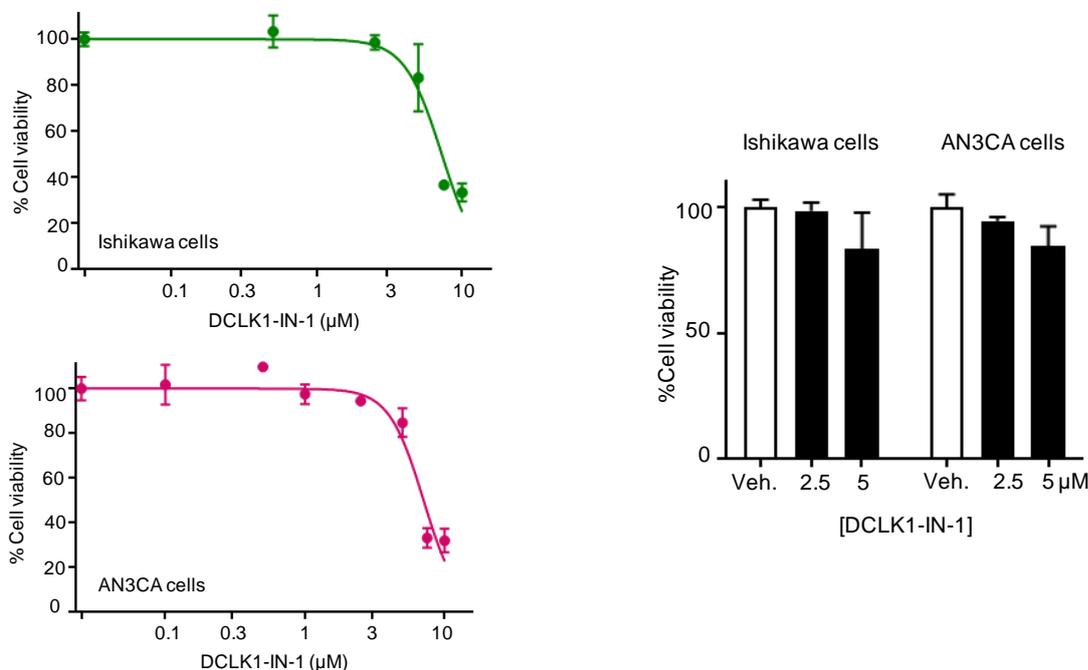


Figura 27. La inhibición de la quinasa DCLK1 no afecta a la viabilidad de células de carcinoma endometrial. Curvas de viabilidad celular (MTT) de líneas de carcinoma endometrial Ishikawa y AN3CA tratadas durante 48h con las concentraciones indicadas de DCLK1-IN-1 (inhibidor de DCLK1) (**panel derecho**). El histograma muestra los valores de viabilidad celular obtenidos para las concentraciones 2,5 y 5 μM de DCLK1-IN-1. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes. Se muestran los valores medios ± SD de ensayos realizados en cuatuplicado.

Diferentes autores han mostrado que la inhibición o el silenciamiento de ERK5 induce apoptosis en diferentes líneas celulares tumorales (Gomez et al., 2016), por lo que se diseñaron experimentos con la finalidad de comprobar si éste también era el caso para JWG-071. En primer lugar, se llevó a cabo un análisis de citometría de flujo de células teñidas con Anexina V–APC e ioduro de propidio donde se evaluó la apoptosis inducida por JWG-071. La Anexina V unida a un fluorocromo (APC) se utiliza para detectar células apoptóticas debido a su capacidad para unirse a la fosfatidilserina, un marcador de apoptosis cuando se encuentra en la hemimembrana celular externa. El Ioduro de propidio es un agente intercalante fluorescente que se une al ADN de células con una membrana deteriorada, por lo que se utiliza como marcador de células necróticas. La **Figura 28** muestra que JWG-071 indujo mayoritariamente apoptosis tardía (29-49 %) y en menor medida apoptosis temprana (4-15 %) y necrosis (1-5 %) en células de carcinoma endometrioide Ishikawa y AN3CA, así como en células HeLa de carcinoma de cérvix.

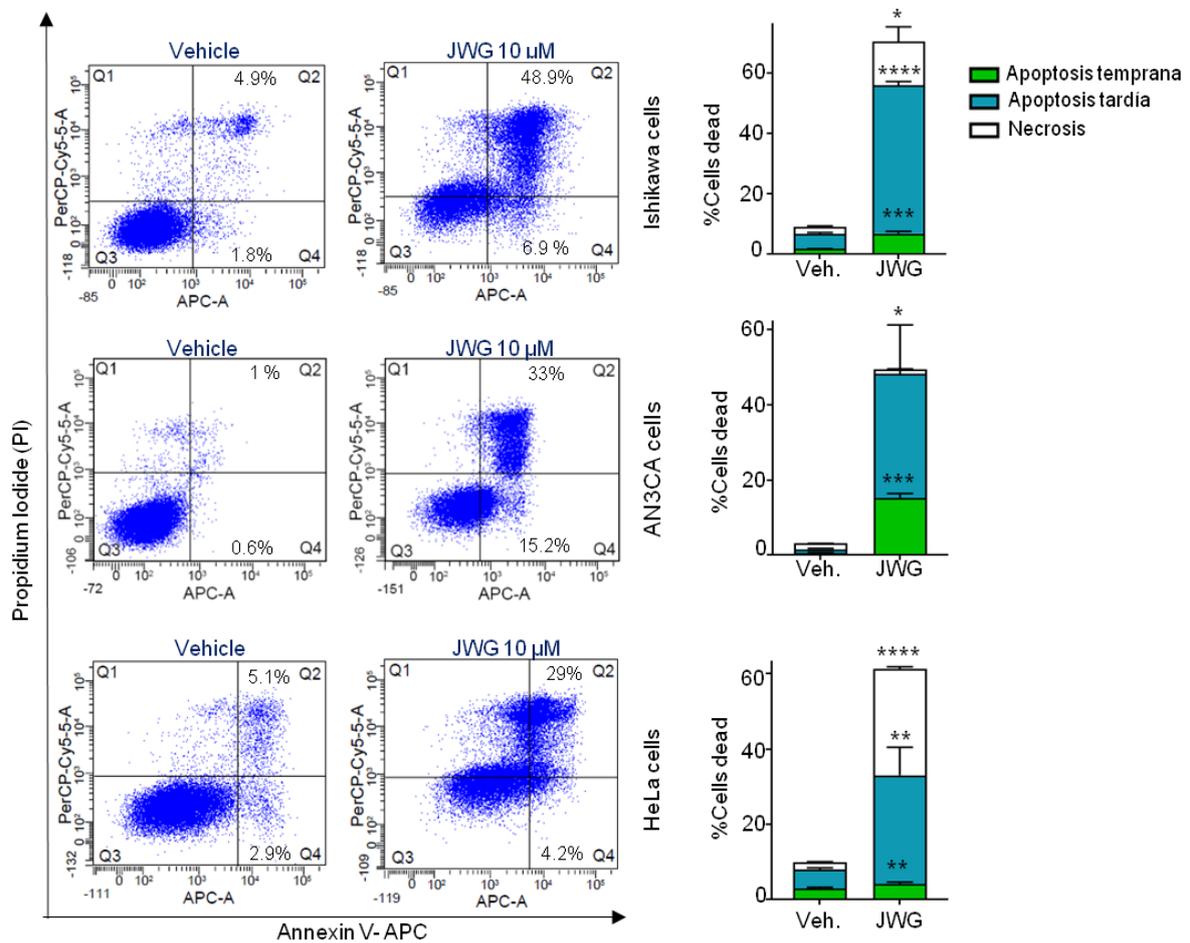


Figura 28. La inhibición de ERK5 induce apoptosis en células tumorales humanas. Resultados representativos del análisis por citometría de flujo de la apoptosis celular inducida por JWG-071. Células Ishikawa, AN3CA y HeLa tratadas con JWG-071 10 µM durante 48h fueron teñidas con Anexina V y ioduro de propidio (panel izquierdo). Los histogramas representan el porcentaje de células muertas (apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis) obtenido en respuesta al tratamiento con vehículo o JWG-071. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes. Se muestran los valores medios ± SD de ensayos realizados en duplicado. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

En segundo lugar, se analizó la presencia de núcleos apoptóticos en respuesta al tratamiento con JWG-071, mediante tinción nuclear con el colorante fluorescente Hoechst 33259 y análisis por microscopía de fluorescencia. Se llevó a cabo la cuantificación de núcleos apoptóticos mediante el conteo de núcleos fragmentados, indicadores de una fragmentación de ADN y, por tanto, de apoptosis. Mientras que las células controles (vehículo) presentaron entre un 3-4 % de núcleos apoptóticos, las tratadas con JWG-071 mostraron un rango de 40-45 % de núcleos fragmentados (**Figura 29A**).

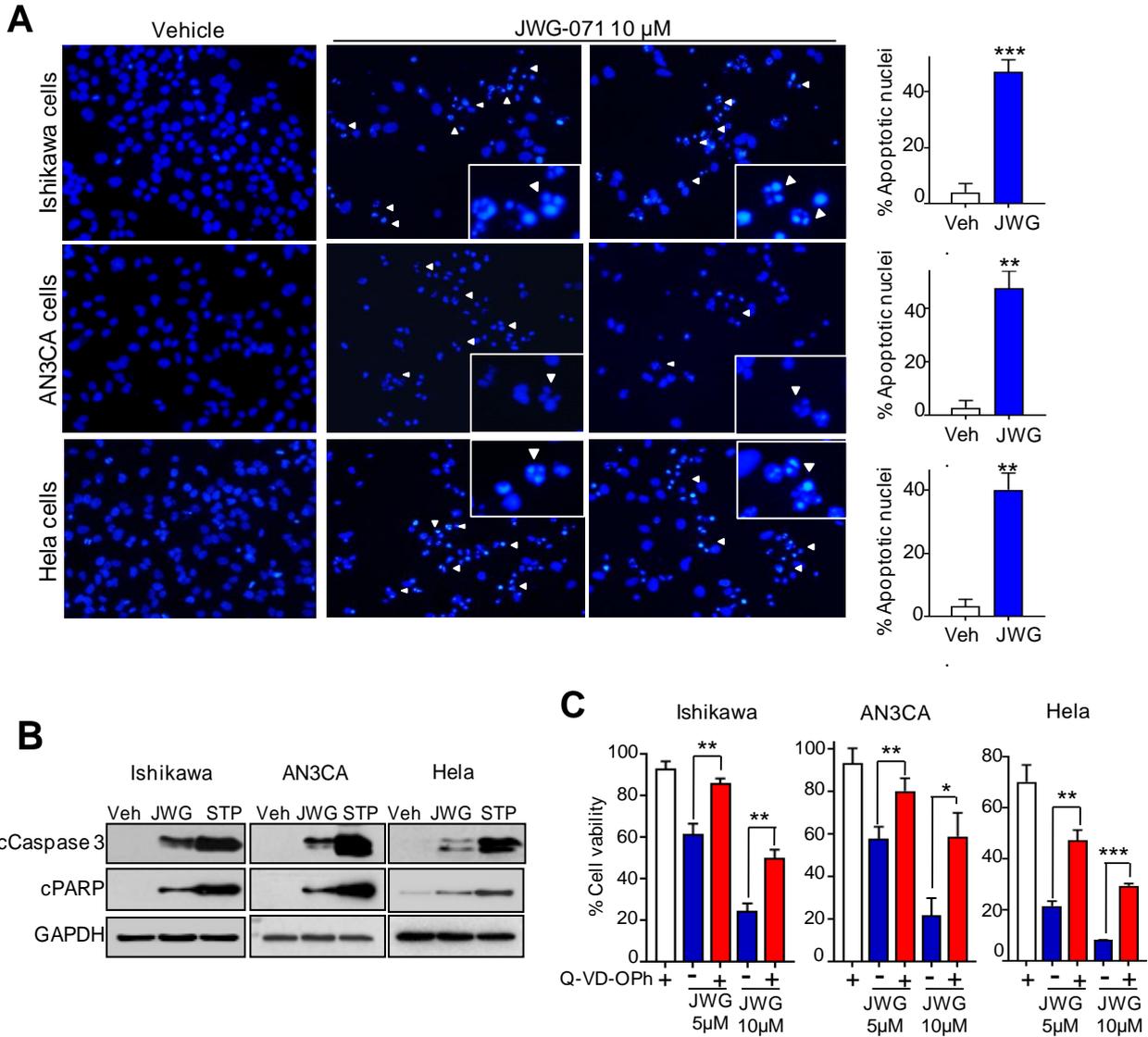


Figura 29. La inhibición de ERK5 induce muerte apoptótica en células humanas de cáncer endometrial y cervical.

A, Microscopía de fluorescencia de núcleos teñidos con Hoechst 33259. Células Ishikawa, AN3CA y HeLa fueron tratadas con vehículo ó 10 μM JWG-071 durante 48h, fijadas y teñidas con Hoechst 33259 según el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Los histogramas muestran el porcentaje de núcleos apoptóticos. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes. El histograma muestra la cuantificación de 4 fotos por línea y condición. **B**, Células Ishikawa, AN3CA y HeLa fueron tratadas con vehículo (Veh.), 10 μM JWG-071 (JWG), durante 48h, ó 1 μM estaurosporina (STP) durante 24h. Los niveles de las proteínas pro-apoptóticas fragmento de caspasa 3 (cCaspase3) y fragmento de PARP (cPARP) fueron monitorizados mediante inmunoblot. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos diferentes. **C**, Ensayo de viabilidad celular (MTT) en células Ishikawa, AN3CA y HeLa que fueron pretratadas con el inhibidor de caspasas Q-VD-Oph (1 hora), y tratadas con 5 y 10 μM de JWG-071 durante 48h. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes. Se muestran los valores medios ± SD de ensayos realizados en cuatuplicado. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$

Para confirmar que JWG-071 induce apoptosis *in vitro*, se evaluó la actividad de caspasa-3 mediante inmunoblot, que permite evaluar su fragmentación y la de su sustrato canónico PARP. La activación de caspasa-3 comporta el autoproteólisis del zimógeno inactivo (32 kDa) que da lugar a fragmentos activos de 17 y 12 kDa. Una vez activa, caspasa 3 cataliza la proteólisis limitada de numerosos sustratos, como la proteína poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP), implicada en la reparación de ADN. La **Figura 29B** muestra que el tratamiento con JWG-071 resultó en la fragmentación de caspasa-3 (fragmentos de 17 y 19 kDa) y de su sustrato PARP (fragmento de 89 kDa) en las células Ishikawa, AN3CA y HeLa. Como control positivo se empleó estaurosporina, que indujo un robusto aumento de la fragmentación de caspasa-3 y de PARP. Con el objetivo de evaluar la implicación de caspasas en la muerte celular inducida por JWG-071, se estudió el efecto del inhibidor de caspasas Q-VD-OPh. Los ensayos de viabilidad celular (MTT) en células Ishikawa, AN3CA y HeLa mostraron que el tratamiento previo con Q-VD-OPh rescata significativamente la citotoxicidad inducida por JWG-071 (**Figura 29C**).

Por último, se estudió el efecto de JWG-01 en células MEF transformadas salvajes ($Bax^{+/+}/Bak^{+/+}$) o deficientes para Bax y Bak ($Bax^{-/-}/Bak^{-/-}$). Bax y Bak son proteínas de la familia de Bcl-2 implicadas en la permeabilización de la membrana mitocondrial. Por lo tanto, las células deficientes en Bax/Bak son resistentes a todos los estímulos conocidos de la vía de apoptosis intrínseca (Westphal et al., 2011). Se analizó mediante inmunoblot la fragmentación de caspasa-3 en respuesta a JWG-071 en las células, utilizando estaurosporina como control positivo. La **Figura 30A** muestra que el tratamiento con JWG-071 resultó en un aumento de la fragmentación de caspasa-3 en las células MEF $Bax^{+/+}/Bak^{+/+}$, mientras que las células MEF $Bax^{-/-}/Bak^{-/-}$ no presentaron fragmentación de caspasa-3. Los ensayos de viabilidad (MTT) mostraron que células MEF $Bax^{+/+}/Bak^{+/+}$ presentaban una reducción de la viabilidad del 60% en respuesta al JWG-071, mientras que las células MEF $Bax^{-/-}/Bak^{-/-}$ fueron resistentes al tratamiento (**Figura 30B**). Estos resultados, en su conjunto, demuestran que JWG-071 induce apoptosis celular y que su citotoxicidad está mediada por la activación de las caspasas celulares.

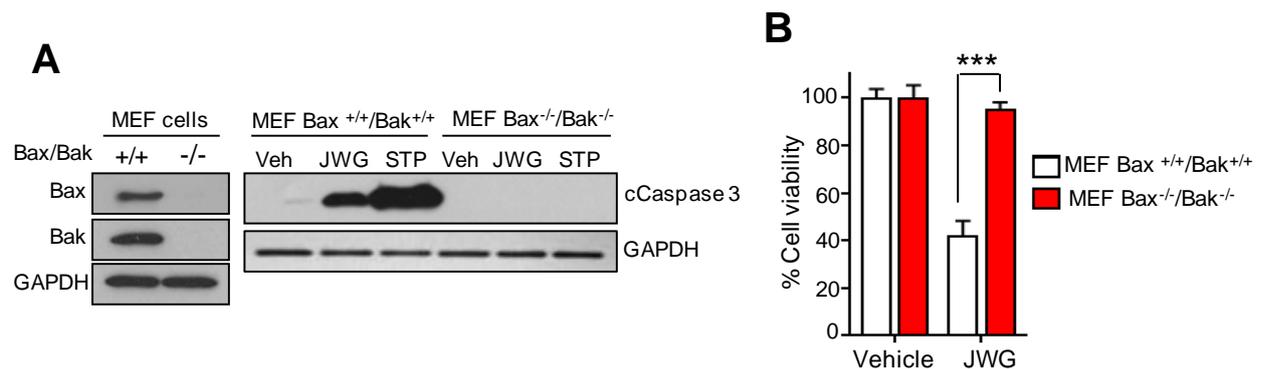


Figura 30. Las células MEF $Bax^{-/-}/Bak^{-/-}$ son resistentes al tratamiento con JWG-071. A, Inmunoblot de los niveles de Bax y Bak en células MEF $Bax^{+/+}/Bak^{+/+}$ y células MEF $Bax^{-/-}/Bak^{-/-}$ (panel izquierdo). Células MEF $Bax^{+/+}/Bak^{+/+}$ y células MEF $Bax^{-/-}/Bak^{-/-}$ tratadas con 10 μ M JWG-071 durante 48h y 1 μ M estaurosporina (STP) durante 24h. Las células fueron lisadas y se analizó por inmunoblot los niveles de fragmento de caspasa 3 (cCaspase 3) y GAPDH como control de carga (panel derecho). Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes. **B**, Ensayo de viabilidad celular (MTT) en células MEF $Bax^{+/+}/Bak^{+/+}$ y células MEF $Bax^{-/-}/Bak^{-/-}$ que fueron tratadas con 10 μ M JWG-071 durante 48h. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes. Se muestran los valores medios \pm SD de ensayos realizados en cuatriplicado. *** $P < 0.001$

3.2. JWG-071 inhibe la vía canónica de NF- κ B al reducir los niveles de expresión de NEMO/IKK γ .

Dado que la inducción de muerte apoptótica es el evento molecular más característico de la acción de JWG-071, a continuación se diseñaron experimentos con el fin de establecer los mecanismos moleculares que relacionaran la inhibición de ERK5 con la activación de la apoptosis en células de cáncer ginecológico. Diferentes autores han establecido una relación entre MAP quinasa ERK5 y la vía de supervivencia NF- κ B en distintos tipos tumorales como leucemia, adenocarcinoma de colon o cáncer cervical (Garaude et al., 2006; Simões et al., 2015; Cude et al., 2007, respectivamente). En estos modelos, la estimulación de ERK5 contribuye a la activación de la vía canónica de NF- κ B, que resulta en un aumento de la población nuclear del factor de transcripción RELA/p65 y de la consecuente actividad transcripcional de NF- κ B. Por otra parte, la inhibición o el silenciamiento de ERK5 resulta en una menor actividad de la vía de NF- κ B en modelos de leucemia y de cáncer de colon (Garaude et al., 2006; Simões et al., 2015; respectivamente).

La activación de NF- κ B está relacionada con varios de los *hallmarks* del cáncer, incluyendo inflamación, proliferación, angiogénesis, invasión, metástasis, quimioresistencia y radioresistencia (Dolcet et al., 2005). En la vía canónica, la actividad de transcripcional de p65 está regulada por su inhibidor I κ B α . En estado basal, NF- κ B (p65/p50) se localiza en el citoplasma formando un complejo con la proteína inhibidora I κ B (*inhibitor of κ B*). En respuesta a diferentes factores como citoquinas (IL-1) o señales proinflamatorias (TNF α), la activación de los correspondientes receptores permite el reclutamiento de la proteína moduladora IKK γ /NEMO, un evento que facilita la activación de la proteínas kinasas I κ B kinase- α (IKK- α) e I κ B kinase- β (IKK- β) (Baeuerle & Henkel, 1994; May & Ghosh, 1997; Gilmore, 2006). Una vez activada, IKK- β fosforila I κ B, lo que induce su ubiquitinación y degradación proteasomal, permitiendo la translocación nuclear de p65/p50 y la activación de la transcripción de los genes diana (Hayden & Ghosh, 2008; Karin & Ben-nemiah, 2000). Dado que la vía canónica de NF- κ B controla la proliferación y supervivencia del cáncer endometrial (Pallares et al., 2004), y dados que nuestros resultados mostraban que la inhibición de ERK5 comprometía ambos eventos, a continuación abordamos la relación de ERK5 y la vía canónica de NF- κ B en este tipo tumoral.

En primer lugar, se llevó a cabo un estudio de correlación entre los niveles de expresión de ERK5 y NF- κ B/p65 en cáncer de endometrio. Los niveles de mRNA de ERK5 y NF- κ B/p65 de muestras de pacientes con cáncer endometrial obtenidos de la base de datos cBioportal fueron analizados mediante el servidor GEPIA. Los resultados muestran una buena correlación entre los niveles de mRNA de ERK5 y p65 ($p = 1 \times 10^{-7}$, Pearson = 0.45) (**Figura 31A**). A continuación, se estudió la expresión de las proteínas ERK5 y p65 en lisados de biopsias de 17 pacientes que presentaron cáncer endometrial de distinto grado y estadiaje, en las que se analizó el tejido tumoral y el tejido no tumoral adyacente. Estas muestras procedieron del Biobanco de tumores del VHIR (Barcelona), y las características de cada una de ellas se exponen en la tabla de la **Figura 31B**. El análisis mediante inmunoblot de la expresión de ERK5 y p65 en muestras de tejido normal y tejido tumoral del mismo paciente se muestra en la **Figura 31C**. No se obtuvo relación entre los niveles de expresión de ERK5 tumoral y el grado del tumor (**Figura 31D**). Sin embargo, para la mayoría de los casos (12 de 17) se observó una expresión aumentada de ERK5 y de p65 en el tejido tumoral, comparado con el correspondiente tejido peritumoral (**Figura 32A**).

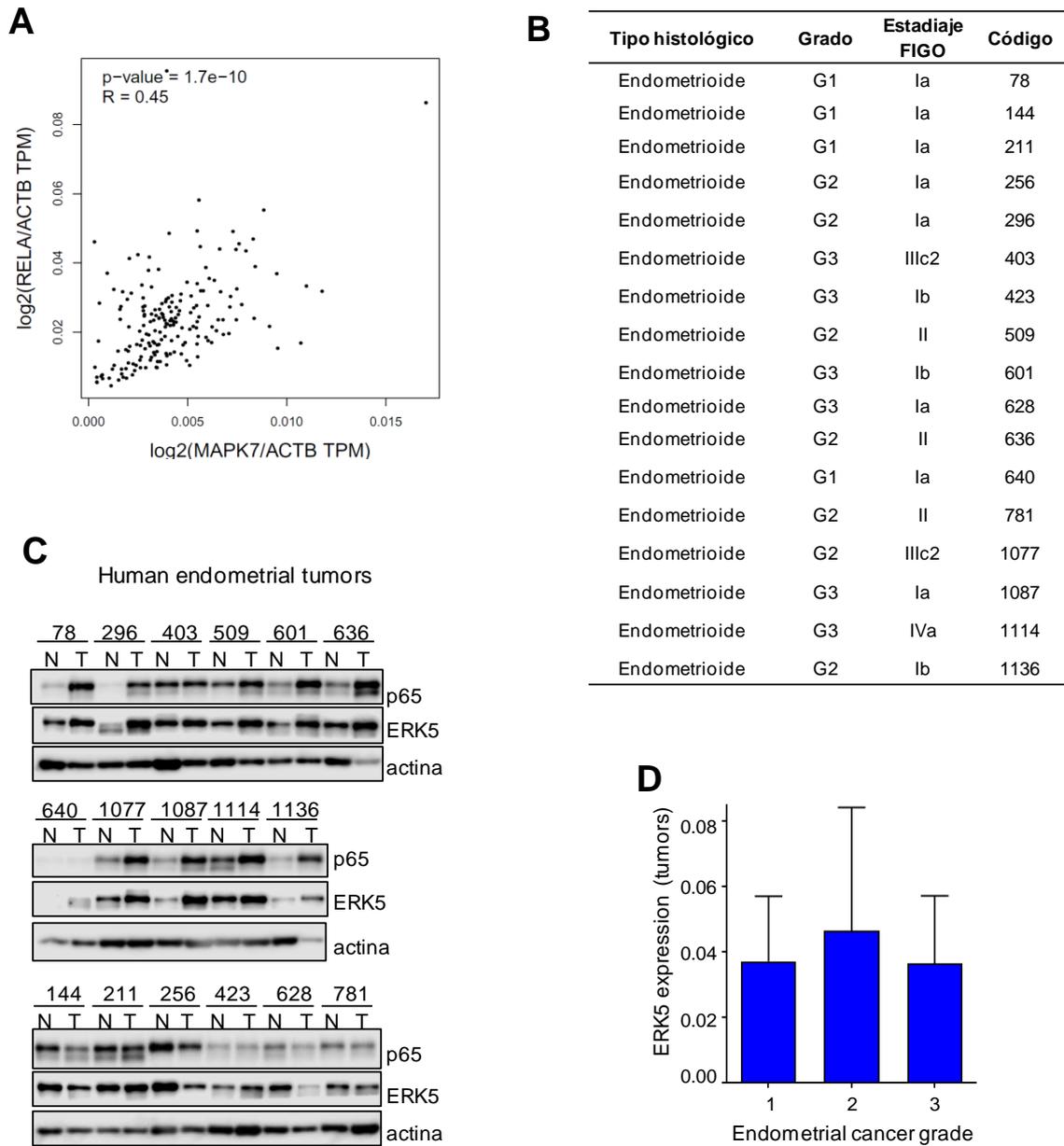


Figura 31. ERK5 correlaciona con p65 en tumores humanos de endometrio. **A**, Correlación entre los mRNAs de ERK5 (MAPK7) y p65 (RELA) de la bases de datos de TCGA (obtenido de la base de datos GEPIA, <http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>). **B**, Tabla resumen que recoge el grado y el estadiaje de las muestras de tumores humanos de endometrio analizadas. **C**, Muestras de biopsias de 17 pacientes de zona normal (N) y tumoral (T) de endometrio obtenidas según lo descrito en Materiales y Métodos. Se analizaron por inmunoblot los niveles de p65 y ERK5, con actina como control de carga. **D**, Relación de la expresión de ERK5 y el grado de malignidad en los tumores de endometrio analizadas.

De interés, la representación de los niveles relativos tumoral/no tumoral mostró una excelente relación (Pearson: 0,833; p: 0.00003) entre los niveles de ERK5 y p65 (**Figura 32B**). No se observó correlación de los niveles de ERK5 cuando se compararon con los de NEMO/IKK γ o los de IKK- β (**Figura 33A y 33B**).

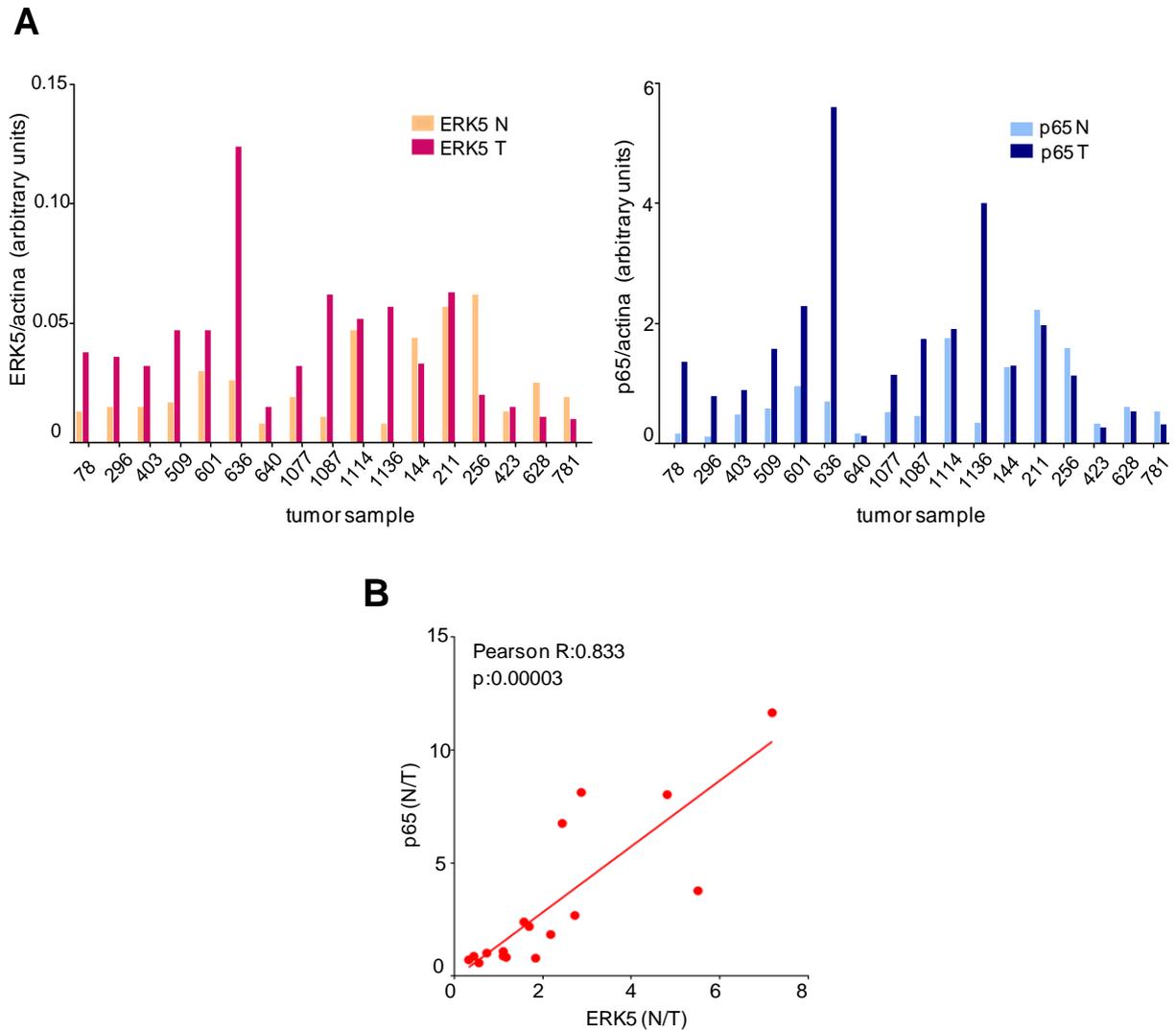


Figura 32. ERK5 correlaciona con p65 en tumores humanos endometrioides. **A**, El histograma izquierdo muestra la cuantificación de los niveles proteicos de ERK5 de tejido normal (N) y tumoral (T) de endometrioides, normalizados con respecto a actina. El histograma derecho representa la cuantificación de los niveles proteicos de p65 de la fracción normal (N) y tumoral (T) de cada paciente, normalizados con respecto a actina. **B**, Correlación entre los niveles proteicos normalizados de ERK5 y p65 obtenidos de la fracción normal (N) y tumoral (T) de cada paciente (n=17 pacientes).

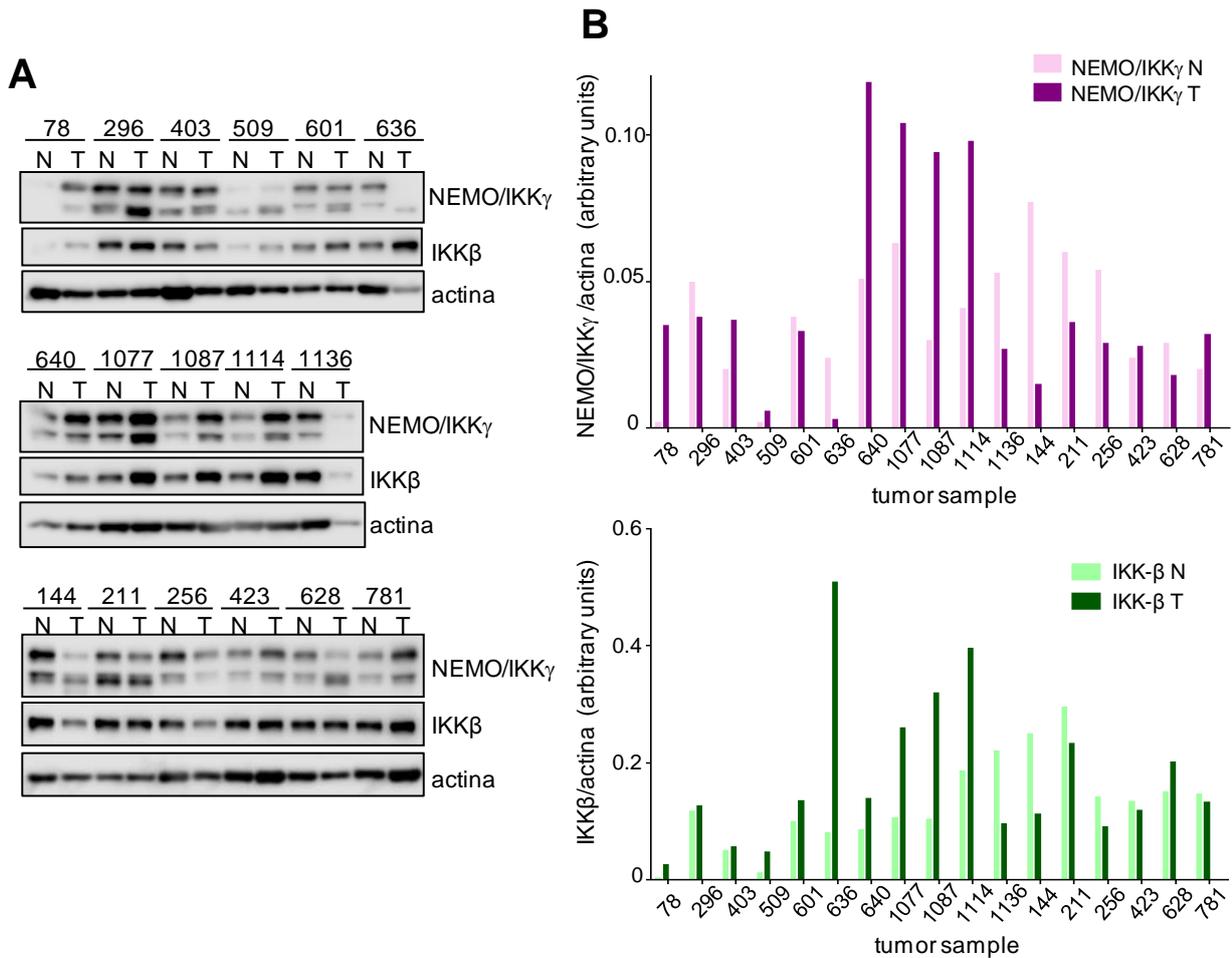


Figura 33. Los niveles de proteína ERK5 no correlacionan con los de NEMO/IKK γ o IKK- β en tumores humanos de endometrio. A, Muestras de 17 pacientes de zona normal (N) y tumoral (T) de endometrio obtenidas según lo descrito en Materiales y Métodos. Se analizaron por inmunoblot los niveles de NEMO/IKK γ y IKK- β , con actina como control de carga. **B,** El histograma superior muestra la cuantificación de los niveles proteicos de NEMO/IKK γ de la fracción normal (N) y tumoral (T) de cada paciente, normalizados con respecto a actina. El histograma inferior representa la cuantificación de los niveles proteicos de IKK- β de la fracción normal (N) y tumoral (T) de cada paciente, normalizados con respecto a actina.

Estos resultados mostraban una correlación significativa entre los niveles de mRNA y de proteína de ERK5 y p65 en cáncer endometriode, lo que nos animó a estudiar el efecto de la inhibición de ERK5 sobre la vía de señalización de NF- κ B. Debido a nuestro interés en estudiar la vía de ERK5 en cánceres ginecológicos, el trabajo experimental fue realizado en dos líneas de cáncer de endometrio humano (Ishikawa y AN3CA), y en una línea de cáncer cervical (HeLa).

En primer lugar, se estudió el impacto de la inhibición de ERK5 sobre p65. La **Figura 34A** muestra que el tratamiento con JWG-071 resultó en una reducción significativa de los niveles de p65 fosforilada y p65 total (50-60%) en las tres líneas tumorales analizadas. Este resultado fue confirmado mediante una aproximación genética, mediante la infección de las células con vectores lentivirales que codifican para dos secuencias diferentes de la ERK5 humana. El análisis mediante inmunoblot demostró un silenciamiento de ERK5 del ~80% en células Ishikawa y AN3CA, que se vio acompañado con una bajada

significativa (50-60%) de los niveles de p65. Estos resultados demuestran una relación entre ERK5 y p65 en cáncer de endometrio (**Figura 34B**).

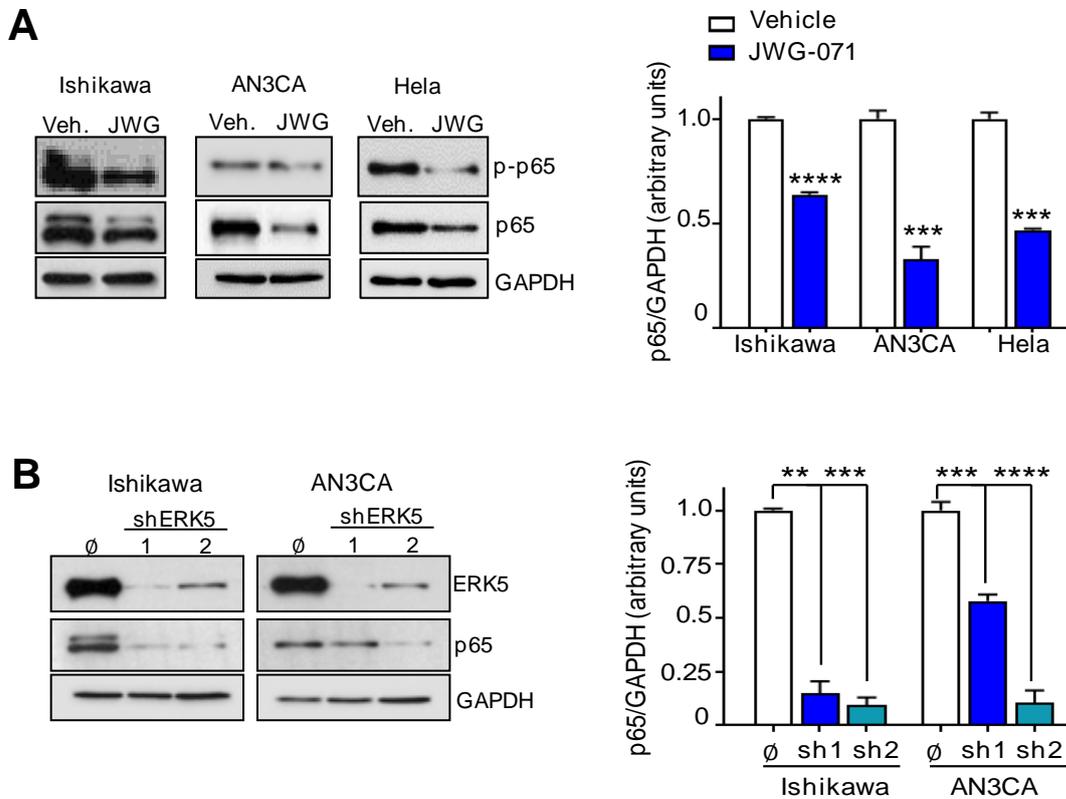


Figura 34. La inhibición (JWG-071) o el silenciamiento de ERK5 (shERK5) reduce los niveles de expresión de p65 en líneas tumorales de cáncer endometrial y cervical. A, Células Ishikawa, AN3CA y HeLa fueron tratadas con vehículo (Veh.) o 10 μ M JWG-071 (JWG), durante 48h. Los niveles de de p65 y p-p65 fueron analizados mediante inmunoblot. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes. El histograma derecho muestra la cuantificación de los niveles de p65 normalizados con respecto a GAPDH. **B,** Células Ishikawa o AN3CA fueron infectadas con dos lentivirus que para ERK5 durante 6 días. Los niveles de ERK5 y p65 fueron determinados mediante inmunoblot. El histograma derecho muestra a cuantificación de los niveles de p65 normalizados con respecto a GAPDH. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes. *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

El mecanismo de activación de la vía canónica de NF- κ B conlleva la translocación nuclear de p65, lo que le permite actuar como activador transcripcional de sus genes diana. A continuación, se valoró si la inhibición de ERK5 con JWG-071 era capaz de reducir la translocación nuclear de p65 y, como consecuencia, afectar su actividad transcripcional. Para ello, se determinó la localización subcelular de p65 mediante ensayos de fraccionamiento. La **Figura 35A** muestra una reducción robusta de p65 nuclear basal en respuesta a la incubación de células Ishikawa con JWG-071. En paralelo, se realizaron los correspondientes ensayos de gen reportero de la actividad transcripcional basal de NF- κ B (p65). El tratamiento con JWG-071 resultó en una reducción significativa de la actividad transcripcional basal de NF- κ B (**Figura 35B**).

Estos resultados, en su conjunto, demuestran que la funcionalidad de la vía canónica de NF- κ B en células de cáncer endometrioide depende de la actividad ERK5.

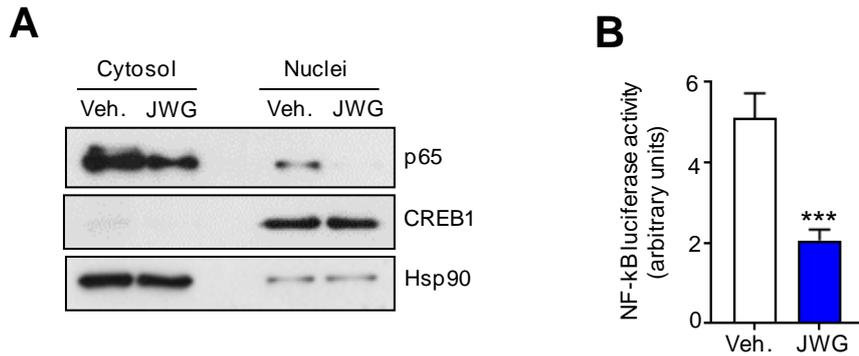


Figura 35. La inhibición de ERK5 reduce la localización nuclear basal de p65 y su actividad transcripcional. **A**, Fraccionamiento subcelular de células Ishikawa. Se obtuvieron las fracciones citosólicas y nucleares de células Ishikawa tratadas con vehículo (Veh.) o con 10 μ M JWG-071 (JWG). La localización de p65 se analizó mediante inmunoblot. Las proteínas GAPDH y CREB1 fueron utilizadas como marcadores de la fracción citosólica y nuclear, respectivamente. Se obtuvieron resultados similares en al menos cuatro experimentos independientes. **B**, Ensayo de actividad transcripcional de NF- κ B. Células Ishikawa fueron co-transfectadas con los vectores pGL4-NF-kappaB-luciferase y pRL-CMVRenilla. 24 horas post-transfección las células fueron tratadas con JWG-071 10 μ M. 48h horas después, las células fueron lisadas y se determinó la actividad luciferasa mediante ensayo de gen reportero, usando el kit *Dual Luciferase Reporter Assay* de Promega. Se muestran los valores medios \pm SD de dos experimentos diferentes, realizados en duplicado y normalizado utilizando los valores de la Renilla. *** $P < 0.001$.

Los resultados obtenidos sobre el efecto de la actividad de ERK5 sobre p65 nos invitaron a continuar el estudio con el resto de los componentes de la vía canónica de NF- κ B (NEMO/IKK γ , IKK- β , IKK- α , IKB α). La **Figura 36A** muestra una disminución drástica (75-95%) de los niveles de la proteína NEMO/IKK γ (modulador apical de la vía) en respuesta al tratamiento con JWG-071 en células Ishikawa, AN3CA y Hela. Además, la cuantificación por RT-qPCR de los niveles de mRNA de *NEMO/IKK γ* de células Ishikawa y Hela mostró que JWG-071 induce una reducción significativa de los niveles del mensajero de NEMO/IKK γ en ambas líneas tumorales (**Figura 36B**). Estos resultados sugieren que la actividad de ERK5 podría estar implicada en la regulación transcripcional de *NEMO/IKK γ* , aunque no se descarta que también esté implicada en la estabilización de la proteína NEMO/IKK γ .

Como se ha mencionado con anterioridad, la proteína quinasa DCLK1 fue identificada como una diana *off-target* del compuesto JWG-071 (Wang et al., 2018). Con el fin de demostrar que el efecto de JWG-071 sobre la vía canónica de NF- κ B era únicamente debido a la inhibición de ERK5, se investigó el efecto de la inhibición de DCLK1 sobre los niveles de NEMO/IKK γ y p65. El tratamiento de células Ishikawa y AN3CA con DCLK1-IN-1 no afectó a los niveles de NEMO/IKK γ o de p65 (**Figura 36C**), lo que sugiere que el efecto de JWG-071 sobre la vía canónica de NF- κ B no es debido a la inhibición de DCLK1.

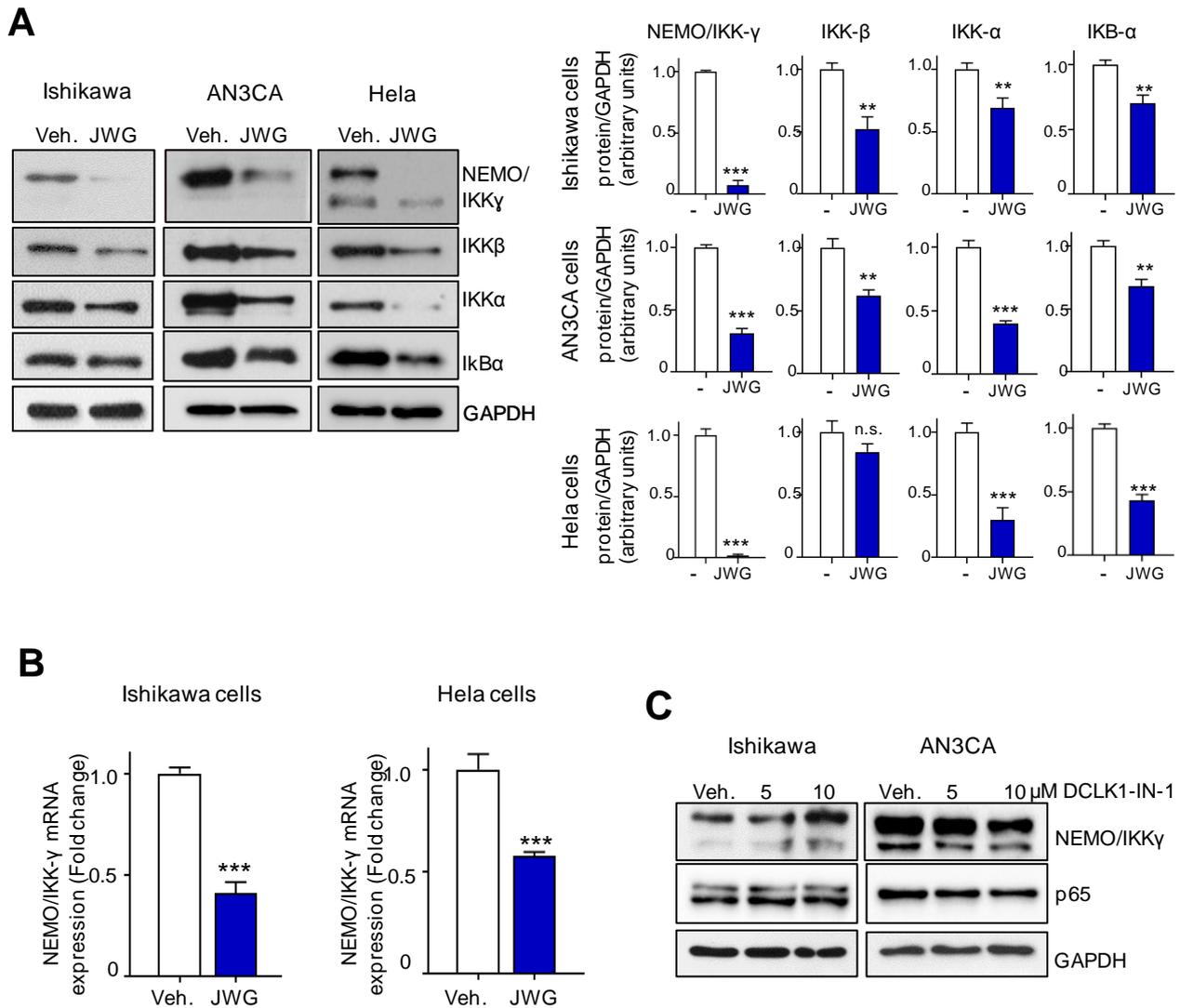


Figura 36. La inhibición de ERK5 resulta en una menor expresión de NEMO/IKK γ y de la vía canónica de NF- κ B. **A**, Células Ishikawa, AN3CA o HeLa fueron tratadas con vehículo (Veh.) o 10 μ M JWG-071 (JWG), durante 48h. Las células fueron lisadas y se analizó mediante inmunoblot los niveles de las proteínas de la vía de NF- κ B NEMO/IKK γ , IKK- β , IKK- α e I κ B α . Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos diferentes. El histograma derecho muestra la cuantificación de los niveles de NEMO/IKK γ , IKK- β , IKK- α y I κ B α , normalizados con respecto a GAPDH. **B**, Células Ishikawa o HeLa fueron tratadas con vehículo (Veh.) y 10 μ M JWG-071 (JWG), durante 6h. Se extrajo el RNA total y los niveles de mRNA de NEMO/IKK γ se analizaron mediante RT-qPCR. Cada valor es la media \pm SD de tres determinaciones diferentes. **C**, Células Ishikawa y AN3CA fueron tratadas con 5 ó 10 μ M DCLK1-IN-1 (inhibidor de DCLK1). Análisis por inmunoblot los niveles de NEMO/IKK γ y p65. Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos independientes. ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

3.3. JWG-071 induce la activación de la vía apoptótica regulada por las MAPK JNKs.

Diferentes autores han establecido una relación estrecha entre la vía de supervivencia de NF- κ B y la vía pro-apoptótica regulada por las MAP quinasas JNKs (*c-jun N-terminal kinases*). Así, la activación de la vía NF- κ B resulta en una inhibición de la vía apoptótica regulada por las JNKs, dando lugar a un fenotipo pro-supervivencia. Por el contrario, la inhibición de la vía NF- κ B conduce la activación sostenida de las JNKs, resultando en un fenotipo apoptótico (Javelaud & Besançon, 2001; De Smaele et al., 2001; Tang et al., 2001; Papa et al., 2004). Dado que nuestros resultados sugieren que los dos eventos moleculares más característicos del tratamiento con JWG-071 son la inhibición de la vía canónica de NF- κ B y la inducción de muerte apoptótica, seguidamente se estudió la implicación de la vía de las JNKs en la acción pro-apoptótica de JWG-071.

La vía de señalización de las JNKs se activa en respuesta a diferentes tipos de estímulos, como agentes proinflamatorios, estrés oxidativo o estrés hiperosmótico. Una vez activadas por las quinasas activadoras MKK4 y MKK7, las JNKs fosforilan sus sustratos putativos. Entre ellos se encuentra la proteína pro-apoptótica Bim (inhibidor de la proteína anti-apoptótica Bcl-2, (O'Connor et al., 1998)). Una vez fosforilada por las JNKs, Bim sufre un procesamiento y permite la acción pro-apoptótica de Bax y Bak, lo que favorece la liberación al citosol del citocromo C, la formación del apoptosoma y finalmente la activación de caspasa 3 (**Figura 37A**). El tratamiento con JWG-071 de células Ishikawa, AN3CA y HeLa resultó en una disminución drástica de los niveles de NEMO/IKK γ , en un aumento significativo de la activación de las JNKs (aumento de la forma fosforilada de las JNKs), en el procesamiento de Bim concomitante a la aparición de las subformas Bim S, Bim EL, Bim L (indicadores apoptóticos) y, por último, en un aumento de la fragmentación de caspasa-3. Estos resultados sugieren que la inhibición de ERK5 mediada por JWG-071 induce la activación de la vía apoptótica regulada por las MAPK JNKs (**Figura 37B**).

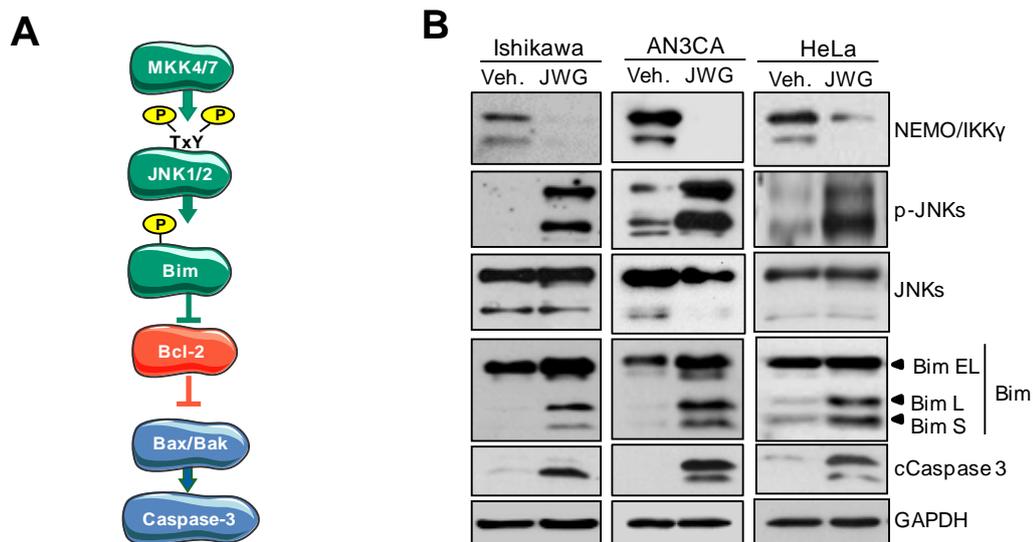


Figura 37. La inhibición de ERK5 induce la activación de la vía apoptótica regulada por las MAPK JNKs. A, Esquema de la vía de señalización apoptótica regulada por las JNKs. **B,** Células Ishikawa, AN3CA y HeLa fueron tratadas con vehículo (Veh.) y 10 μ M JWG-071 (JWG) durante 48h, y los niveles de NEMO, pJNKs y JNKs, Bim y fragmento de caspasa 3 fueron monitorizados mediante inmunoblot. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes.

Dado que el evento molecular más apical del mecanismo de acción de JWG-071 era la reducción de los niveles de NEMO/IKK γ , a continuación se investigó el impacto de la manipulación de los niveles de NEMO/IKK γ en la viabilidad de las líneas tumorales de cáncer de endometrio. La **Figura 38A** muestra que la sobreexpresión de NEMO/IKK γ en células Ishikawa y AN3CA resultó en una menor activación de caspasa-3 inducida por JWG-071 (reducción en los fragmentos de caspasa-3 y de su sustrato PARP). En paralelo, se llevó a cabo otra aproximación experimental mediante el silenciamiento de *NEMO/IKK γ* en células Ishikawa y AN3CA, con el fin de valorar genéticamente el efecto de la reducción de los niveles de NEMO/IKK γ en la activación de la apoptosis celular. El correspondiente inmunoblot mostró una drástica reducción de los niveles de NEMO/IKK γ en respuesta a los dos siRNAs independientes empleados, que se vio acompañada de un aumento significativo de los niveles de PARP fragmentada, marcador apoptótico (**Figura 38B**). Estos resultados, en su conjunto, sugieren que la reducción de los niveles celulares de NEMO/IKK γ sería el evento desencadenante de la muerte apoptótica inducida por la inhibición de ERK5 en células tumorales de endometrio.

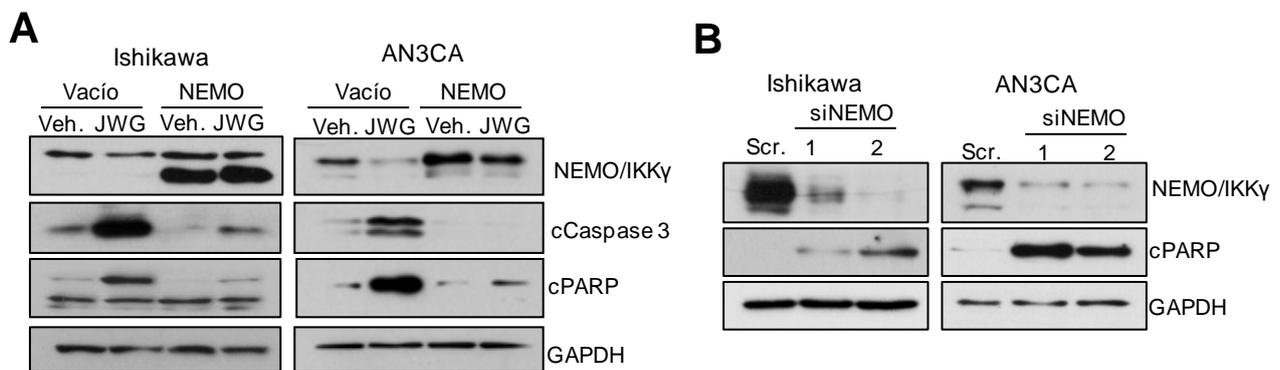


Figura 38. La sobreexpresión de NEMO/IKK γ protege frente a la toxicidad inducida por la inhibición de ERK5. A, Células Ishikawa y AN3CA fueron transfectadas con un plásmido pDSL que codifica para NEMO humana marcada con FLAG. 24h pos-transfección se trataron las células con vehículo (Veh.) ó 10 μ M JWG-071 (JWG) durante 24h. Los niveles de NEMO/IKK γ , fragmento de caspasa 3 y fragmento de PARP fueron analizados mediante inmunoblot. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes. **B,** Células Ishikawa y AN3CA fueron transfectadas con dos siRNAs diferentes que codifican para *NEMO/IKK γ* (siNEMO). 48h postransfección las células fueron lisadas y se analizaron por inmunoblot los niveles de NEMO/IKK γ y fragmento de PARP. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes.

Nuestros resultados apuntaban a que la acción pro-apoptótica del inhibidor de ERK5 JWG-071 estaría causada por la inhibición de la vía canónica de NF- κ B, consecuencia de la reducción de los niveles de expresión de las proteínas clave NEMO/IKK γ y p65. Con la finalidad de corroborar el impacto de la vía de NF- κ B en la viabilidad de líneas tumorales endometrioides, seguidamente se estudió el efecto de la inhibición farmacológica de esta vía. Para ello se utilizó la molécula BAY 11-7082, un inhibidor irreversible de IKK β que impide la fosforilación de I κ B α y bloquea su degradación proteasomal (Pierce et al., 1997). En primer lugar, y para evaluar la citotoxicidad inducida por BAY 11-7082, se llevaron a cabo ensayos de viabilidad (MTT) en células Ishikawa y AN3CA. La **Figura 39A** muestra una reducción de la viabilidad del 80 % al tratar con una concentración de BAY 11-7082 de 5 μ M en células Ishikawa (IC₅₀ 3,5 μ M) y AN3CA (IC₅₀ 2,5 μ M). Ésta es la primera vez que se estudia el efecto de este inhibidor en líneas celulares de cáncer de

endometrio, y dado que los valores de IC₅₀ reportados para otros tipos de líneas tumorales son de 10 μM (Melisi & Chiao, 2007), nuestros resultados sugieren un papel importante de la vía de NF-κB para el mantenimiento de la viabilidad del cáncer de endometrio.

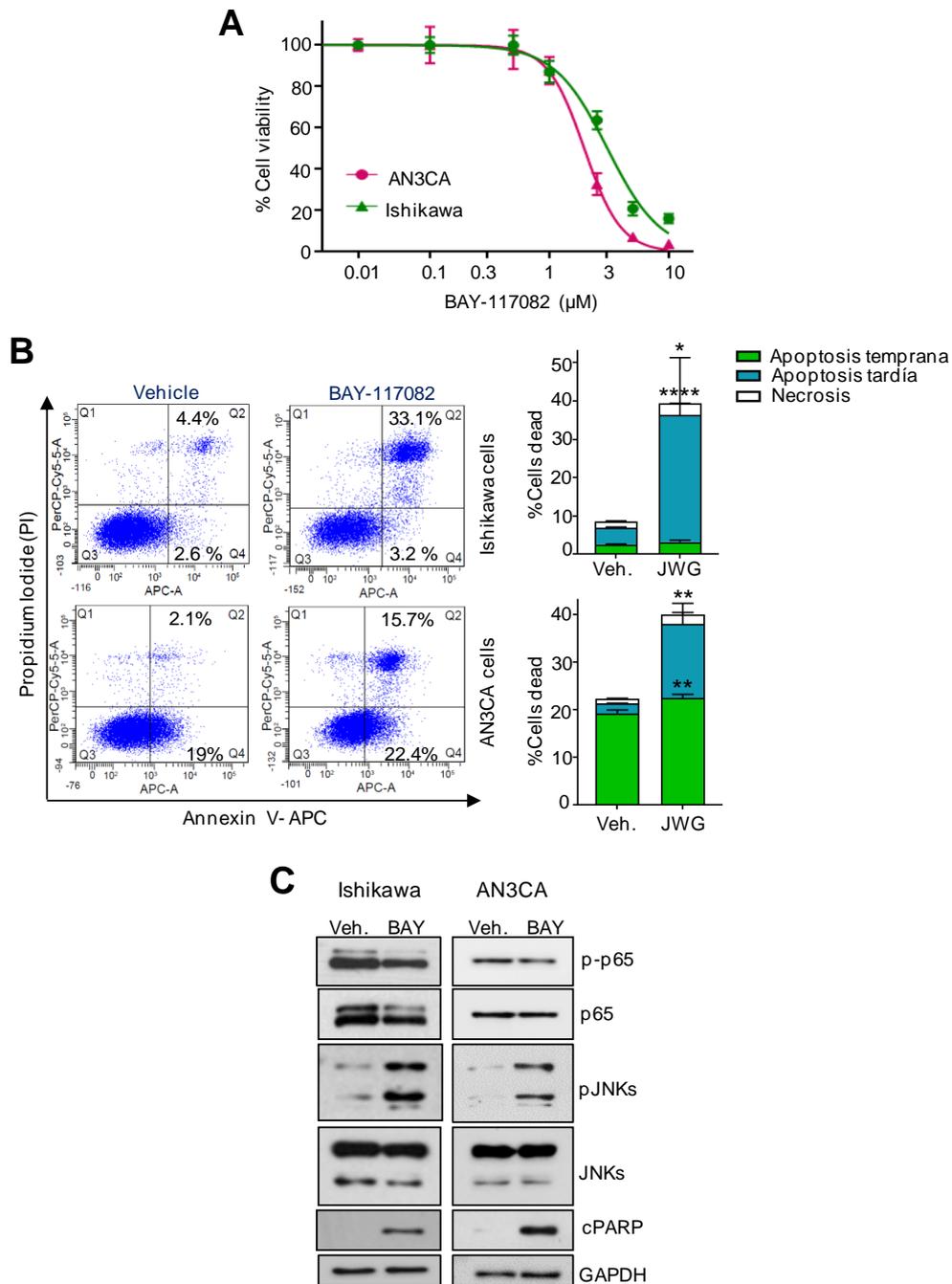


Figura 39. El inhibidor de la vía NF-κB, BAY-117082, induce apoptosis mediante la activación de la vía de las JNKs. **A**, Ensayo de viabilidad celular (MTT) en células Ishikawa y AN3CA que fueron tratadas durante 48 horas con BAY-117082 a las concentraciones indicadas. Los valores corresponden a las medias ± SD de ensayos realizados en cuatuplicado, y representativo de dos experimentos independientes. **B**, Resultados representativos del análisis por citometría de flujo de la apoptosis celular inducida por BAY-117082. Células Ishikawa o AN3CA tratadas con BAY-117082 10 μM durante 48h fueron teñidas con Anexina V y yoduro de propidio (panel izquierdo). Los histogramas representan el porcentaje de células muertas (apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis) obtenido en respuesta al tratamiento con vehículo o BAY-117082. Se muestran los valores medios ± SD de ensayos realizados en duplicado. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, **** $P < 0.0001$. **C**, Células Ishikawa y AN3CA fueron tratadas con vehículo (Veh.) o 10 μM BAY-117082 (BAY) durante 48h. Los niveles de p-p65, p65, pJNKs, JNKs y fragmento de PARP (cPARP) fueron monitorizados mediante inmunoblot. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos diferentes.

A continuación, se realizó un análisis de citometría de flujo mediante tinción con Anexina V–APC y ioduro de propidio, donde se evaluó la apoptosis inducida por BAY 11-7082. La **Figura 39B** muestra que BAY 11-7082 indujo mayoritariamente apoptosis tardía (16-33 %) y apoptosis temprana (3-22 %), y necrosis en menor medida (2-3 %) en células Ishikawa y AN3CA. Por último, se analizaron mediante inmunoblot los niveles de las proteínas de eje p65/JNK/caspasa 3. Como se esperaba, el tratamiento de células Ishikawa y AN3CA con BAY 11-7082 resultó en una reducción de los niveles de p65 fosforilada, y en un aumento de la actividad de las JNKs (aumento en su fosforilación) y de caspasa 3 (monitorizada mediante detección de fragmentación de PARP) (**Figura 39C**).

Los resultados presentados sugerían que la inhibición farmacológica de la vía NF- κ B en células tumorales endometrioides resulta en la activación de la apoptosis mediada por las JNKs. Con la finalidad de corroborar estas observaciones, a continuación se llevó a cabo una aproximación genética, utilizando el super-represor de I κ B α (SR-I κ B α). SR-I κ B α codifica para una proteína I κ B α mutada en los residuos S32A/S36A, que no puede ser fosforilada por IKK- β y que actúa como dominante negativo (Sole et al., 2004). La sobreexpresión de SR-I κ B α en células Ishikawa y HeLa resultó en una reducción significativa de los niveles de NF- κ B/p65, y en un aumento de la fosforilación de JNKs y de la fragmentación de caspasa-3. Así pues, la inhibición de p65 por la sobreexpresión del dominante negativo SR-I κ B α induce la vía apoptótica regulada por las JNKs (**Figura 40**). Estos resultados reproducen el mecanismo de acción observado para JWG-071 y demuestran que la inhibición de la vía de NF- κ B explica, al menos parcialmente, la apoptosis inducida al tratar con JWG-071.

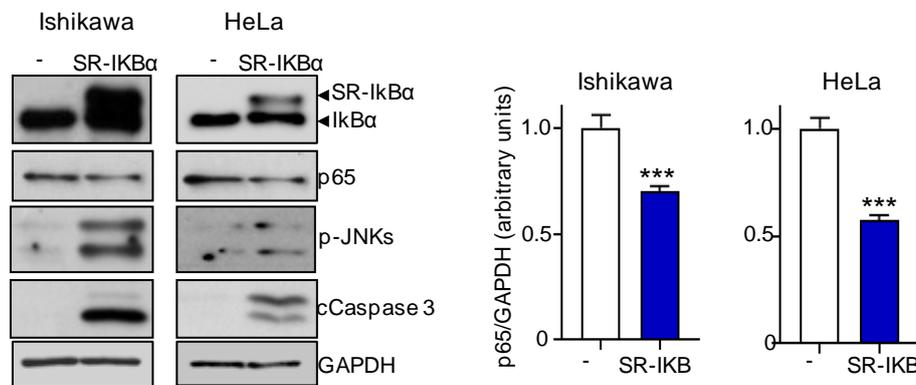


Figura 40. El super-represor de I κ B α reduce los niveles de p65 y activa la vía apoptótica inducida por las JNKs. A, Células Ishikawa y HeLa fueron transfectadas con el vector pEIGW-SK que codifica para el mutante de I κ B α deficiente en fosforilación por IKK β , SR-I κ B α . 48h pos-transfección, las células fueron lisadas y se analizaron los niveles de I κ B α , p65, pJNKs, JNKs y fragmento de caspasa 3 (cCaspase 3) mediante inmunoblot. Se obtuvieron resultados similares en al menos tres experimentos independientes. Los histogramas (panel derecho) muestran la cuantificación de los niveles de p65 en ambas líneas, normalizados con respecto a GAPDH. *** $P < 0.001$

3.4. JWG-071 reduce el crecimiento de tumores *in vivo*, en un modelo murino *xenograft* de cáncer de endometrio humano.

La inhibición farmacológica de ERK5 ha cobrado impulso como estrategia terapéutica para el tratamiento de distintos tipos de cáncer. Los inhibidores de ERK5 sintetizados hasta la fecha, si bien las deficiencias en especificidad mostradas, han sido evaluados en estudios preclínicos con el fin de examinar el potencial de bloqueo de la actividad quinasa de ERK5 como tratamiento antitumoral. Así, se ha establecido la oportunidad de la inhibición farmacológica o genética de ERK5 en modelos animales de distintos tipos tumorales, como cáncer de mama (Al-Ejeh et al., 2014; Ortiz-Ruiz et al., 2014), carcinoma hepatocelular (Rovida et al., 2015), carcinoma pulmonar (Qingkai Yang et al., 2010), mesotelioma maligno (Shukla et al., 2013; Thompson et al., 2018), neuroblastoma (Umopathy et al., 2014) y melanoma (Tusa et al., 2018).

Este trabajo aborda por primera vez el efecto de la inhibición farmacológica de ERK5 en un modelo animal de cáncer de endometrio, y se analiza la efectividad del primer inhibidor específico de ERK5 (JWG-071, sin actividad BRD4) como monoterapia. Para llevar a cabo este estudio, se emplearon ratones atímicos *nude* que fueron inyectados subcutáneamente con 4×10^6 células Ishikawa. Cuando los tumores alcanzaron un volumen aproximado de 100 mm^3 , se trataron diariamente con vehículo (β -ciclodextrina) o JWG-071 por vía intraperitoneal. Las **Figuras 41A-B** muestran que JWG-071, administrado a diario por vía intraperitoneal (50 mg/Kg) durante 15 días, reduce de manera muy significativa el crecimiento de los tumores *xenografts* de células Ishikawa. Esta reducción fue apreciada a sólo 8 días después del primer tratamiento con JWG-071. De interés, JWG-071 no generó toxicidad, tal y como se deduce de las correspondientes curvas de seguimiento del peso corporal de los ratones (**Figura 41C**) y de la inspección visual de los tejidos durante la necropsia. El correspondiente análisis mediante inmunoblot mostró un aumento significativo de los niveles de fragmentos de caspasa-3 y PARP en los lisados de tumores de animales tratados con JWG-071, con respecto al grupo de animales control (**Figura 41D**). Estos resultados fueron confirmados mediante el análisis inmunohistoquímico de caspasa-3 activa. La cuantificación de la tinción obtenida de cortes representativos de tumores mostró que el tratamiento con JWG-071 indujo un aumento significativo de los niveles tumorales de caspasa-3 fragmentada (**Figura 41E**).

A continuación, se estudió el impacto del tratamiento con JWG-071 en la vía canónica de NF- κ B de los tumores generados, mediante ensayos de inmunoblot de los correspondientes lisados. El tratamiento sistémico con JWG-071 provocó una reducción de los niveles tumorales del modulador NEMO/IKK γ y de p65 (**Figura 42**), similar a la observada en las líneas celulares (**Figura 36A**). De interés, la inhibición sistémica de ERK5 también resultó en una significativa disminución de los niveles proteicos de Bcl-2, diana transcripcional canónica de p65 (**Figura 42**).

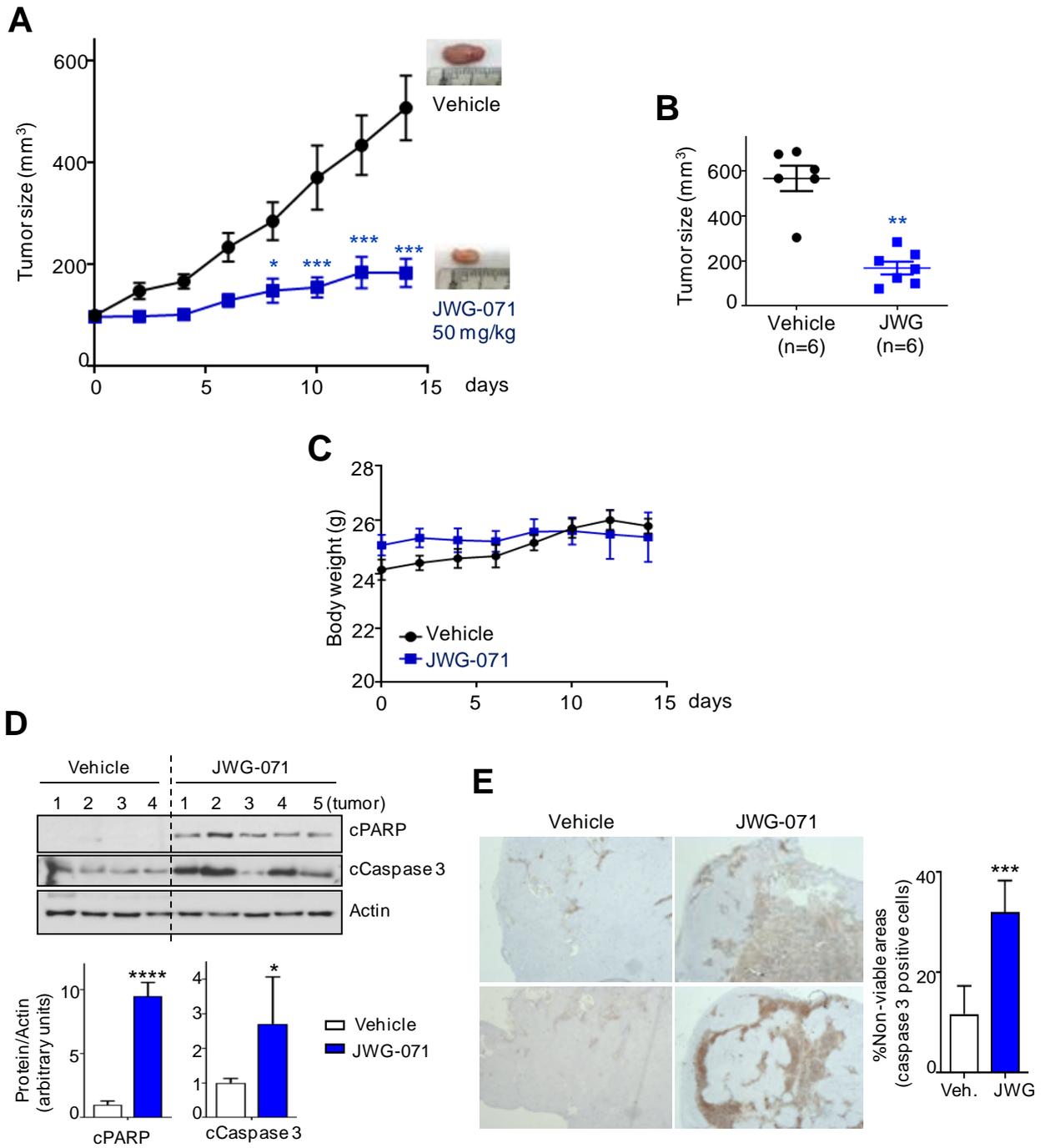


Figura 41. JWG-071 reduce el crecimiento tumoral e induce apoptosis *in vivo* (xenografts humanos de endometrio). **A**, Curva de crecimiento tumoral. Se inyectaron subcutáneamente 4×10^6 células Ishikawa. Cuando los tumores alcanzaron un volumen aproximado de 100 mm^3 , se trataron diariamente con vehículo (b-ciclodextrina, $n = 6$) o JWG-071 ($n = 6$) por vía intraperitoneal. **B**, Scatter Plot del tamaño de los tumores donde las líneas horizontales indican la media de cada grupo. **C**, Curva de variación del peso de los ratones. $N = 6$ para cada condición. Se muestran los valores medios \pm SEM. Se obtuvieron datos de la medida tumoral y del peso cada dos días. **D**, Los tumores *xenografts* fueron lisados y los niveles de los marcadores de apoptosis fragmento de caspasa 3 (cCaspase 3), PARP (cPARP) y actina (control de carga) fueron analizados mediante inmunoblot. Los histogramas inferiores representan la cuantificación de los niveles de cCaspasa 3 y cPARP normalizados respecto a los niveles de actina. **E**, Tinción inmunohistoquímica de fragmento de caspasa 3 de los tumores *xenografts*. Imágenes representativas de dos tumores diferentes para cada condición. El histograma muestra la cuantificación de 4 campos por tumor, y un total 6 tumores por grupo. Los resultados son la media \pm SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$ de los tumores tratados frente al vehículo.

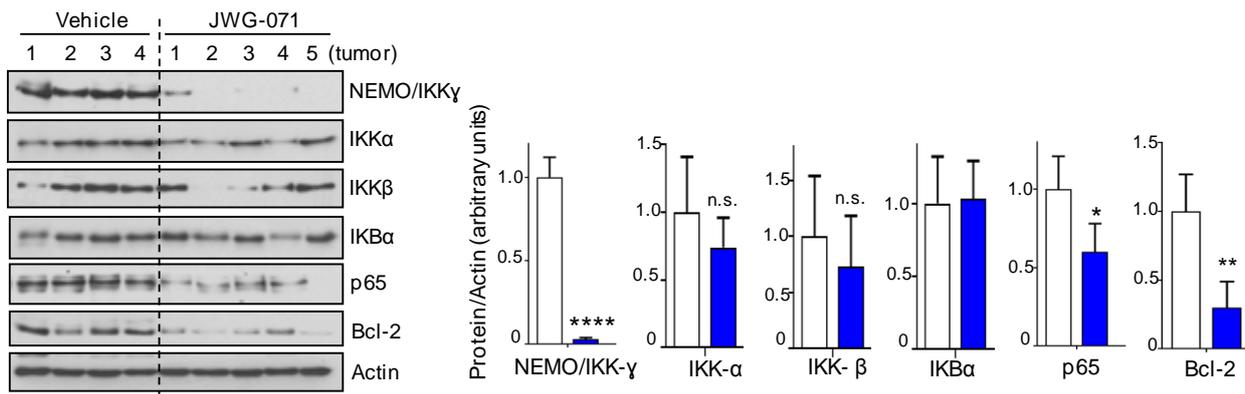


Figura 42. JWG-071 inhibe la vía canónica de NF-κB *in vivo* (tumores *xenografts* humanos de endometrio). Los niveles de las proteínas indicadas de los tumores *xenografts* endometriales (figura 41) fueron monitorizados mediante inmunoblot. Los histogramas muestran la cuantificación de los niveles de NEMO/IKKγ, IKK-β, IKK-α, IKBα, p65 y Bcl-2 normalizados con respecto a actina, de dos análisis de inmunoblot diferentes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, **** $P < 0.0001$ de los tumores tratados frente al vehículo.

Así pues, los resultados obtenidos *in vivo* apoyan a los generados en los modelos celulares, y muestran que la inhibición de ERK5 por JWG-071 compromete la actividad de NF-κB, lo que resulta en una muerte apoptótica.

3.5. JWG-071 sensibiliza frente a la quimioterapia estándar en cáncer endometrial y cervical. Efecto en líneas celulares.

Diversos autores han reportado que la modulación de la actividad de ERK5 sensibiliza al tratamiento quimioterapéutico. Así, la inhibición de ERK5 con XMD8-92 (que presenta actividad BRD4) sinergiza con docetaxel y/o doxorubicina en modelos animales de cáncer cervical, pulmonar (Yang et al., 2013), de mama triple negativo (Al-Ejeh et al., 2014) y de carcinoma de células escamosas de piel (Finegan et al., 2015); o con 5-fluorouracilo en modelos de cáncer colorrectal p53-dependientes (Pereira et al., 2016). Por ello, seguidamente se investigó si éste también era el caso para la nueva generación de inhibidores específicos de ERK5 que representa el JWG-071 (sin actividad BRD4). En nuestro caso, se estudió el efecto de JWG-071 como adyuvante de la acción antitumoral de la quimioterapia en cáncer de endometrio y, en menor medida, en cáncer cervical. En cáncer de endometrio, dos de los quimioterapéuticos estándares que se suelen administrar son paclitaxel y carboplatino (Colombo et al., 2016). En cáncer de cérvix, dos de los tratamientos recogidos como quimioterapia estándar son paclitaxel y cisplatino (American Cancer Society, Saslow et al., 2012).

En primer lugar, se obtuvieron valores de IC_{20} *in vitro* para JWG-071, paclitaxel y carboplatino en células de Ishikawa; y para JWG-071, paclitaxel y cisplatino en células HeLa, mediante curvas de viabilidad de MTT generadas después de 48 h de tratamiento (resultados no mostrados). Estas curvas sirvieron para obtener las concentraciones de fármaco a las que se obtenían los valores de IC_{10} e IC_{20} para cada uno de los fármacos, que fueron posteriormente utilizadas en los ensayos combinados de viabilidad celular. La **Figura**

43 muestra los resultados de los ensayos de viabilidad de cada tratamiento combinatorio en células HeLa e Ishikawa. Las tablas inferiores recogen el índice de combinación (CI) de cada par de tratamientos, determinado mediante el uso del software CompuSyn (Chou, 2010). El índice combinatorio (CI) es un valor que permite definir la acción de fármacos en combinación: $CI > 1$ implica antagonismo, $CI = 1$ muestra efecto aditivo y $CI < 1$ indica sinergia. En conjunto, estos resultados muestran que el tratamiento con JWG-071 sensibiliza a las células HeLa e Ishikawa frente a la quimioterapia estándar. En todos los casos, JWG-071 mostró un efecto sinérgico cuando se administró en combinación con cada uno de los fármacos quimioterápicos, aunque potenció mejor el efecto del paclitaxel en ambas líneas celulares.

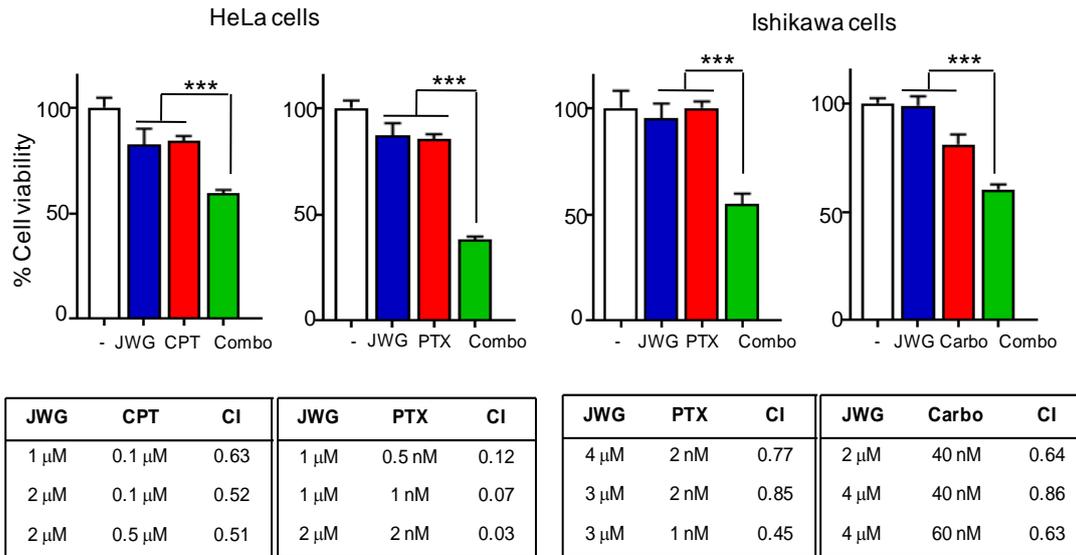


Figura 43. JWG-071 sensibiliza *in vitro* frente a la citotoxicidad inducida por quimioterápicos estándar utilizados en el tratamiento de cánceres ginecológicos. Ensayo de viabilidad celular (MTT) en células Ishikawa y HeLa que fueron tratadas durante 48 horas con JWG-071 y/o cisplatino (CPT), paclitaxel (PTX) o carboplatino (Carbo) a las concentraciones indicadas. Los valores corresponden a las medias \pm SD de ensayos realizados en cuatuplicado, y representativo de tres experimentos independientes. *** $P < 0.001$. Abajo se muestran los valores de índices de combinación (CI), calculados mediante el software CompuSyn.

Estos resultados fueron confirmados en ensayos de formación de colonias (clonogénicos). En células Ishikawa, el tratamiento con μ M JWG-071 y 1 nM paclitaxel (PTX) ó 2 μ M de carboplatino (Carb) resultó en una reducción de la formación de colonias del 60% respecto a los tratamientos únicos, que sólo supusieron un reducción del 20-30 %. En células HeLa, el tratamiento con 2 μ M JWG-071 (JWG) y 2 nM paclitaxel (PTX) ó 1 μ M de cisplatino (Cisp) resultó en una reducción de la formación de colonias del 60-90% con respecto a los tratamientos únicos que sólo redujeron en un 20-40 % la formación de colonias (**Figura 44**). Estos resultados reflejan que JWG-071 sensibiliza *in vitro* a la quimioterapia estándar.

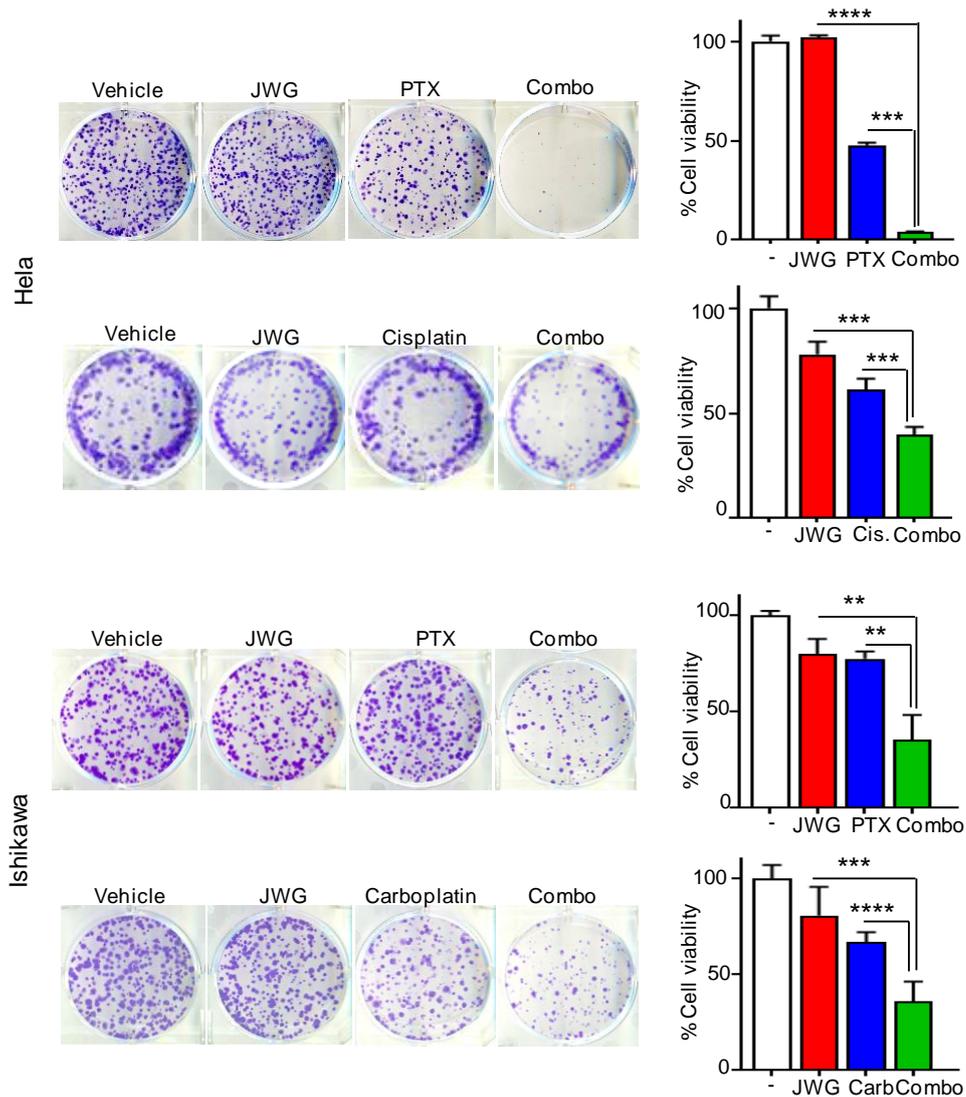


Figura 44. JWG-071 sinergiza con quimioterápicos estándar en ensayos clonogénicos de formación de colonias. Ensayo de formación de colonias. Células Ishikawa (1000/pocillo) o HeLa (800/pocillo) fueron sembradas, incubadas en medio completo y tratadas con JWG-071, paclitaxel, carboplatino y cisplatino a las concentraciones indicadas durante 14 días. Las colonias fueron visualizadas mediante tinción con cristal violeta (panel izquierdo) y cuantificadas (panel derecho). Se muestran los valores medios \pm SD de ensayos realizados en triplicado. ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Con la finalidad de estudiar la implicación de caspasa 3 en la potenciación de la citotoxicidad de la quimioterapia por JWG-071, se llevaron a cabo ensayos de inmunoblot donde se analizó la actividad de esta caspasa. La **Figura 45** muestra un aumento de los niveles de fragmentación de caspasa-3 y de su sustrato PARP en las células HeLa tratadas combinatoriamente con JWG-071 y paclitaxel, respecto a las tratadas con uno de los fármacos. La cuantificación de la señal obtenida para los fragmentos de caspasa-3 y PARP permitió establecer que JWG-071 sinergiza con paclitaxel en la activación de caspasa-3 (**Figura 45**).

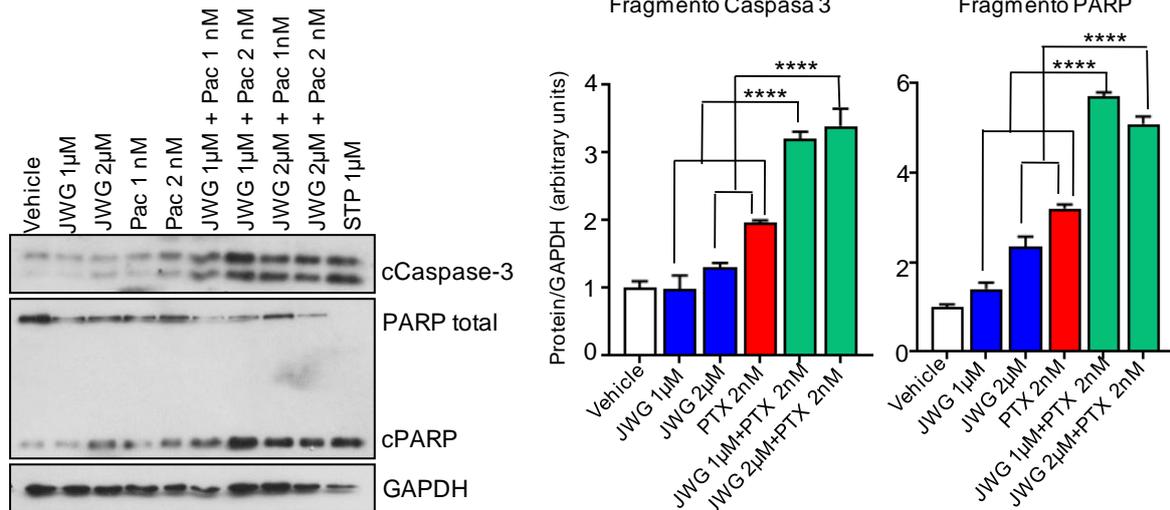


Figura 45. La inhibición de ERK5 potencia la apoptosis inducida por paclitaxel en células HeLa de cáncer de cérvix humano. Células HeLa fueron tratadas con 1 ó 2 µM JWG-071, solo o en combinación con 1 ó 2 µM de paclitaxel, durante 48h. Las células fueron lisadas y se analizaron por inmunoblot los niveles de proteínas apoptóticas fragmento de caspasa 3 y fragmento de PARP. Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos diferentes. Los histogramas muestran la cuantificación de los niveles de fragmento de caspasa 3 y fragmento de PARP normalizados con respecto a GAPDH. **** $P < 0.0001$.

3.6. JWG-071 sensibiliza frente a la quimioterapia estándar de tumores *xenografts* de cáncer endometrial.

Por último, y con la finalidad de estudiar el papel de JWG-071 como co-adyuvante de la quimioterapia estándar *in vivo*, se llevó a cabo un ensayo en ratones atímicos *nude*. Estos ratones fueron inyectados subcutáneamente con 4×10^6 células Ishikawa. Cuando los tumores alcanzaron un volumen aproximado de 100 mm^3 , se trataron intraperitonealmente con vehículo, una subdosis de JWG-071 (30 mg/Kg), paclitaxel (15 mg/Kg) o una combinación de ambos (**Figura 46A**). Las curvas correspondientes de los distintos grupos muestran una reducción del crecimiento tumoral en respuesta al tratamiento con JWG-071 o con paclitaxel, y que el tratamiento combinado con ambos fármacos resultó en una disminución significativa de los tumores, en comparación con los tratamientos monoterápicos (**Figura 46B y 46C**). De interés, el tratamiento combinado no generó toxicidad, tal y como se deduce de las correspondientes curvas de seguimiento del peso corporal de los ratones (**Figura 46D**) y de la inspección visual de los tejidos durante la necropsia. El correspondiente análisis inmunohistoquímico de los tumores permitió establecer la implicación de la apoptosis en el efecto antitumoral observado. Así, la cuantificación de la tinción para caspasa 3 activa (fragmento de caspasa 3) de cortes representativos muestra que el tratamiento con JWG-071 y paclitaxel resultó en un aumento significativo de los niveles tumorales de caspasa-3 fragmentada, en comparación con los tratamientos individuales (**Figura 46E**).

En conclusión, los resultados obtenidos *in vivo* apoyan los generados en los modelos celulares, y demuestran que JWG-071 potencia la acción antitumoral del paclitaxel en el modelo de cáncer endometriode, posiblemente debido a una acción sinérgica en la activación de la apoptosis tumoral.

Figura 46. JWG-071 potencia la acción antimoral de paclitaxel *in vivo* (xenografts humanos de endometrio). **A,** Esquema del protocolo utilizado para realizar este experimento *in vivo*. **B,** Curva de crecimiento tumoral. Se inyectaron subcutáneamente 4×10^6 células Ishikawa. Cuando los tumores alcanzaron un volumen aproximado de 100 mm^3 , se trataron i.p. diariamente con: vehículo, paclitaxel (PTX, 15 mg/kg), JWG-071 (JWG, 30 mg/kg) y paclitaxel + JWG-071 (combo). **C,** *Scatter Plot* del tamaño de los tumores donde las líneas horizontales indican la media de cada grupo (N=6). **D,** Curva de variación del peso de los ratones. N = 6 para cada condición. Se muestra los valores medios \pm SEM. Se obtuvieron datos de la medida tumoral y del peso cada dos días. **E,** Tinción inmunohistoquímica de fragmento de caspasa 3 de los tumores xenografts. Imágenes representativas de dos tumores diferentes para cada condición. Barra de escala, $100 \mu\text{m}$. El histograma muestra la cuantificación de 4 campos por tumor, y un total 6 tumores por grupo. Los resultados son la media \pm SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$

CAPÍTULO II

ROL DE ERK5 NUCLEAR EN LA RESISTENCIA AL TRATAMIENTO QUIMIOTERAPÉUTICO DEL NEUROBLASTOMA HUMANO

1. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA MAP QUINASA ERK5 EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO QUIMIOSENSIBLES Y QUIMIORRESISTENTES.

1.1. Localización subcelular de ERK5 y sensibilidad del NBL a inhibidores de EKR5 y quimioterápicos.

El neuroblastoma (NBL) es el tumor sólido pediátrico más común, y es responsable del 15% de todas las muertes por cáncer en niños (Park et al., 2008). A pesar de los avances para tratar esta enfermedad, la terapia estándar no ha cambiado en los últimos años y muchos de los pacientes de alto riesgo no responden a las terapias convencionales, o producen recidivas (Kramer et al., 2001; Matthay et al., 2003). Por tanto, hay una clara necesidad de nuevas y mejores terapias para abordar el tratamiento del neuroblastoma.

Umapathy y colaboradores mostraron que la inhibición farmacológica de ERK5 compromete la proliferación de células de NBL humano que presentan mutaciones en la quinasa del linfoma anaplásico ALK (Umapathy et al., 2014). Los autores mostraban que el inhibidor de ERK5 no específico XMD8-92 sinergiza con el inhibidor de ALK crizotinib en la reducción de la proliferación de líneas celulares NBL y en el crecimiento de *xenografts* de neuroblastoma humano *in vivo* (Umapathy et al., 2014). Sin embargo, este estudio no abordó el principal problema del tratamiento más frecuente del NBL infantil: el elevado grado de resistencia a la quimioterapia que presentan los tumores NBL sin amplificación de *ALK* (que son mayoría). En esta Tesis Doctoral, se ha realizado una caracterización bioquímica exhaustiva de ERK5 en líneas celulares quimiorresistentes y quimiosensibles de NBL humano. La posible relevancia de la vía de MEK5-ERK5 en NBL viene reflejada por el hecho de que los tumores humanos que expresan altos niveles de MEK5 muestran un peor pronóstico. Así, el análisis de las bases de datos genéticos de cBioportal mediante el algoritmo “R2: Genomics Analysis and Visualization Platform” muestra una menor supervivencia de los pacientes con altos niveles de MEK5 (Figura 47).

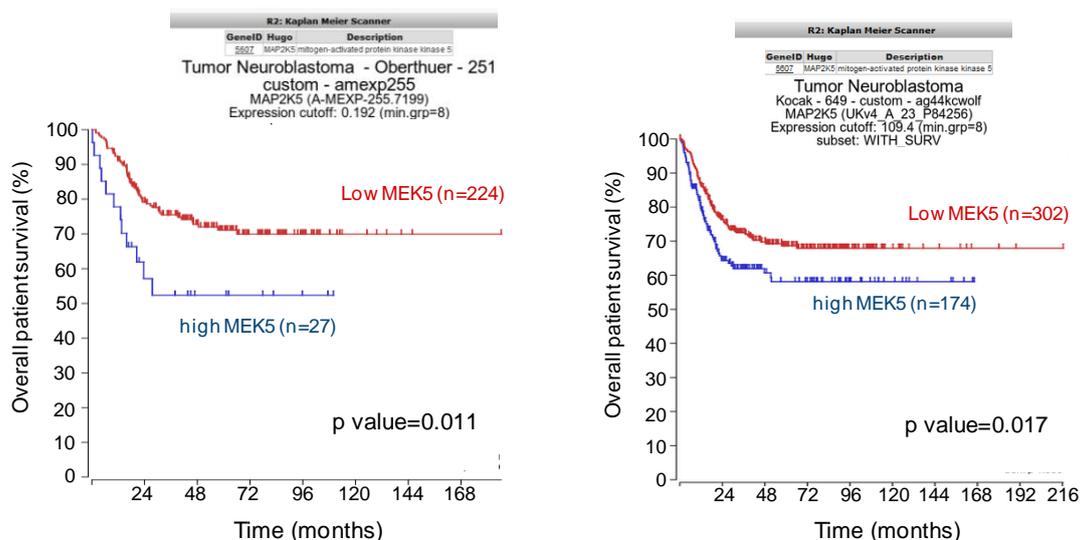


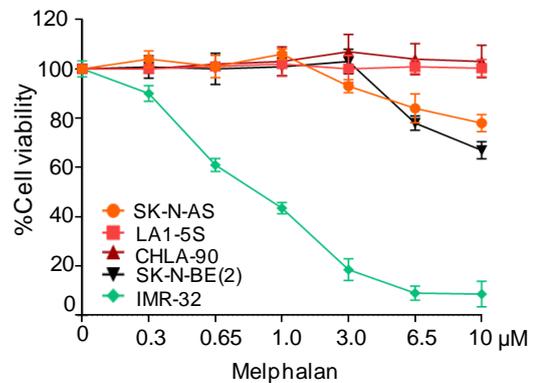
Figura 47. Altos niveles de MEK5 correlacionan con mal pronóstico de NBL humano. Representación Kaplan-Meier que muestra la supervivencia global de pacientes con cáncer de neuroblastoma, en función de una expresión de mRNA baja (rojo) o alta (azul) para MEK5. Se muestran los valores de *p-value*, obtenidos con la corrección de Bonferroni. Datos obtenidos de “R2: Genomics analysis and visualization platform” (<https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>).

En este trabajo se han utilizado 6 líneas celulares derivadas de NBL humano, obtenidas del laboratorio del Dr. M Segura (VHIR, Barcelona) (**Figura 48A**). Las células IMR-32 y SH-SY5Y son sensibles a diferentes agentes quimioterápicos, y presentan una p53 funcional. Por el contrario, las células SK-N-AS, CHLA-90, LA-15S y SK-N-BE(2) son resistentes a la quimioterapia, en gran parte debido a que presentan una p53 no funcional (mutada o delecionada). La amplificación del gen del factor de transcripción *MYCN* cursa con mal pronóstico en los pacientes de neuroblastoma (Schwab, 1985) y, de hecho, representa el marcador genético de riesgo mejor caracterizado en el neuroblastoma (Bown, 2001). Este hecho se tuvo en cuenta a la hora de seleccionar las células de NBL objeto de nuestro estudio, de tal manera que ambos grupos (quimiosensibles y quimiorresistentes) contuvieran líneas celulares con niveles de *MYCN* normal o amplificados. Por último, la **Figura 48B** muestra las correspondientes curvas de citotoxicidad para el agente alquilante melfalán, un quimioterápico de uso frecuente en el tratamiento del NBL (figura proporcionada por el Dr. M Segura).

A

Línea celular	p53 status	NMYC status	Quimioterapia
IMR-32	Funcional	Amplificado	Sensible
SH-SY-5Y	Funcional	No Amplificado	Sensible
SK-N-AS	No funcional	No Amplificado	Resistente
CHLA-90	No funcional	No Amplificado	Resistente
LA-15S	No funcional	Amplificado	Resistente
SK-N-BE(2)	No Funcional	Amplificado	Resistente

B



C

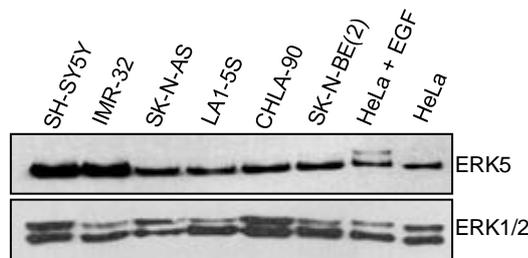


Figura 48. Caracterización de distintas líneas celulares de neuroblastoma (NBL) humano. **A**, Tabla resumen que muestra el estado de *TP53* y *MYCN*, así como la sensibilidad a quimioterapia de distintas líneas celulares de NBL humano. **B**, Efecto del quimioterápico Melfalán sobre la viabilidad de líneas celulares de neuroblastoma (NBL) humano. Ensayo de viabilidad celular (MTT) en distintas líneas de NBL que fueron tratadas durante 48 horas con Melfalán. **C**, Expresión de ERK5 en distintas líneas celulares de NBL humano. Las células fueron lisadas y los niveles de ERK5 analizados por inmunoblot.

En primer lugar, y mediante análisis de inmunoblot, se monitorizaron los niveles de expresión de ERK5 en las líneas celulares de NBL seleccionadas. Todas las líneas celulares expresan ERK5, si bien las células SH-SY5Y e IMR-32 (quimiosensibles) mostraron unos niveles de ERK5 elevados, en comparación con las líneas quimiorresistentes (**Figura 48C**). En ningún caso se observó la presencia de un doblete, característico de ERK5 activa.

A continuación, se analizó el efecto citotóxico de los inhibidores de ERK5 XMD8-92 y JWG-071 (**Figura 49A-B**). Estos ensayos permitieron constatar una mayor sensibilidad de las líneas IMR-32 y SH-SY5Y frente a los inhibidores de ERK5, en comparación con las líneas tumorales quimio-resistentes.

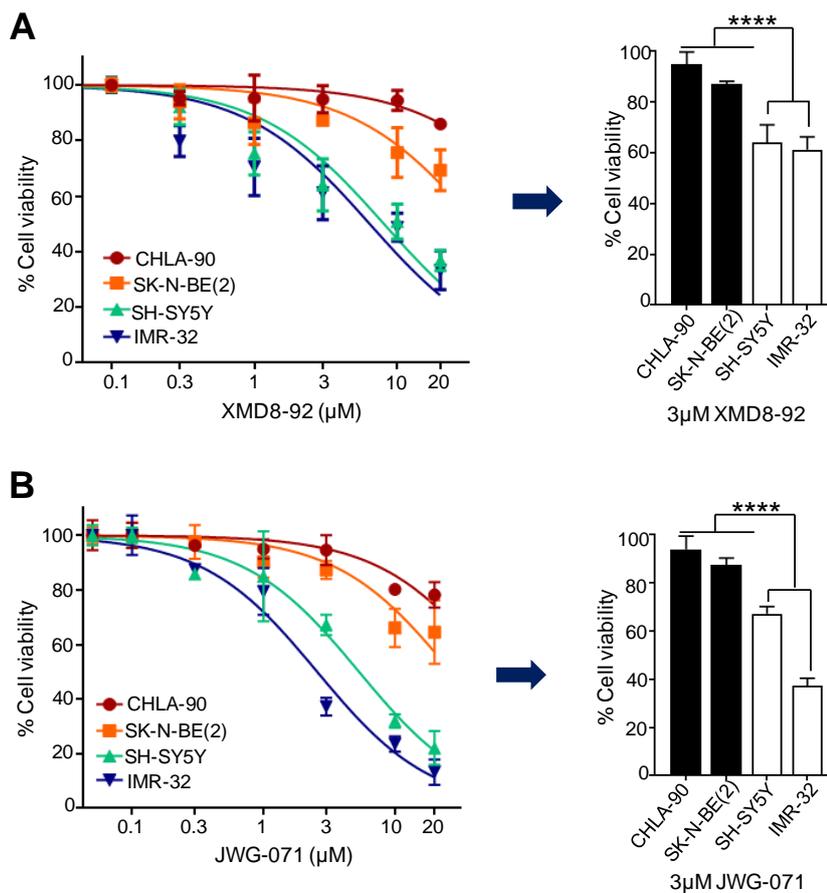


Figura 49. Efecto de la inhibición de ERK5 (XMD8-92 ó JWG-071) sobre la viabilidad de líneas celulares de neuroblastoma (NBL) humano. A-B, Ensayo de viabilidad celular (MTT) en distintas líneas de NBL que fueron tratadas durante 48 horas con XMD8-92 (A) o JWG-071 (B) a las concentraciones indicadas. Los valores corresponden a las medias \pm SD de ensayos realizados en cuadruplicado, y representativo de tres experimentos independientes.

En paralelo, se valoró el impacto de la localización subcelular de ERK5 en la sensibilidad a la quimioterapia y a la inhibición de ERK5. Para ello se llevaron a cabo ensayos de inmunocitoquímica y de fraccionamiento subcelular. Tanto los ensayos de inmunofluorescencia como los de fraccionamiento subcelular correspondientes mostraron una expresión de ERK5 mayoritariamente citosólica en las células quimiosensibles (SH-SY5Y e IMR-32), mientras que las líneas de NBL quimiorresistentes (SK-N-AS, LA-15S, CHLA-90 y SK-N-BE(2)) presentaron una ERK5 predominantemente nuclear (**Figura 50**).

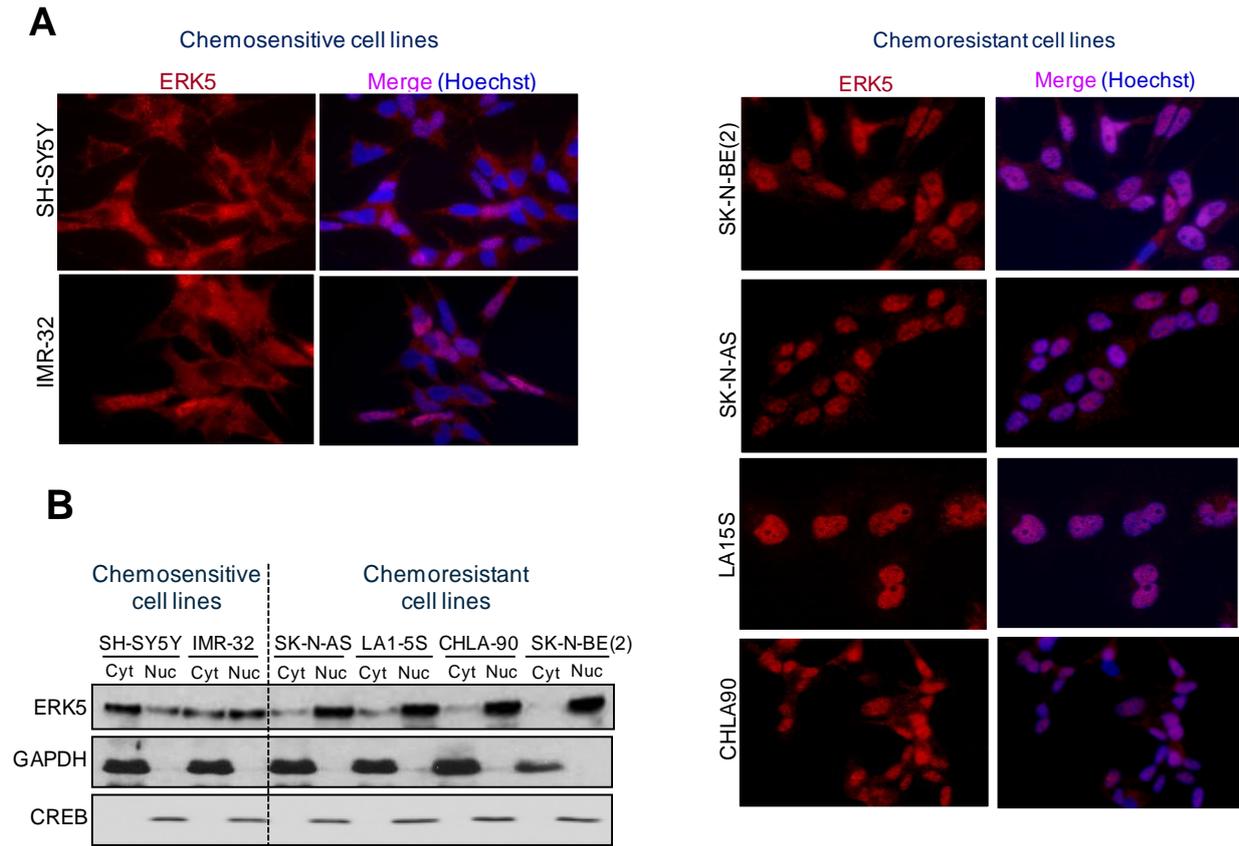


Figura 50. Localización subcelular de ERK5 en distintas líneas de neuroblastoma (NBL). **A**, Tinción inmunocitoquímica de ERK5. Las células fueron fijadas, incubadas con anticuerpo anti-ERK5, y la localización de ERK5 (rojo) fue monitorizada mediante microscopía de inmunofluorescencia confocal. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33259 (azul). Resultados representativos de dos cultivos celulares independientes. **B**, Fraccionamiento subcelular de distintas líneas de NBL humano. Se prepararon fracciones citosólicas y nucleares de las líneas celulares indicadas y los niveles de ERK5, GAPDH (marcador citosólico) y CREB (marcador nuclear) fueron analizados mediante inmunoblot. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes.

Los resultados presentados hasta el momento demuestran por primera vez que, con independencia del estado de *MYCN*, las líneas de NBL quimiosensibles (*p53* funcional) presentan una ERK5 mayoritariamente citosólica y mayor sensibilidad frente a la inhibición de ERK5. Por el contrario, las líneas de NBL quimiorresistentes (*p53* no funcional) presentan una ERK5 nuclear y resistencia a la inhibición de ERK5 (**Tabla 11**).

Línea celular	p53 status	NMYC status	Quimioterapia	Inhibición de ERK5	ERK5
IMR-32	Funcional	Amplificado	Sensible	Sensible	Citosolico
SH-SY-5Y	Funcional	No Amplificado	Sensible	Sensible	Citosolico
SK-N-AS	No funcional	No Amplificado	Resistente	Resistente	Nuclear
CHLA-90	No funcional	No Amplificado	Resistente	Resistente	Nuclear
LA-15S	No funcional	Amplificado	Resistente	Resistente	Nuclear
SK-N-BE(2)	No Funcional	Amplificado	Resistente	Resistente	Nuclear

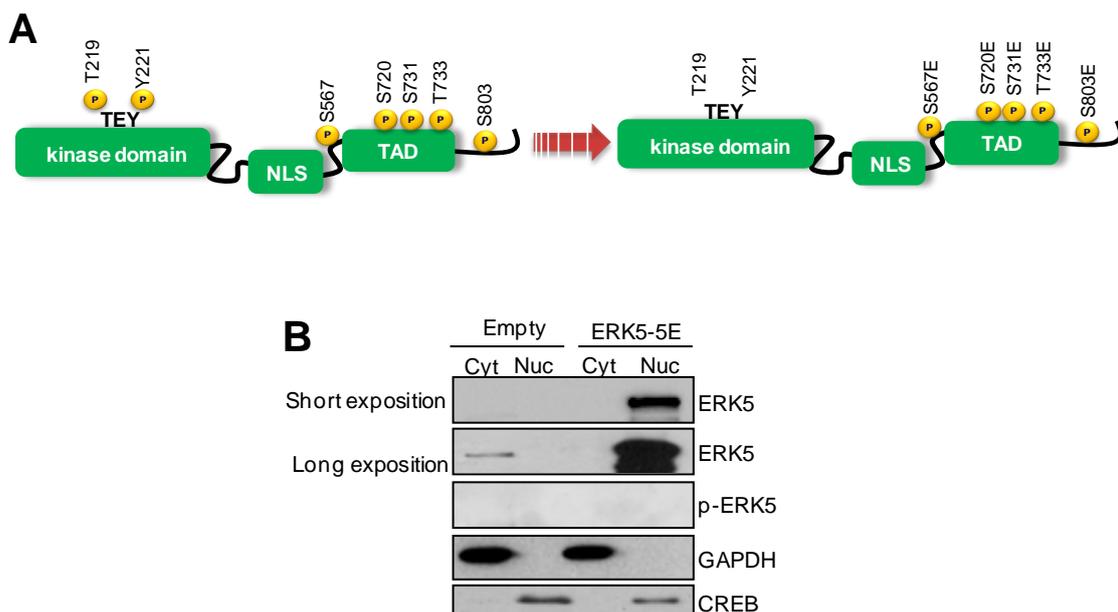
Tabla 11. Características de ERK5 en las líneas celulares de neuroblastoma (NBL) humano analizadas.

2. LA EXPRESIÓN DE ERK5 NUCLEAR EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA QUIMIOSENSIBLES CONFIERE RESISTENCIA AL CISPLATINO.

2.1. Caracterización de una forma de ERK5 constitutivamente nuclear.

La expresión de ERK5 nuclear correlaciona con malignidad y mal pronóstico en varios tipos de cáncer, incluido el cáncer de próstata hormono-dependiente e independiente (Ramsay et al., 2011), de mama (Montero et al., 2009) y hepatocarcinoma (Rovida et al., 2015). Dados nuestros resultados que mostraban una ERK5 nuclear en las líneas celulares de NBL quimio-resistentes, nos planteamos la posibilidad de que la localización nuclear de ERK5 mediara en esta resistencia. Para abordar esta hipótesis, se utilizó un mutante de ERK5 que presenta una localización constitutivamente nuclear, y se valuó el efecto de su sobreexpresión sobre la sensibilidad a quimioterapia en las líneas celulares IMR-32 y SH-SY5Y quimiosensibles.

En respuesta a factores de crecimiento o diferentes formas de estrés, MEK5 cataliza la activación de ERK5 mediante la fosforilación del motivo TEY del *loop* de activación. Una vez activada, ERK5 cataliza la fosforilación de su cola C-terminal en al menos 5 residuos de Ser/Thr. Esta autofosforilación induce un cambio conformacional de ERK5 que resulta en la exposición del motivo NLS y la consecuente translocación al núcleo (revisado en Gomez et al., 2016). En este trabajo hemos utilizado una forma de ERK5 (ERK5-5E) en la que los 5 residuos de autofosforilación (Ser⁵⁶⁷, Ser⁷²⁰, Ser⁷³¹, Thr⁷³³ y Ser⁸⁰⁶) han sido mutados a glutámico, cambio que mimetiza las cargas negativas del grupo fosfato y, por tanto, resulta equivalente a una ERK5 constitutivamente fosforilada en su C-terminal (**Figura 51A**). Los estudios iniciales con esta forma mutada de ERK5 mostraron que presentaba una localización constitutivamente nuclear en células Hela (Iñesta-Vaquera et al., 2010). Las **Figuras 51B-C** muestran los resultados obtenidos al sobreexpresar la forma ERK5-5E en las líneas celulares IMR-32 y SH-SY5Y quimiosensibles. Como cabía esperar, los ensayos de fraccionamiento subcelular y de inmunocitoquímica mostraron una localización citosólica de la ERK5 endógena, mientras que el mutante ERK5-5E sobreexpresado rindió una localización exclusivamente nuclear.



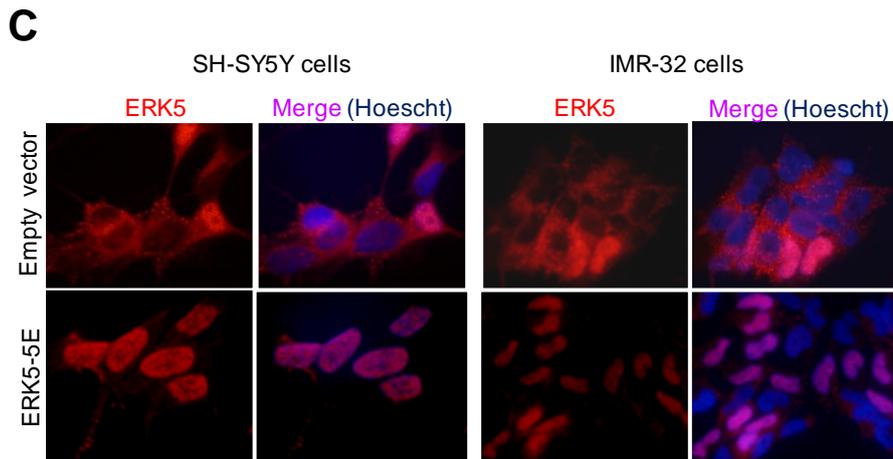


Figura 51. Caracterización del mutante constitutivamente nuclear de ERK5, ERK5-5E. **A**, Esquema del mutante ERK5-5E. Los 5 sitios de autofosforilación Ser/Thr en la cola C-terminal fueron mutados a ácido glutámico. **B**, Fraccionamiento subcelular. Células SH-SY5Y fueron transfectadas con vectores que expresan ERK5 wt o el mutante ERK5-5E fusionadas a GST. Se prepararon fracciones citosólicas y nucleares de células y los niveles de ERK5 se analizaron mediante inmunoblot. Las proteínas GAPDH y CREB fueron utilizadas como marcadores de la fracción citosólica y nuclear, respectivamente. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes. **C**, Tinción inmunocitoquímica de ERK5. Células SH-SY5Y o IMR-32 fueron transfectadas con vectores que codifican para ERK5 wt o el mutante ERK5-5E fusionadas a GST. Una vez fijadas, las células fueron incubadas con anticuerpo anti-GST y la localización de ERK5 (rojo) fue monitorizada mediante microscopía de inmunofluorescencia confocal. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33259 (azul). Resultados representativos de dos cultivos celulares independientes.

Los primeros trabajos fueron encaminados hacia la caracterización bioquímica del mutante ERK5-5E. En primer lugar, se determinó la actividad quinasa de este mutante en ensayos celulares. Para ello, las células IMR-32 y SH-SY5Y fueron transfectadas con vectores de expresión que codifican para ERK5 salvaje o el mutante ERK5-5E (fusionadas a GST), solos o co-transfectados con un vector que codifica para una forma constitutivamente activa de MEK5 (MEK5-DD). Las diferentes formas de ERK5 fueron purificadas mediante resina de afinidad (glutación-Sefarosa), y se determinó la actividad de ERK5 mediante ensayo radiométrico, utilizando ^{32}P -ATP y PIMtide como sustratos. En ambas líneas celulares, el mutante ERK5-5E rindió la misma actividad que la proteína ERK5 salvaje, tanto en condiciones basales como en aquellas células que mostraron activación de la actividad quinasa ERK5 en respuesta a la sobreexpresión de MEK5 (**Figura 52A**). Estos resultados demuestran que la mutación 5E no afecta a la actividad o a la activación de ERK5.

En paralelo, se valoró la actividad co-transcripcional del mutante ERK5-5E en ensayos de gen reportero que evalúan la actividad transcripcional de AP-1, un factor de transcripción que regula la proliferación celular y que es co-activado por ERK5 (Kato et al., 1997). Como cabía esperar, ERK5 salvaje mostró escasa actividad AP-1 en condiciones basales, y ésta aumentó entre 3-9 veces en respuesta a la sobreexpresión de MEK5-DD (que induce la translocación nuclear de ERK5) (**Figura 52B**). De acuerdo con los resultados que mostraban una localización nuclear, el mutante ERK5-5E mostró una alta actividad AP-1 basal, similar a la de ERK5 salvaje en presencia de MEK5-DD. De hecho, la co-transfección de MEK5-DD apenas resultó en un aumento del 0.1/0.25 veces de la actividad transcripcional de AP-1. Estos resultados muestran la

funcionalidad del mutante ERK5-5E como co-activador transcripcional en condiciones basales, y fueron confirmados mediante ensayos de proliferación. Así, y con el fin de evaluar la capacidad proliferativa del mutante ERK5-5E, se llevó a cabo un ensayo de proliferación en células SH-SY5Y. Las curvas de crecimiento de la **Figura 52C** muestran que la sobreexpresión del mutante ERK5-5E resultó en un aumento en la proliferación de estas células, comparado con aquellas que sobreexpresaron la proteína ERK5 salvaje.

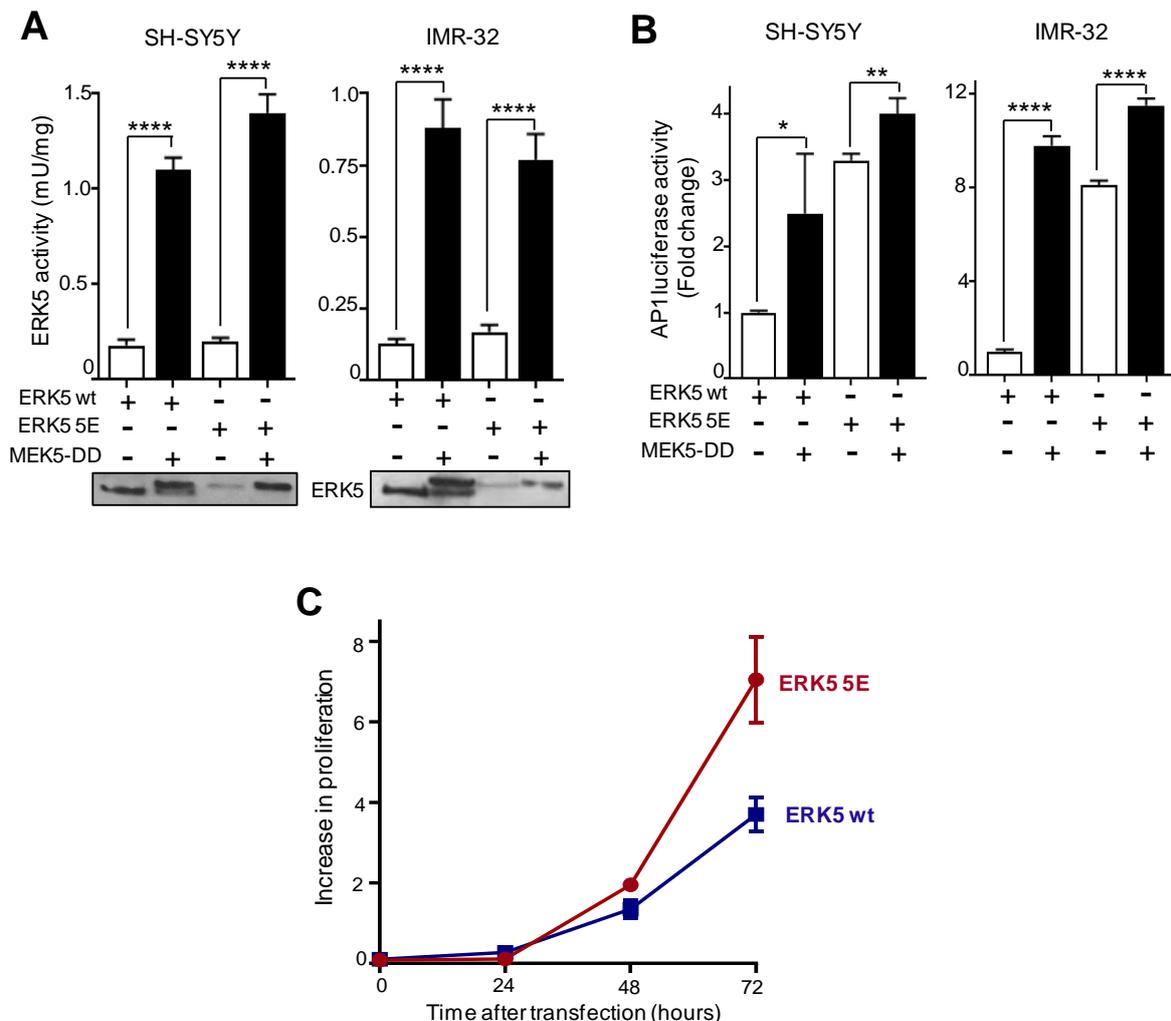


Figura 52. Caracterización de la actividad kinasa y transcripcional, y de la capacidad de inducir proliferación del mutante constitutivamente nuclear de ERK5, ERK5-5E. **A**, Ensayo de actividad kinasa. Células SH-SY5Y o IMR-32 fueron transfectadas con vectores que expresan ERK5 wt o el mutante ERK5-5E fusionadas a GST, en presencia/ausencia de una forma constitutivamente activa de MEK5 (MEK5-DD). Las proteínas de fusión fueron purificadas con resina de afinidad glutatión-Sefarosa, y la actividad ERK5 fue determinada mediante ensayo radiométrico, utilizando ^{32}P -[γ -ATP] y PIMtide como sustratos, según lo descrito en la sección Materiales y Métodos. **B**, Ensayo de actividad transcripcional. Las células fueron transfectadas como en **(A)**, juntamente con los vectores AP1-luciferasa, pRL-CMVRenilla. 48 h post-transfección las células fueron lisadas y se determinó la actividad luciferasa mediante ensayo gen reportero usando el kit *Dual Luciferase Reporter Assay* de Promega. Se muestran los valores medios \pm SD de tres experimentos diferentes, realizados en duplicado y normalizado utilizando los valores de la Renilla. ** $P < 0.005$. **C**, Ensayo de proliferación celular. **C**, Células SH-SY5Y fueron transfectadas con un vector que codifica para ERK5 salvaje (WT) o para el mutante ERK5-5E, y la proliferación celular se determina a los días indicados mediante ensayo de cristal violeta. Los valores son la media \pm SD de las determinaciones realizadas en triplicado.

2.2. ERK5 nuclear confiere resistencia al cisplatino.

Una vez establecida la localización nuclear constitutiva del mutante ERK5-5E, se investigó el papel de ERK5 nuclear en la resistencia a la quimioterapia. El tratamiento del neuroblastoma suele incluir una combinación de fármacos quimioterápicos, entre los que se encuentran: cisplatino o carboplatino, doxorubicina, topotecan, etoposido y melfalán (Smith & Foster, 2018). En nuestro caso elegimos el cisplatino, un agente alquilante basado en el platino. Para este fin, se utilizaron células SH-SY5Y e IMR-32, que presentan una ERK5 citosólica y sensibilidad a varios agentes quimioterápicos, incluido el cisplatino. Estas células fueron infectadas con los lentivirus que codifican para ERK5-5E, o para el correspondiente vector vacío (control), ambos incluyen GFP. Las células positivas para GFP fueron seleccionadas por citometría y la apoptosis inducida por cisplatino (10 μ M) en estas células fue cuantificada mediante análisis de citometría de flujo (tinción Anexina V-APC e yoduro de propidio). Como se aprecia en la **Figura 53**, el cisplatino indujo citotoxicidad en ambas líneas celulares (50% y 40% de células apoptóticas para células SH-SY5Y e IMR-32, respectivamente). De interés, la inducción de apoptosis por cisplatino fue significativamente inferior en aquellas células que sobre-expresaron el mutante ERK5-5E, lo que sugiere que ERK5 nuclear induce resistencia al cisplatino en células de NBL quimiosensibles.

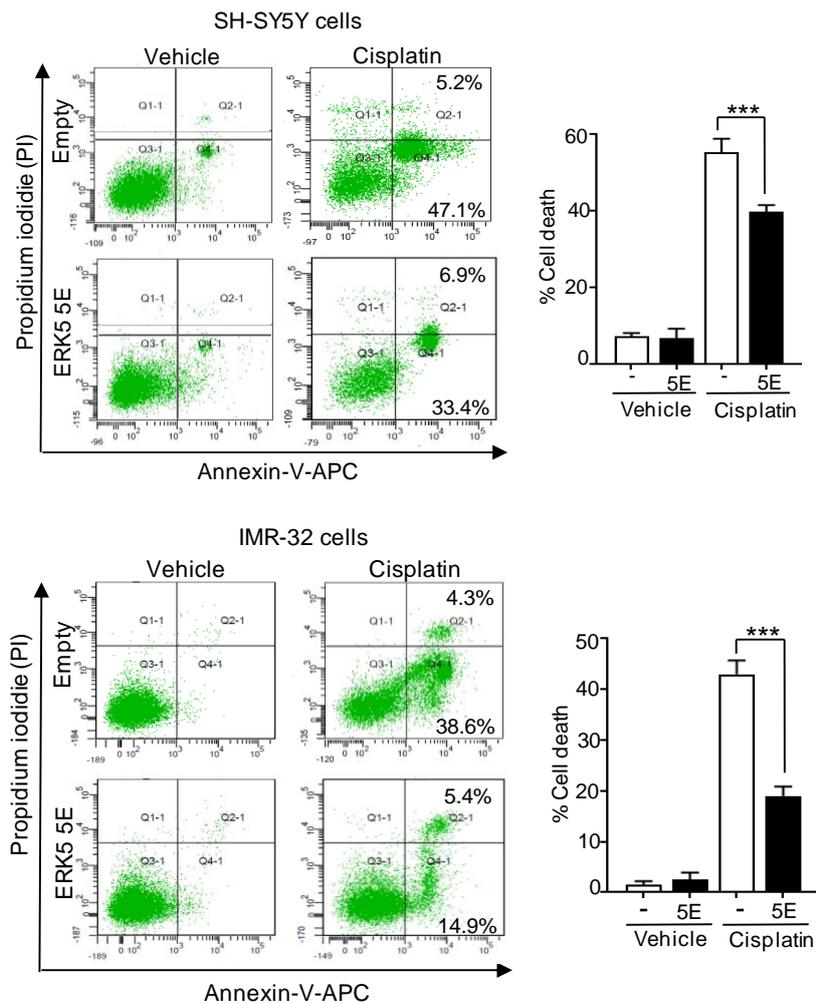


Figura 53. La sobreexpresión del mutante ERK5-5E confiere resistencia frente a la apoptosis inducida por cisplatino. Ensayos de citometría de flujo. Las células indicadas fueron lentivirus que el mutante ERK5-5E fusionado

a GFP o el correspondiente vector vacío unido a GFP (Empty). 72 h post-infección las células fueron tratadas con vehículo o cisplatino 10 μ M. Al cabo de 24 h, las células fueron tratadas con Anexina V y yoduro de propidio. Se muestran los resultados de los experimentos realizados en paralelo. Los histogramas representan el porcentaje de células muertas (apoptosis temprana y apoptosis tardía) obtenido en respuesta al tratamiento con vehículo o cisplatino. Se muestran los valores medios \pm SD de ensayos realizados en duplicado. *** $P < 0.001$

2.3. ERK5 nuclear confiere resistencia al cisplatino mediante un mecanismo dependiente de p53.

El cisplatino alquila las bases del ADN e induce roturas de la doble cadena, desencadenando una muerte celular apoptótica en la que p53 juega un papel importante (Galluzzi et al., 2012). El factor de transcripción p53 regula la expresión de una pléyade de genes, entre los que destacan aquellos implicados en el control de la apoptosis celular. Así, en células que presentan una p53 funcional (como es el caso de las líneas de NBL IMR-32 y SH-SY5Y), la acción del cisplatino induce la activación de la vía intrínseca apoptótica regulada por p53 (Lowe, 1995). Con la fin de investigar el papel de p53 en la adquisición de un fenotipo quimiorresistente por la sobreexpresión de ERK5 nuclear, seguidamente se estudió la vía apoptótica regulada por p53 en nuestros modelos celulares de NBL.

Como cabía esperar, en las células quimiosensibles IMR-32 y SH-SY5Y, el cisplatino indujo un aumento en los niveles proteicos de p53, de su diana pro-apoptótica PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) y de la fragmentación del sustrato canónico de caspasa 3 PARP (**Figura 54A**). De interés, la sobreexpresión mutante nuclear ERK5-5E resultó en una disminución significativa de los niveles de p53, PUMA y PARP fragmentada inducidos en respuesta al tratamiento con cisplatino (**Figura 54A**). Estos resultados sugerían que la expresión de ERK5 nuclear conferiría resistencia al tratamiento con cisplatino, debido a la inhibición de la actividad pro-apoptótica de p53. Para confirmar este punto, a continuación se investigó el efecto de ERK5 sobre la actividad transcripcional de p53, mediante ensayos de gen reportero utilizando una secuencia del promotor de p21 (una de las dianas canónicas de p53). Como muestra la **Figura 54B**, la sobreexpresión del mutante nuclear ERK5-5E resultó en una drástica reducción de la actividad transcripcional de p53 inducida por cisplatino (hasta casi niveles basales), tanto en células IMR-32 como en células SH-SY5Y.

Estos resultados, en su conjunto, demuestran que ERK5 nuclear confiere quimiorresistencia a la toxicidad por cisplatino en células de NBL quimiosensibles, mediante un mecanismo que implica la inhibición de la actividad transcripcional de p53 y, por tanto, en una inhibición de la vía apoptótica regulada por p53. Futuros trabajos determinarán si este efecto también se da para otros quimioterápicos utilizados en el tratamiento del neuroblastoma. De ser así, la localización nuclear de ERK5 (análisis inmunohistoquímico) podría ser utilizada como marcador de pronóstico de este tipo tumoral.

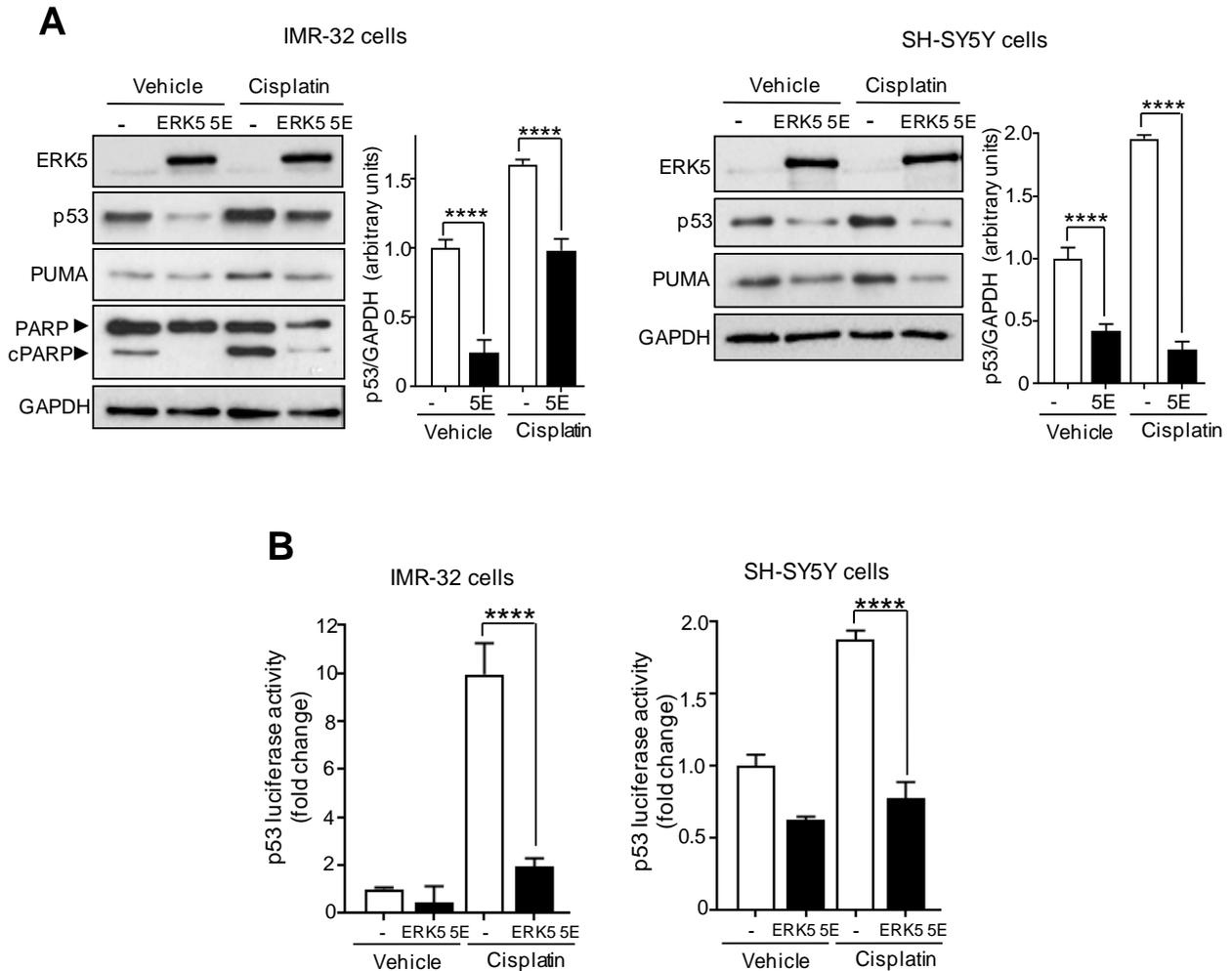


Figura 54. Rol de p53 en la resistencia al cisplatino en células NBL que sobreexpresan el mutante ERK5-5E. **A,** Células IMR-32 o SH-SY5Y indicadas fueron infectadas con lentivirus que expresan el mutante ERK5-5E o el correspondiente vector vacío (control). 4 días post-infección las células fueron tratadas con vehículo o cisplatino 10 μ M. Al cabo de 24 h, las células fueron lisadas y los niveles de las proteínas indicadas fueron monitorizados por inmunoblot. Los histogramas representan la cuantificación de la expresión de p53, normalizada utilizando los valores de GAPDH. Se muestran los valores medios \pm SD de dos ensayos independientes. **** $P < 0.0001$. **B,** Ensayo de actividad transcripcional de p53. Células IMR-32 o SH-SY5Y indicadas fueron transfectadas con vectores que expresan el mutante ERK5-5E o el correspondiente vector vacío (control), en combinación con los vectores p53-luciferasa (contiene el promotor del sustrato de p53 p21) y pRL-CMVRenilla. 24 horas post-transfección las células fueron tratadas con 10 μ M de cisplatino, y 24 horas después, las células fueron lisadas y se determinó la actividad luciferasa mediante ensayo gen reportero usando el kit *Dual Luciferase Reporter Assay* de Promega. Se muestran los valores medios \pm SD de dos experimentos diferentes, realizados en duplicado y normalizado utilizando los valores de la Renilla. **** $P < 0.0001$.

3. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE ERK5 SOBRE LAS CÉLULAS DE NBL QUIMIORRESISTENTES

3.1. El silenciamiento de ERK5 induce apoptosis en células de NBL quimiorresistentes.

Los resultados presentados hasta este punto muestran que las líneas de NBL quimiosensibles son también sensibles a la inhibición farmacológica de ERK5, mientras que las líneas quimiorresistentes muestran escasa sensibilidad a los inhibidores de ERK5 (ERK5i). La resistencia del neuroblastoma al tratamiento con diferentes agentes terapéuticos -generalmente una combinación de quimioterápicos- es un evento frecuente (Keshelava et al., 1998). Este hecho conlleva la necesidad de proponer nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de los neuroblastoma con peor pronóstico. En este sentido, diferentes autores han mostrado que, si bien la inhibición farmacológica de ERK5 no tiene impacto en la viabilidad de ciertos tumores agresivos, el silenciamiento génico de ERK5 sí que induce una potente citotoxicidad en estos tipos tumorales (revisado en Gomez et al., 2016; Stecca & Rovida, 2019). Estas observaciones apuntan a un rol de la actividad transcripcional de ERK5 (pero no de su actividad quinasa) en el mantenimiento de la proliferación y viabilidad de ciertos tipos tumorales. Por todo ello, nos propusimos investigar el efecto del silenciamiento de ERK5 en células de NBL quimiorresistentes y ERK5i-resistentes, que muestran una localización de ERK5 mayoritariamente nuclear. De las líneas con que se contaba, se escogieron las células CHLA-90 y SK-N-BE(2), por ser dóciles a la transfección y representar dos fenotipos importantes: NMYC amplificado (SK-N-BE(2)) y no amplificado (CHLA-90) (ver **Tabla 11**).

Las líneas celulares quimiorresistentes CHLA-90 y SK-N-BE(2) fueron infectadas con lentivirus que codifican para dos shRNAs diferentes de ERK5, o para un shRNA *scramble* (control), y se monitorizó la proliferación celular a diferentes días (hasta 5 días) mediante ensayo de cristal violeta. A diferencia de las células control, que presentaron una elevada tasa de proliferación mantenida durante todo el periodo contemplado, las células infectadas con cada uno de los shRNAs que codifican para ERK5 presentaron una tasa de proliferación nula a partir de las 48 horas post-infección (**Figura 55A**). El análisis por inmunoblot de los lisados de las células infectadas durante 3 y 4 días reveló una buena reducción de los niveles de expresión de ERK5 (90% para células SK-N-BE(2), 80% para las CHLA-90), sin afectar a los niveles de las MAP quinasas ERK1/2 (**Figura 55B**). De interés, el silenciamiento de ERK5 en ambas líneas celulares correlacionó con un aumento de los niveles de caspasa 3 y de su sustrato PARP fragmentado, además de una drástica reducción de los niveles de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (**Figura 55B**). En paralelo, se realizaron estudios de morfología nuclear, mediante tinción con Hoechst 33259. El silenciamiento de ERK5 (4 días) resultó en la aparición de un número significativo de núcleos con morfología típicamente apoptótica (20-35% para las células CHLA-90; 35-55% para las SK-N-BE(2) (**Figura 55C**). Estos resultados demuestran por primera vez que el silenciamiento de ERK5 compromete la viabilidad de células de NBL quimiorresistentes mediante la activación de muerte apoptótica, y abren la posibilidad de utilizar moléculas que induzcan la degradación de ERK5 (PROTACs) en el tratamiento del NBL quimiorresistente.

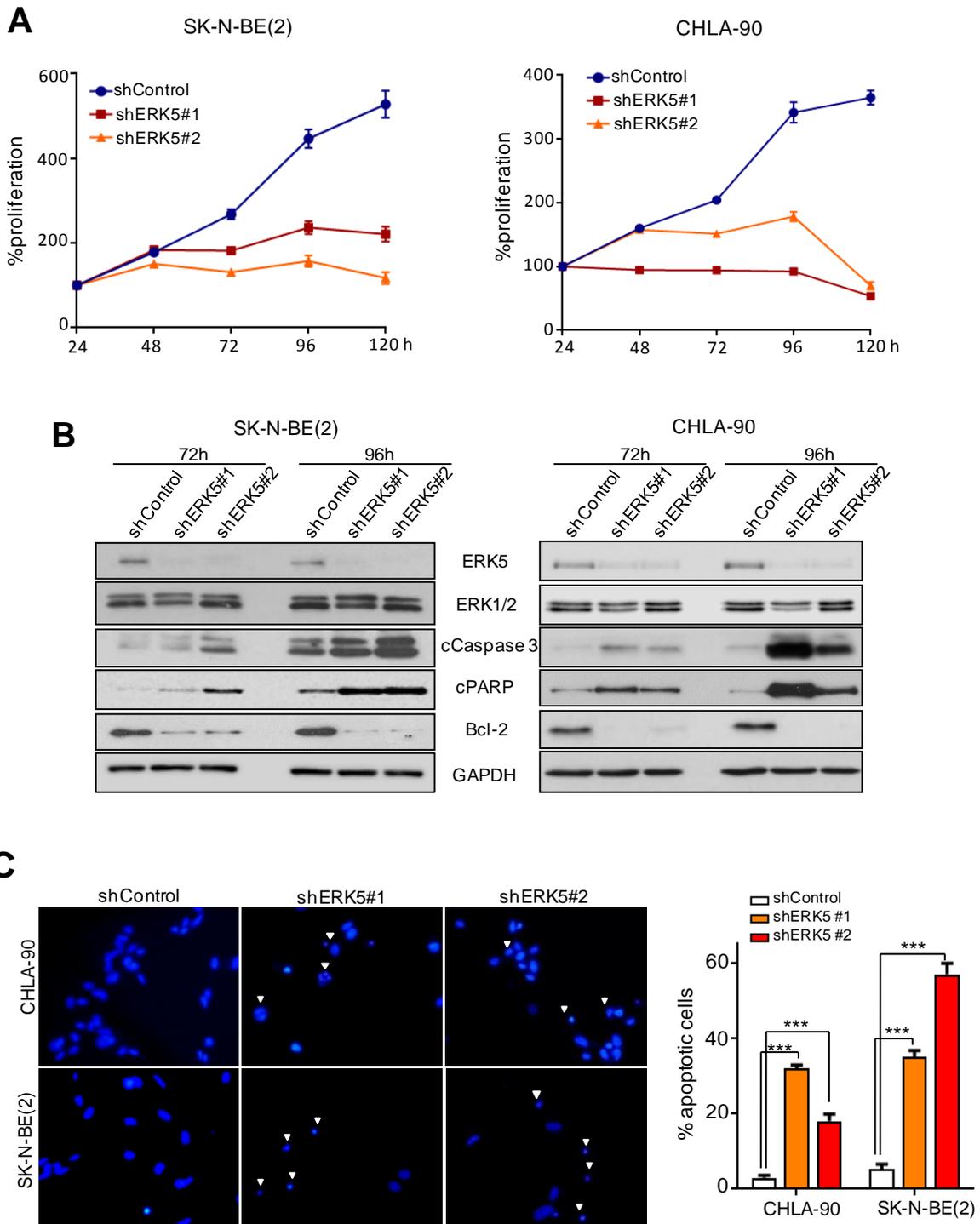


Figura 55. El silenciamiento de ERK5 inhibe la proliferación y activa la apoptosis de líneas de neuroblastoma quimiorresistentes. **A**, Ensayo de proliferación celular (cristal violeta). Células CHLA-90 o SK-N-BE(2) fueron infectadas con lentivirus control o dos lentivirus que codifican para dos shRNAs de ERK5. A los días indicados, las células fueron teñidas con cristal violeta. Se muestran los valores medios \pm SD de ensayos realizados por triplicado. **B**, Inmunoblot de lisados celulares infectados durante 72 ó 96 h con los lentivirus indicados. Resultados análogos fueron obtenidos en dos experimentos independientes. **C**, Microscopía de fluorescencia de núcleos teñidos con Hoechst 33259. Células CHLA-90 o SK-N-BE(2) fueron infectadas con lentivirus control o dos lentivirus que codifican para dos shRNAs de ERK5. A las 96 h, las células fueron fijadas y teñidas con Hoechst 33259 según el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Los histogramas muestran el porcentaje de núcleos apoptóticos. Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos independientes. El histograma muestra la cuantificación de 4 fotos por línea y condición.

3.2. Análisis del silenciamiento de ERK5 en la expresión génica de células NBL quimiorresistentes.

Con la finalidad de caracterizar el impacto del silenciamiento de ERK5 en células de neuroblastoma quimiorresistentes CHLA-90 y SK-N-BE(2), se llevó a cabo un estudio de la expresión génica mediante el uso de *microarrays* de cDNA. Para ello se utilizó el sistema *Human Clariom S Assay*, que permite monitorizar el nivel de expresión de más de 20,000 genes humanos bien anotados (ver la sección Material y Métodos).

En primer lugar, se valoró el efecto de la infección con los lentivirus shRNA-ERK5 en la expresión proteica de ERK5 a tiempos relativamente cortos, dado que se quería minimizar los cambios debido a la inducción de apoptosis. Como muestra la **Figura 56**, el silenciamiento fue muy leve a las 48h post-infección, mientras que 72h de infección resultaron en un silenciamiento más robusto, sobre todo en las células SK-N-BE(2). De interés, y como se esperaba, el silenciamiento de ERK5 no afectó a los niveles de p53 (estas células poseen una p53 no funcional). A continuación, se diseñó un experimento para cada línea celular, que fue infectada en triplicados independientes con el lentivirus shRNA control, con el lentivirus shRNA-ERK5#1 o con el lentivirus shRNA-ERK5#2. A las 72 horas las células se lisaron, se extrajo los mRNA totales, y una vez comprobada su pureza (**Anexo 1**), fueron retrotranscritos a cDNA. Los correspondientes cDNAs fueron hibridados en el *microarray* de DNA por el Servei d'Alta Tecnologia del Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR, Barcelona).

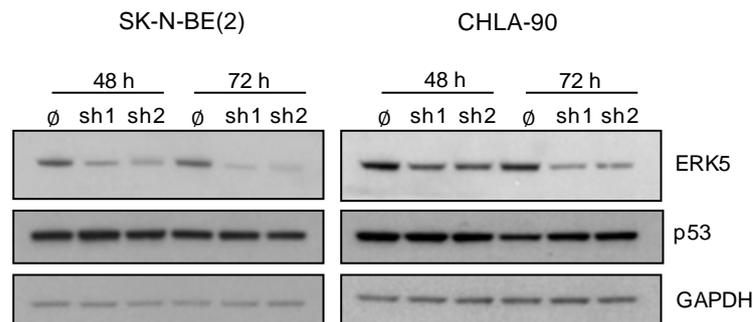


Figura 56. Efecto del silenciamiento de ERK5 (shRNAs) en los niveles de ERK5 en células quimiorresistentes SK-N-BE(2) y CHLA-90. Inmunoblot de lisados celulares infectados durante 48 ó 72 h con los lentivirus indicados. Resultados análogos fueron obtenidos en dos experimentos independientes.

En la **Figura 57** se presenta el análisis preliminar de los resultados. Se seleccionaron los genes cuyos cambios de expresión (\log_2) en respuesta al silenciamiento de ERK5 fueran mayor o menor de 2, y con un p -valor $< 0,05$. La **Figura 57A** presenta las correspondientes representaciones gráficas volcano para cada una de las líneas celulares analizadas. En el caso de las células SK-N-BE(2) se detectaron 387 genes con baja expresión y 393 genes con alta expresión, de un total de 21448 genes analizados. En el caso de las células CHLA-90, 449 genes mostraron una alta expresión y 326 una baja expresión. El análisis funcional de ontologías de enriquecimiento (*GO enrichment analysis*) reveló que los procesos mayormente alterados en ambas líneas en respuesta al silenciamiento de ERK5 fueron (por orden): repuesta celular a estímulo; procesos metabólicos y transporte celular (**Figura 57B**).

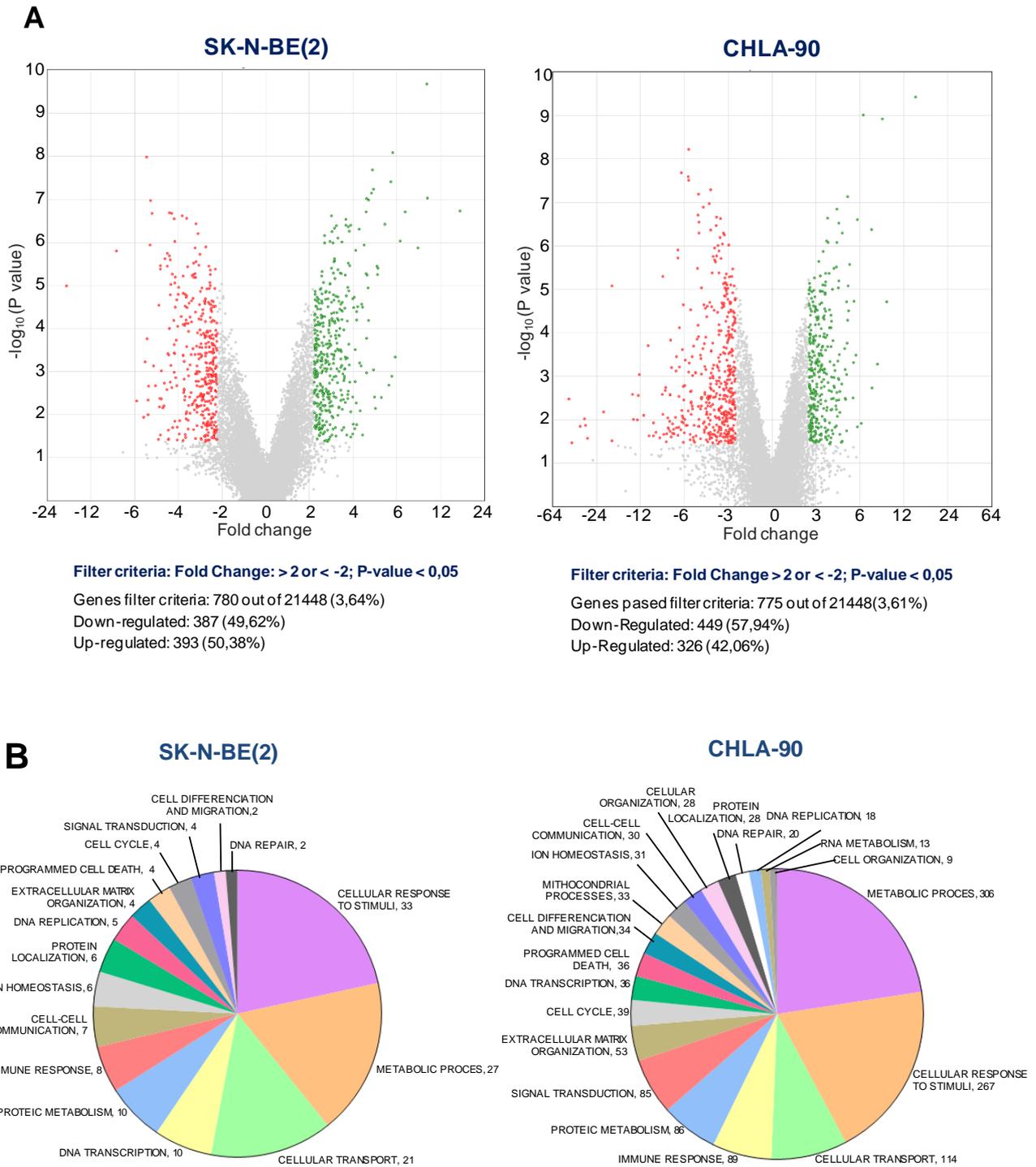


Figura 57. Análisis de los cambios en la expresión génica en respuesta al silenciamiento de ERK5 en células de NBL. A, Representación volcano de los cambios en los genes comunes al silenciamiento con el shERK5#1 y shERK5#2. Criterio utilizado: p-value < 0.05 y *Fold change* < 2. **B,** Procesos biológicos GO alterados. Análisis realizado mediante el software *GO enrichment analysis* (<http://geneontology.org/docs/go-enrichment-analysis/>). Los números indican la cantidad de genes alterados para cada proceso.

Durante el análisis de los datos generados se detectó un comportamiento homogéneo de los triplicados generados por el shRNA-ERK5#1 y por el shRNA-control, tanto en la línea CHLA-90 como en la SK-N-BE(2). Los resultados obtenidos para el shRNA-ERK5#2 fueron dispares, con relativamente escasa reproducibilidad entre los triplicados. Por ello, a la hora de identificar qué genes comunes cambiaban en ambas líneas celulares en respuesta al silenciamiento de ERK5, se trabajó con los datos generados con shRNA-ERK5#1 y el shRNA-control. El diagrama visual (*Heat map*) correspondiente muestra la homogeneidad de los resultados triplicados para cada caso, donde se observan diferentes *clusters* conservados que se mantienen en ambas líneas celulares (**Figura 58A**). De interés, aproximadamente el 66% de los genes comunes para ambas líneas celulares presentaban una baja expresión relativa como consecuencia del silenciamiento de ERK5. Dado que mayoritariamente se detectaron cambios en los mismos genes, y a falta de confirmación en más líneas celulares de NBL quimiorresistentes, estos resultados sugieren que los cambios en la expresión génica serían independientes de la amplificación de *NMYC*.

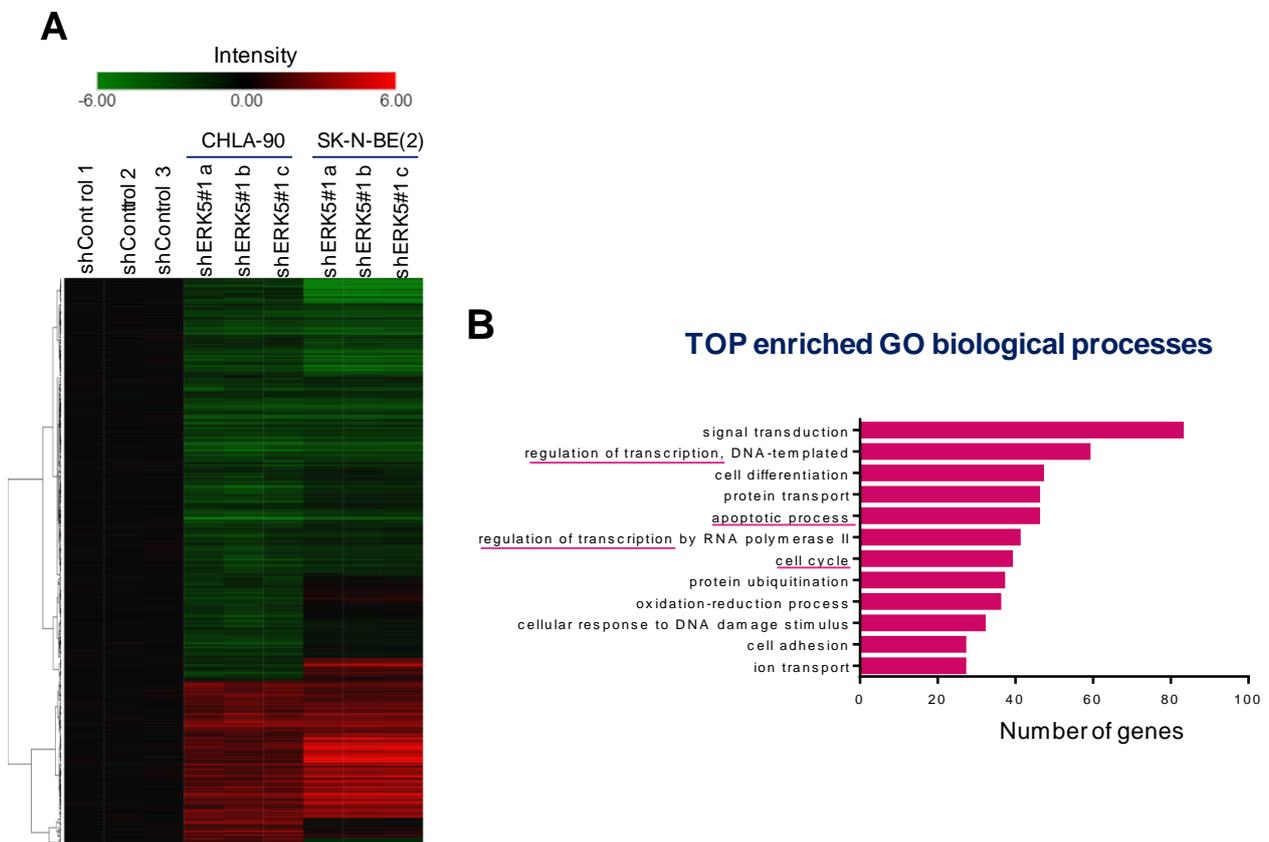


Figura 58. Análisis de cambios en la expresión génica en respuesta al silenciamiento de ERK5 con shERK5#1. A, Diagrama visual (*Heat map*) de cambios en la expresión génica en células CHLA-90 y SK-N-BE(2). Criterio utilizado: p -value < 0.05 y $Fold\ change$ < 2. **B,** Los 12 principales procesos biológicos GO alterados comúnmente en células CHLA-90 y SK-N-BE(2). Análisis realizado mediante el software *GO enrichment analysis* (<http://geneontology.org/docs/go-enrichment-analysis/>)

La **Figura 58B** muestra los resultados del análisis específico de ontologías de enriquecimiento de los 12 procesos biológicos más comúnmente alterados en ambas líneas celulares. Destacan: transducción de señal, regulación de la transcripción (de acuerdo con el papel de ERK5 como co-activador transcripcional), ciclo celular y apoptosis. Por último, en la (**Figura 59**) se muestra la expresión diferencial del *cluster* de genes reguladores de apoptosis afectados por el silenciamiento de ERK5 en ambas líneas de NBL quimiorresistentes, que engloba a genes como *Bcl-2*, *BAD* y *Mdm2*, entre otros. Cabe destacar que un grupo importante de ellos también está implicado en la regulación de la autofagia celular, como *AATG4D*, *TP53INP2*, *VPS39* o *PI3KCB*.

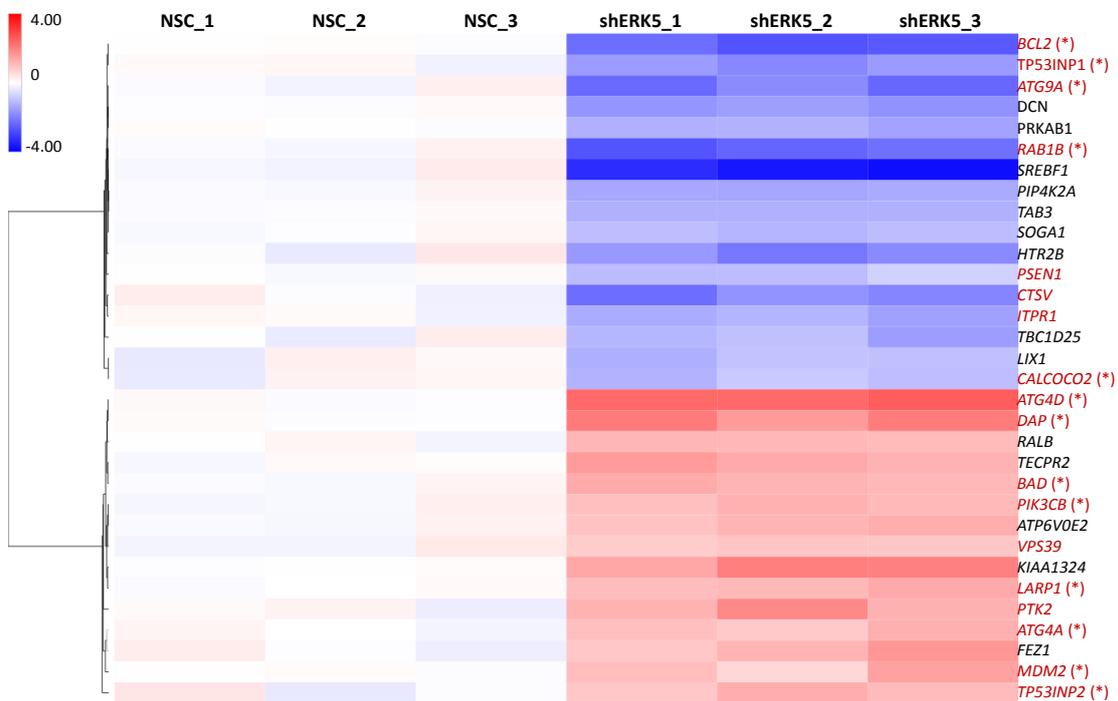


Figura 59. Análisis de cambios en la expresión de genes reguladores de muerte celular en respuesta al silenciamiento de ERK5 (shRNA5#1) en células CHLA-90. Diagrama visual (*Heat map*) resultante de enriquecimiento funcional de genes relacionados con muerte celular (apoptosis). Criterio utilizado: p-value < 0.01 y *Fold change* < 2. (*) denota genes cuya expresión también varía en células SK-N-BE(2) en respuesta a la infección con shRNA5#1.

DISCUSIÓN

1. ACTIVIDAD QUINASA DE ERK5 COMO DIANA ANTITUMORAL EN CÁNCER DE ENDOMETRIO.

Durante los últimos años se han desarrollado varios inhibidores de ERK5 ATP-competitivos. La mayoría de estos compuestos se han sintetizado a partir de un grupo central de pirimido-benzodiazepinona ya que un perfil de selectividad reveló que los análogos de pirimido-benzodiazepinona presentaban gran afinidad por el centro activo de ERK5 (Deng et al., 2011). Hasta la fecha, XMD8-92 es el inhibidor de ERK5 más ampliamente utilizado. Este compuesto presenta un grupo central de pirimido-benzodiazepinona y es un análogo de ATP: inhibe ERK5 al competir con la fijación del ATP en el lazo catalítico e impedir la conformación activa (cerrada) del dominio quinasa (Yang et al., 2010). Sin embargo, a pesar de su aparente especificidad por ERK5, XMD8-92 y otros inhibidores de ERK5 (como el ERK5-IN-1) se unen al dominio de unión acetil-lisina del co-activador transcripcional BRD4 e inhiben su actividad (Wang et al., 2018). Este hecho también se da para numerosos inhibidores de proteínas quinasas ATP-competitivos (Ember et al., 2014). Dado que BRD4 ha sido caracterizado como una diana terapéutica contra el cáncer (Ciceri et al., 2014), estas observaciones han supuesto que se cuestione la actividad ERK5 como diana antitumoral (Lin et al., 2016), y la necesidad de sintetizar una nueva generación de inhibidores de ERK5 sin actividad BRD4.

En este trabajo, y en colaboración con el grupo del Prof. N. Gray (Harvard Medical School), hemos desarrollado la molécula JWG-071, un inhibidor específico de ERK5 sin actividad BRD4. Para ello se han realizado estudios de estructura-actividad en donde se introdujeron distintos sustituyentes en el *core* de pirimido-benzodiazepinona, y se determinó la especificidad por ERK5 y BRD4. La especificidad por ERK5 se consiguió mediante la introducción de un grupo *sec*-butilo en la posición R1 y un metilo en posición R2 del anillo de 7 miembros del grupo pirimido-benzodiazepinona (**Figura 13A**). La presencia de un metilo en posición R2 es esencial para la unión a ERK5 y BRD4, mientras que la adición de sustituyentes alquílicos progresivamente mayores en R1, da lugar a una menor afinidad por BRD4 y LRRK2, sin afectar a la inhibición de ERK5. En definitiva, la introducción de un grupo alquílico voluminoso en R1 provoca impedimento estérico con la hélice α_c de BRD4, lo que dificulta su unión sin afectar a la unión de ERK5 (**Figura 13B**).

JWG-071 es un potente inhibidor de ERK5, y presenta unos buenos valores de IC_{50} (88 nM en ensayo radiométrico con ERK5 proteína pura) y de EC_{50} (20-60 nM para la inhibición de la actividad de ERK5 inducida por EGF) (**Figura 17**). Estos valores son similares a los obtenidos para el inhibidor más potente obtenido hasta la fecha, AX-15836 (**Figura 13**), y mejores que los reportados para los restantes inhibidores de ERK5 que muestran actividad BRD4, como XMD8-92 (IC_{50} 190 nM, Yang et al., 2010) o ERK5-IN-1 (IC_{50} 162 nM, Deng et al., 2013).

JWG-071 es altamente selectivo para ERK5, si bien también muestra afinidad por las proteínas quinasas LRRK2 y DCLK1 (como ocurre para otros inhibidores de ERK5 derivados de pirimido-benzodiazepinonas (Deng et al., 2013). LRRK2 es una proteína rica en leucina que se encuentra frecuentemente hiperactivada en pacientes de Parkinson (Zimprich et al., 2004). Su activación contribuye a la patogénesis de la enfermedad de Parkinson, y no se ha relacionado con la supervivencia y proliferación de la célula tumoral.

DISCUSIÓN

A diferencia de LRRK2, DCLK1 juega un papel relevante en cáncer ya que favorece la migración, la invasión y la metástasis del tumor (Liu et al., 2019). Por lo tanto, la interpretación de los resultados obtenidos sobre el efecto del JWG-071 en la viabilidad o proliferación celular exige considerar la posible implicación de DCLK1.

JWG-071 presenta unas excelentes propiedades farmacocinéticas, tanto por vía intraperitoneal como por vía oral (**Figura 20**). Su administración sistémica no genera toxicidad en modelos murinos, incluso en combinación con quimioterapia (**Figura 21B, 23C, 41C y 46D**). En comparación con los inhibidores de ERK5 de primera generación, la administración sistémica de JWG-071 requiere una única dosis diaria de 50 mg/Kg (**Figura 41**). En contraposición, XMD8-92 presenta unas propiedades farmacocinéticas mediocres y debe administrarse en dos dosis diarias de 25 mg/Kg cada una de ellas (Yang et al., 2010). AX-15836, por su parte, presenta problemas de solubilidad, lo que ha impedido su uso en modelos animales (Lin et al., 2016). Nuestros resultados, en definitiva, presentan a JWG-071 como una excelente herramienta para el estudio del papel de ERK5 en la fisiología tumoral, y apoyan el desarrollo clínico de esta molécula.

1.1. Proliferación celular mediada por ERK5.

Aunque en la literatura específica existía cierto consenso sobre el hecho de que ERK5 regula la proliferación de la célula tumoral, recientes trabajos han puesto en cuestión esta afirmación. Así, ERK5 es prescindible para la proliferación de células de mieloma múltiple MM-1S mediada por IL-6 (Lin et al., 2016). Por otra parte, ERK5 no media en la proliferación de células de cáncer colorrectal que muestran mutaciones activantes en *KRAS* o *BRAF* (Lochhead et al., 2016).

Nuestros resultados muestran que ERK5 juega un papel relevante en la proliferación basal del cáncer ginecológico endometrial y cervical, ya que el tratamiento con JWG-071 inhibe la proliferación basal de células Ishikawa (adenocarcinoma endometrial) y Hela (adenocarcinoma de cérvix) (**Figura 15 y 16**), y la delección de *MEK5* (CRISPR-Cas9) resultan en una reducción significativa de su proliferación basal (**Figura 22**). Los correspondientes experimentos *in vivo* muestran que JWG-071 reduce significativamente el crecimiento de los tumores *xenografts* de células Ishikawa (**Figura 21A**). Estos resultados han sido confirmados en experimentos *in vivo*, utilizando células Ishikawa CRISPR/Cas9 *MEK5*^{-/-}, que produjeron tumores *xenografts* que mostraban una menor tasa proliferativa, comparados con los obtenidos a partir de células Ishikawa *MEK5* WT (**Figura 23A y 23D**).

Existen otros modelos donde la inhibición de la actividad quinasa ERK5 afecta a la proliferación de células tumorales. Por ejemplo, en adenocarcinoma de próstata, el silenciamiento de *MEK5* reduce la proliferación celular, y los correspondientes tumores *xenografts* de células PC3 muestran una significativa reducción del crecimiento, comparados con aquellos que poseen *MEK5* (Broustas et al., 2019). En células de cáncer colorrectal, la expresión de un mutante doble negativo de *MEK5*, o la baja expresión de ERK5, resultan en una disminución de la capacidad proliferativa, migratoria e invasiva, debida a la inhibición de la vía de NF- κ B (Simões et al., 2015; Borralho et al., 2011). Otro ejemplo lo constituye, el paradigma del hepatocarcinoma, donde el tratamiento sistémico con XMD8-92 o el silenciamiento de ERK5 reducen el crecimiento de tumores *xenografts* de células HepG2 y Huh-7, al reducir los niveles de c-REL. c-REL es un

factor de transcripción de la familia NF- κ B relevante para la proliferación celular del HCC (Rovida et al., 2015). Por último, la inhibición (XMD8-92) o el silenciamiento de ERK5 disminuyen la proliferación de células de cáncer de mama triple negativo o luminal, al inducir el arresto del ciclo celular en fase G1/S mediado por una reducción de los niveles proteicos de ciclina D1 (Mulloy et al., 2003) y un aumento de los niveles de mRNA de p21 (regulados por c-myc) (Perez-Madrigal et al., 2012). En nuestro caso, el tratamiento con JWG-071 provocó un aumento de los niveles de p21 y una disminución de los niveles de ciclina D3, CDK4/6 (**Figura 16B**) y p65/NF- κ B (**Figura 34A**), acompañado de una reducción de la tasa proliferativa basal (**Figura 16A**). Futuros experimentos deberían evaluar los niveles de expresión de proteínas de ciclo celular (p21, ciclinas y CDKs) en células Ishikawa MEK5^{-/-} y células Ishikawa MEK5^{+/+}, con el fin de establecer si la delección de MEK5 se traduce en una afectación del ciclo celular que pueda explicar el menor crecimiento tumoral.

Por otra parte, y dado el papel de ERK5 en la señalización del factor del endotelio vascular VEGF, será importante considerar si la reducción de la proliferación tumoral observada en nuestros modelos es debida a una menor vascularización de los tumores. La vía de MEK5-ERK5 regula la angiogénesis embrionaria y es crítica para la integridad vascular (Sohn et al., 2002), mediante el control de la expresión de VEGF (Sohn et al., 2002). En modelos de melanoma y carcinoma de pulmón de Lewis, la delección específica de ERK5 endotelial (KO condicional) resulta en una menor densidad vascular y reducción del tamaño de los tumores, debido a que las células endoteliales ERK5^{-/-} no responden a los estímulos angiogénicos (Hayashi et al., 2005). En este sentido, será interesante investigar si los tumores tratados con JWG-071, o aquellos generados con células Ishikawa MEK5^{-/-}, muestran una menor vasculogénesis (análisis inmunohistoquímico de los marcadores CD31 y CD34) y si ésta es debida a una menor expresión de factores proangiogénicos como el VEGF.

ERK5 media en la proliferación de células de cáncer ginecológico inducida por EGF.

En uno de los primeros trabajos realizados sobre la funcionalidad de ERK5, Kato y colaboradores demostraron que la actividad quinasa de ERK5 media en el aumento de proliferación inducido por el factor de crecimiento epidérmico EGF (Kato et al., 1998). Utilizando un mutante negativo de EKR5 (sin actividad quinasa), estos autores observaron que en respuesta a EGF, ERK5 fosforila a MEF2C, lo que promueve la transcripción de c-Jun, un factor de transcripción esencial en la proliferación celular (Kato et al., 1998). Sin embargo, este trabajo fue realizado antes de la obtención de inhibidores de ERK5 y del desarrollo de la tecnología que permite el silenciamiento génico de ERK5 en líneas celulares. De hecho, y como se ha indicado arriba, las conclusiones extraídas en este trabajo han sido cuestionadas por varios autores, y actualmente existe un debate sobre el papel de ERK5 la proliferación celular de la célula tumoral (Lin et al., 2016; Lochhead et al., 2016).

En esta Tesis, hemos estudiado el efecto de la inhibición de JWG-071 en la proliferación celular inducida por EGF, en líneas celulares de adenocarcinoma cervical (HeLa) y endometrial (Ishikawa). La proliferación de estas líneas celulares depende de la señalización de EGF (Berkers et al., 1991; Gong et al., 1991), como ocurre con los correspondientes tumores ginecológicos, que suelen concurrir con sobreexpresión del receptor de EGF (EGFR) (Reyes et al., 2014). Nuestros resultados muestran que la inhibición específica de

DISCUSIÓN

ERK5 por JWG-071 o por AX-15836, así como la delección (CRISPR-Cas9) de MEK5, reducen significativamente la proliferación inducida por EGF (**Figura 17 y 19**). Mecanísticamente, JWG-071 inhibe la translocación nuclear de ERK5 inducida por EGF y su actividad como co-activador transcripcional de AP-1 (**Figura 18**). La proteína activadora 1 (AP-1) es un factor de transcripción que regula la expresión génica en respuesta a una gran variedad de estímulos extracelulares, como factores de crecimiento o citoquinas (Latchman, 1997). AP-1 controla diversos procesos celulares, entre los que destaca la proliferación celular (Karin, 1995). Los factores de transcripción c-Jun, c-Fos y Fra-1, entre otros, configuran la estructura de AP-1, tanto en forma homodimérica como en forma heterodimérica (Angel and Karin, 1991).

La activación de ERK5 en respuesta a EGF resulta en su translocación al núcleo, donde interacciona y fosforila al factor de transcripción MEF2C y promueve su actividad transcripcional (Kato et al., 1997). Una vez activo, MEF2C se une a la región promotora de c-Jun activando su transcripción. c-Jun es un factor de transcripción de la familia de AP-1 (de respuesta temprana) implicado en la proliferación celular mediada por EGF, entre otros mitógenos. La vía MEK5-ERK5 también promueve la fosforilación y estabilización de otros miembros de la familia de AP-1, como c-Fos y Fra-1: factores de transcripción que también regulan la proliferación celular (Terasawa et al., 2003). En nuestro laboratorio hemos constatado que JWG-071 inhibe la fosforilación de c-Jun inducida por EGF en células de cáncer endometrial (Ishikawa) y cervical (HeLa) (Sergio Espinosa, resultados no mostrados). Dado el papel de c-Jun en la proliferación celular del cáncer endometrial (Zhang et al., 2019), futuros experimentos tendrán que validar el papel de MEF2C en la fosforilación de c-Jun en respuesta a la activación de ERK5. De interés, tanto ERK5 (Mulloy et al., 2003) como c-Jun (Wisdom et al., 1999) son requeridos para la progresión de la fase G1 del ciclo celular, al regular los niveles de la ciclina D1. Nuestros resultados, pues, nos permiten proponer a la vía ERK5-c-Jun-ciclina D1 como uno de los principales actores implicados en la proliferación del cáncer endometrial inducida por EGF.

En un principio, nuestros resultados no descartan otras vías de señalización implicadas en la proliferación celular y que estuvieran activadas por la vía EGFR-ERK5-AP-1. En este sentido, cabe destacar que los modelos celulares empleados en este trabajo (células Ishikawa, AN3CA y HeLa) presentan hiperactivación de la vía PI3K-Akt-mTORC1. Así, se ha descrito que la activación de Akt contribuye al aumento de expresión de c-Jun en células de hepatocarcinoma (Yan et al., 2019), y que Akt media en la activación de AP-1 inducida por EGF en células de linfoma anaplásico de células grandes JB6 (Huang et al., 1996). Dado que algunos autores han sugerido una relación de ERK5 con la activación de Akt en diferentes modelos celulares (Bera et al. 2014; Roberts et al., 2010), la vía PI3K-Akt-mTORC1 podría mediar en el papel de ERK5 en la proliferación inducida por EGF en el cáncer endometrial. No obstante, nuestros resultados muestran que tanto la inhibición de ERK5 como la depleción de MEK5 no afectan a la activación del eje Akt-mTORC1 en respuesta a EGF (**Figura 19**).

Numerosos tumores cursan con elevada expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), lo que suele implicar un comportamiento biológico más agresivo que los tumores que presentan expresión baja o normal. En cáncer de endometrio, un 43-67% de los casos presentan elevada expresión de EGFR, y se asocia a una menor supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad, particularmente en el caso de los tumores endometriales más agresivos de tipo II (Konecny et al., 2009).

Nuestros resultados muestran que la inhibición de la actividad de ERK5 (farmacológica o por delección genética de MEK5) impacta de manera notable en la proliferación del cáncer endometrial basal (**Figura 15, 16 y 22**) e inducida por EGF (**Figura 17 y 19B**). Dado que la inhibición de ERK5 no afecta a la actividad de las vías de señalización canónicas activadas por EGF (como la vía MEK-ERK1/2) (**Figura 19A**), estos resultados señalan a la vía MEK5-ERK5 como un mediador crítico en la proliferación del tumor endometrial.

1.2. ERK5 como nueva diana en el cáncer endometriode (Tipo I)

En este trabajo proponemos a ERK5 como una nueva diana terapéutica para el tratamiento del cáncer de endometrio (EC) tipo I. Para ello, se han utilizado las líneas tumorales de adenocarcinoma Ishikawa y AN3CA. Ishikawa es una línea tumoral procedente de un tumor primario y AN3CA es una línea tumoral procedente de un tumor metastásico. Ambas líneas celulares comparten alteraciones genéticas: delección de *PTEN* (y por tanto alteración de la vía PI3K/Akt/mTOR), y mutación de cambio de sentido en *TP53*. Como ocurre en estos modelos celulares, frecuentemente los tumores EC de tipo I presentan hiperactivación de la vía PI3K-Akt-mTOR, debido a la delección de *PTEN* y, en algunos casos, debido a mutaciones activantes en *PI3KCA* y *AKT* (AKT-E17K está presente en el 4% de los carcinomas de endometrio) (Levine et al., 2013). En consecuencia, la vía PI3K-Akt-mTOR se ha convertido en el centro de las terapias dirigidas contra EC. Sin embargo, es frecuente que los tumores de endometrio generen resistencia a los inhibidores de esta vía mediante la hiperactivación de la vía RAS/RAF/MEK1/ERK (Bregar & Growdon, 2016), lo que invita al uso combinado de inhibidores de MEK1/2 para prevenir esta resistencia. No obstante, y como se ha observado en pacientes con cáncer de mama (Hanker et al., 2019), la combinación de inhibidores de MEK1 y de la vía PI3K/Akt/mTOR muestra altos niveles de toxicidad en los pacientes de EC enrolados en un estudio en fase I, lo que ha impedido su posterior desarrollo en fase clínicas posteriores (Westin et al., 2019).

La limitada eficacia de las terapias dirigidas contra el cáncer de endometrio requiere la exploración de enfoques alternativos. Hasta la fecha, no se ha investigado la MAP quinasa ERK5 como diana terapéutica contra el cáncer endometrial. Sin embargo, los resultados obtenidos para otros tipos de cánceres proponen a ERK5 como una efectiva diana terapéutica (ver **Tabla 1** en la sección Introducción, donde se detalla el efecto antitumoral del silenciamiento o inhibición de ERK5). En el caso de cáncer de endometrio de tipo I, el análisis de la base de datos *the Human Protein Atlas* y de la expresión en biopsias de tumores muestran una elevada expresión de ERK5 en tejido tumoral de EC, en comparación con el tejido no tumoral (**Figura 24 y Figura 32A**). Además, esta sobreexpresión de ERK5 correlaciona con una menor supervivencia global (**Figura 25**). Dado que otros autores han mostrado que la inhibición de ERK5 presenta actividad antitumoral en modelos de cáncer que cursan con sobre-expresión de MEK5 y/o ERK5 (Gomez et al., 2016), en este trabajo hemos explorado si este también es el caso en cáncer endometriode.

JWG-071 induce citotoxicidad en un amplio panel de líneas tumorales de distinta estirpe, y especialmente en líneas celulares derivadas de tumores ginecológicos (**Figura 27**). La inhibición de ERK5 induce muerte apoptótica, probablemente mediante la activación de la vía intrínseca apoptótica, tanto en células de cáncer endometrial (Ishikawa y AN3CA) y cáncer cervical (Hela) como en tumores *xenografts* de EC (**Figura**

DISCUSIÓN

41D-E). La muerte apoptótica juega un papel crucial en la citotoxicidad inducida por la inhibición de ERK5, dado que tanto el bloqueo farmacológico de caspasas (**Figura 29C**) como líneas celulares deficientes para apoptosis (células MEF *Bax*^{-/-}/*Bak*^{-/-}, **Figura 30**) revierten esta toxicidad.

De interés, la inhibición de ERK5 induce citotoxicidad en líneas de cáncer ginecológico (Ishikawa, AN3CA y HeLa) que presentan hiperactivación de la vía PI3K-Akt-mTORC1. Sin embargo, JWG-071 apenas afecta a la viabilidad de la línea celular de cáncer endometrioide HEC-1 (resultados no mostrados). Esta línea celular presenta mutaciones activantes de *KRAS* y, por tanto, una hiperactivación de la vía MEK-ERK1/2. En este sentido, se ha descrito que la actividad de ERK5 es dispensable para la viabilidad y proliferación de tumores con mutación activante en *KRAS* o *BRAF*, en modelos celulares de cáncer colorrectal y hepatocarcinoma (Lochhead et al., 2016). A falta de confirmación en otras líneas de EC que presenten mutaciones activantes de *KRAS*, nuestros resultados sugieren que la actividad antitumoral de los inhibidores de ERK5 podría estar comprometida en tumores de EC que cursan con elevada actividad de la vía MEK-ERK1/2.

Recientemente, se ha relacionado ERK5 y Akt en el modelo cáncer de mama triple negativo (TNBC). Como ocurre para el cáncer endometrioide, el TNBC suele cursar con mutaciones activantes de PI3K y/o Akt (Koboldt et al., 2012). Wright *et al.* han descrito que la vía MEK5-ERK5 coopera con el eje Akt-mTOR en la viabilidad del TNBC. Así, la inhibición farmacológica de ERK5 sensibiliza a células TNBC MDA-MB-231 y MDA-MB-468 frente al inhibidor de Akt ipatasertib (Wright et al., 2020). Mecánicamente, ERK5 podría contribuir a la supervivencia celular mediante el control de proteínas pro-apoptóticas. Así, ERK5 fosforila la proteína pro-apoptótica Bad en Ser112, lo que promueve su secuestro citosólico por proteínas 14-3-3, suprime la actividad de caspasa 3 y mantiene inhibida la vía apoptótica (Pi et al., 2004). Esta fosforilación podría cooperar con la fosforilación de la Ser136 mediada por Akt (Datta et al., 1997) para mantener Bad hiperfosforilada, lo que explicaría el efecto citotóxico sinérgico de los inhibidores de ERK5 y de Akt en células tumorales con hiperactivación del eje Akt-mTOR. Será interesante investigar si este fenómeno también se da en aquellos cánceres endometriales que presentan hiperactivación de la vía PI3K-Akt-mTOR.

Existe cierto consenso sobre un papel antiapoptótico de la vía MEK-ERK5 que contribuiría a la supervivencia de la célula tumoral. En numerosos estudios se ha observado que tanto la inhibición como el silenciamiento de ERK5 inducen muerte apoptótica en diferentes modelos tumorales (Stecca and Rovida, 2019). Así, por ejemplo, la inhibición de ERK5 resulta en un aumento de la expresión de las proteínas proapoptóticas de la familia de Bcl-2 Bim, Bax (Al-Ejeh et al., 2014), BNIP3 y BNIP3L (Song et al., 2015), y en una reducción de los niveles de Bcl-2 (Kang et al., 2018). Por su parte, el silenciamiento de ERK5 induce apoptosis en células de leucemia mieloide aguda (Xu et al., 2015), en células T leucémicas (Garaude et al., 2006) y en células NSCLC de adenocarcinoma de pulmón (Sánchez-Fdez et al., 2019) donde el silenciamiento de ERK5 induce apoptosis mediada por p53 (Jiang et al., 2019). Nuestros resultados obtenidos en el paradigma del cáncer endometrioide apoyan estas observaciones. Dado que solo se ha reportado la activación de la vía apoptótica intrínseca en células tumorales en respuesta a la inhibición o depleción de ERK5, será interesante abordar el mecanismo por el que la actividad ERK5 permite a estas células mantener bloqueada las vías apoptóticas.

La vía canónica de NF- κ B media en la citotoxicidad inducida por la pérdida de función de ERK5 en cáncer endometrioide.

Este trabajo muestra por primera vez que la inhibición o el silenciamiento de ERK5 compromete la vía canónica de NF- κ B en cáncer endometrial, al provocar una reducción en los niveles proteicos de p65/RELA (**Figura 34**), en los niveles nucleares basales de p65, y en la actividad transcripcional de NF- κ B (**Figura 35**). Estos resultados apoyan las siguientes observaciones realizadas mediante el análisis de expresión de base de datos y de biopsias de tumores: 1) mayor expresión de ERK5 y p65 en tejido tumoral con respecto al tejido no tumoral adyacente (**Figura 32A**); 2) correlación positiva de la expresión de ERK5 y p65 en pacientes de cáncer endometrioide (**Figura 31A y 32B**).

Nuestros resultados son análogos a los de otros trabajos que muestran una relación funcional entre ERK5 y la vía de NF- κ B en distintos tipos tumorales, como leucemia, adenocarcinoma de colon o cáncer cervical (Garaude et al., 2006; Simões et al., 2015; Cude et al., 2007, respectivamente). En estos modelos, ERK5 contribuye a la activación de la vía canónica de NF- κ B, que resulta en un aumento de la población nuclear del factor de transcripción p65/RELA y de la consecuente actividad transcripcional de NF- κ B. Por otra parte, la inhibición farmacológica o el silenciamiento de ERK5 resulta en la inhibición de la vía de NF- κ B en modelos de leucemia y de cáncer de colon (Garaude et al., 2006; Simões et al., 2015; respectivamente).

La vía de señalización NF- κ B es un regulador clave de la proliferación celular, la apoptosis, la angiogénesis, la inflamación, la metástasis y la resistencia a fármacos de distintos tipos tumorales (Dolcet et al., 2005). Los genes diana de NF- κ B le permiten controlar estos procesos directa o indirectamente. Entre los genes diana de NF- κ B se encuentran genes implicados en respuesta inmune y/o inflamación como citoquinas (*TNF- α* , *IL-1*, *IL-6*, *IL-12*) o proteínas inmunoreguladoras, genes reguladores de NF- κ B como *I κ B* o *c-REL*, ciclinas y factores de crecimiento relevantes en proliferación como *G-CSF* y reguladores de apoptosis o supervivencia celular como *Bcl-XL* o *IAPs* (Pahl, 1999).

En cáncer de endometrio, la vía de NF- κ B se encuentra constitutivamente activada (Pallares et al., 2004). Se desconoce el mecanismo que regula esta hiperactivación, aunque se ha sugerido que podría deberse a las mutaciones predominantes en cáncer de endometrio, como la pérdida de función de *PTEN* (Cheung et al., 2011) o mutaciones activantes de *AKT1* (*AKT-E17K* (Cohen et al., 2010). También podría deberse a mutaciones ganancia de función de *KRAS* (*KRAS-G12V* (Lagarda et al., 2001), similares a las reportadas en el cáncer pancreático ductal o pulmonar, que resultan en una activación de NF- κ B mediada por Akt (Almoguera et al., 1988; Bassères et al., 2010). En este sentido, se ha descrito en tumores endometrioides que *KRAS* hiperactivado induce la activación de NF- κ B (Mizumoto et al., 2011). Dados nuestros resultados, ERK5 bien podría constituir un nuevo elemento regulador de la vía de NF- κ B en el EC de tipo I, al menos en aquellos tumores endometrioides que cursan con hiperactivación de la vía PI3K-Akt-mTORC1. Futuros experimentos deberán determinar el mecanismo por el que ERK5 regula la actividad de p65/RELA, y el exacto papel de la vía PI3K-Akt-mTORC1. En este sentido, la activación de ERK5 por sobreexpresión de MEK5 resulta en una mayor fosforilación de p65 (resultados no mostrados). Será interesante investigar si esta fosforilación es debida a la acción directa de ERK5.

DISCUSIÓN

El tratamiento con JWG-071 induce una disminución drástica de los niveles de la proteína adaptadora NEMO/IKK γ en células Ishikawa, AN3CA y Hela (**Figura 36A**), y una reducción significativa de los niveles del mRNA de *NEMO/IKK γ* en células Ishikawa y Hela (**Figura 36B**). Estas observaciones fueron corroboradas en experimentos *in vivo*, donde la administración sistémica de JWG-071 induce una drástica reducción los niveles de NEMO/IKK γ , p65 y Bcl-2 en tumores *xenografts* de células Ishikawa (**Figura 42**). Por otra parte, la sobreexpresión de NEMO/IKK γ protege a células Ishikawa y AN3CA frente a la apoptosis inducida por JWG-071 (**Figura 38A**), mientras que el silenciamiento de *NEMO/IKK γ* en estas células es suficiente para inducir apoptosis (**Figura 38B**). Estos resultados sugieren que la reducción de los niveles celulares de NEMO/IKK γ sería el evento desencadenante de la muerte apoptótica inducida por la inhibición de ERK5 en células de cáncer endometrioide. En este modelo, NEMO/IKK γ sería necesaria para la supervivencia de este tipo tumoral.

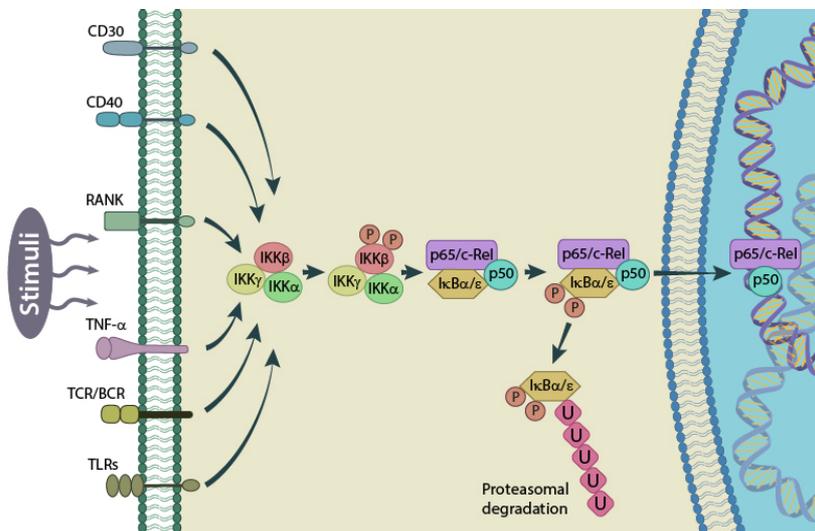


Figura 60. Vía canónica de NF- κ B. En estado basal, NF- κ B (p65/p50) se localiza en el citoplasma formando un complejo con la proteína inhibidora I κ B (*inhibitor of κ B*). En respuesta a diferentes factores como citoquinas (IL-1) o señales proinflamatorias (TNF α), la activación de los correspondientes receptores permite el reclutamiento de la proteína moduladora NEMO/IKK γ , un evento que facilita la activación de las proteínas quinasas I κ B kinase α (IKK α) e I κ B kinase β (IKK β). Una vez activada, IKK β fosforila I κ B, lo que induce su ubiquitinación y degradación proteasomal, permitiendo la translocación nuclear de p65/p50 y la activación de la transcripción de los distintos genes diana. Figura obtenida de Jost & Ruland, 2016.

En respuesta a citoquinas como el TNF α y IL-1, la activación de los correspondientes receptores resulta en la activación de la vía canónica de NF- κ B. En esta vía, la activación del factor de transcripción p65/RELA está mediada por la activación del complejo IKKs, que resulta en la fosforilación de la proteína inhibidora I κ B. Esta fosforilación induce la degradación proteasomal de I κ B, liberando a p65/RELA del secuestro citosólico, que entonces transloca al núcleo y activa la transcripción de sus genes diana (Hayden & Ghosh, 2008; Karin & Ben-neriah, 2000). El complejo IKK está formado por dos subunidades catalíticas (IKK α e IKK β) y una proteína reguladora denominada NEMO/IKK γ . En la vía canónica, IKK β cataliza la fosforilación de I κ B, mientras que IKK α participa en la vía no canónica de activación de NF- κ B (Baeuerle & Henkel, 1994). Por su parte, NEMO/IKK γ es la subunidad reguladora del complejo de las IKKs. A diferencia del

resto de IKKs, NEMO/IKK γ no tiene actividad catalítica. NEMO/IKK γ actúa como una proteína *scaffolding* necesaria para el reclutamiento de IKK α e IKK β hacia el complejo del receptor, y habilita la fosforilación y activación de IKK β por la quinasa TAK1 reclutada (Adhikari et al., 2007).

A NEMO/IKK γ se le han atribuido funciones tanto oncogénicas como de supresión de tumores. En hígado, la delección de NEMO/IKK γ en hepatocitos conduce a un estado crónico de muerte celular que da lugar a una proliferación regenerativa que contribuye al desarrollo del carcinoma hepatocelular (Luedde et al., 2007). Sin embargo, en otros tejidos como el páncreas, NEMO/IKK γ es necesaria para la expansión de lesiones precancerosas inducidas por KRAS. Así, la delección de NEMO/IKK γ anula el desarrollo de lesiones precancerosas inducidas por KRAS y reduce el nivel del marcador proliferativo Ki67 de las mismas (Maier et al., 2012).

Nuestros resultados sugieren que la actividad quinasa de ERK5 es necesaria para mantener unos niveles proteicos basales de NEMO/IKK γ . Esta acción podría ser la consecuencia de: 1) ERK5 regula la estabilidad de la proteína NEMO/IKK γ ; 2) ERK5 regula la transcripción de NEMO/IKK γ ; y 3) ambas acciones. En todo caso, nuestros resultados sugieren que terapias dirigidas que reduzcan los niveles de NEMO podrían ser de utilidad en la terapia del cáncer endometrioide.

Entre otras proteínas, la proteína quinasa GSK-3 β interacciona y fosforila a NEMO/IKK γ en los residuos Ser17 y Ser31 (Medunjanin et al., 2016). Estas fosforilaciones son necesarias para la activación de la vía canónica de NF- κ B por NEMO/IKK γ en respuesta a citoquinas como TNF α o IL-1. Por otra parte, estas fosforilaciones estabilizan a NEMO/IKK γ dado que inhiben su poliubiquitinación (en Lys63) y su degradación lisosomal. Por el contrario, la inhibición de GSK-3 β resulta en la degradación de NEMO/IKK γ y, por tanto, en la inhibición de la vía canónica de NF- κ B (Medunjanin et al., 2016). De interés, Chen et al. mostraron que el silenciamiento de ERK5 (shRNA) en células NSCLC A549 induce la activación del eje PI3K/Akt, la fosforilación de la Ser9 de GSK-3 β (mediada por Akt) y la consecuente inhibición de la actividad quinasa de GSK-3 β (Chen et al., 2012). Por lo tanto, se podría hipotetizar que la reducción de los niveles de expresión de NEMO en respuesta a la inhibición o el silenciamiento de ERK5 observada en nuestros modelos de cáncer endometrioide podría ser la consecuencia de la inactivación de GSK-3 β . De ser cierta esta hipótesis, también podría ser de utilidad para entender el mecanismo implicado en la acción citotóxica de los inhibidores de GSK-3 β en modelos de cáncer de endometrio (Yin et al., 2013), todavía por describir.

La comprobación de la hipótesis de que ERK5 podría regular la transcripción de NEMO/IKK γ es de difícil abordaje. Hoy en día apenas se tiene información sobre el promotor de NEMO/IKK γ y de las proteínas implicadas en su regulación. De hecho, estudios estructurales muestran que el promotor de NEMO/IKK γ presenta múltiples regiones reguladoras que varían de tejido a tejido (Fusco et al., 2006).

Las MAP quinasas JNKs median en la apoptosis inducida por la inhibición de la vía canónica de NF- κ B en respuesta a la inhibición de ERK5.

Diferentes autores han establecido una relación estrecha entre la vía de supervivencia de NF- κ B y la vía pro-apoptótica regulada por las MAP quinasas JNKs. En numerosos paradigmas celulares, la activación sostenida de las JNKs suele resultar en la activación de la apoptosis, por un mecanismo que incluye la activación de la proteína pro-apoptótica Bim (Putchá et al., 2003). Entre otros, la activación de la vía NF- κ B resulta en la inhibición de la vía apoptótica regulada por las JNKs, dando lugar a un fenotipo de pro-supervivencia. Por el contrario, la inhibición de la vía NF- κ B conduce a la activación sostenida de las JNKs, resultando en un fenotipo apoptótico (Javelaud & Besançon, 2001; De Smaele et al., 2001; Tang et al., 2001; Papa et al., 2004).

Nuestros resultados muestran, de una parte, que la inhibición de ERK5 resulta en la inhibición de p65/RELA y en la activación de la vía apoptótica JNK-Bim (**Figura 37**). De otra, tanto la inhibición farmacológica (BAY-117082) o genética (sobrexpresión del superrepresor SR- $\text{I}\kappa\text{B}$) de p65/RELA también inducen la vía pro-apoptótica JNK-Bim (**Figura 39 y 40**). Estos datos nos permiten proponer la vía de ERK5-NEMO-p65-JNK-Bim como una nueva vía implicada en la supervivencia del cáncer endometrial.

Mecanísticamente, en respuesta a TNF- α la activación de NF- κ B bloquea la vía de las JNKs mediante la activación transcripcional de los inhibidores apoptóticos GADD45 β y XIAP (*X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis*) mediada por p65/RELA (Papa et al., 2004). Por el contrario, la delección o inhibición de NF- κ B bloquea la transcripción de GADD45 β y XIAP (Papa et al., 2004; Tang et al., 2001), lo que promueve la activación sostenida de las JNKs dando lugar a un fenotipo apoptótico. Futuros experimentos tendrán que determinar el papel de GADD45 β y XIAP en la activación de la vía apoptótica JNK-Bim en respuesta a la inhibición de ERK5. De interés, resultados preliminares de nuestro laboratorio muestran que JWG-071 induce una reducción de los niveles proteicos de XIAP en células Ishikawa (resultados no mostrados). Será importante comprobar si esto ocurre en otras líneas de cáncer endometriode (como las AN3CA) y si también sucede en respuesta al silenciamiento de ERK5. Por otra parte, en el laboratorio también se ha observado que la inhibición de ERK5 resulta en un aumento de los mRNAs del activador de JNKs MKK7 (resultados no mostrados), por lo que será relevante investigar si esto ocurre a través de la inhibición de p65/RELA, o si, por el contrario, esto ocurre a través de un mecanismo dependiente de la actividad transcripcional de ERK5.

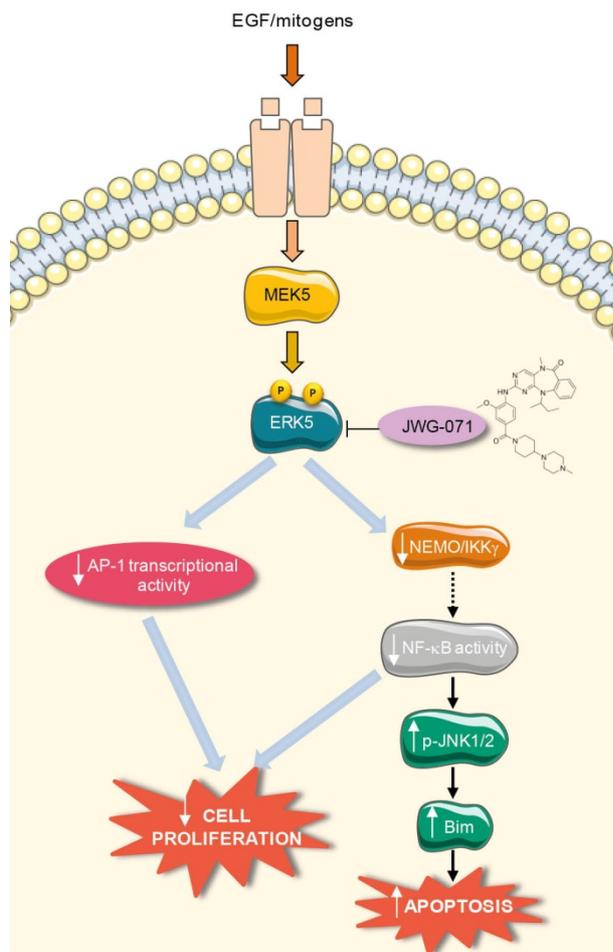


Figura 61. Mecanismo de acción del nuevo inhibidor específico de ERK5, JWG-071. JWG-071 inhibe la proliferación celular inducida por EGF mediante la reducción de los niveles transcripcionales de AP-1, y reduce la viabilidad celular. JWG-071 inhibe la expresión de NEMO/IKK γ lo que se traduce en una reducción de la expresión y la actividad de p65/NF- κ B. Esta inhibición de la vía NF- κ B induce una activación sostenida de las MAP quinasas JNKs, lo que resulta en una inducción aguda de la muerte apoptótica mediada por caspasa-3 a través de una activación de Bim (sustrato de JNKs).

1.3 La inhibición de ERK5 como coadyuvante en el tratamiento quimioterapéutico del cáncer endometrial.

Después de la resección quirúrgica, la quimioterapia es la principal opción terapéutica del cáncer de endometrio. Los quimioterapéuticos utilizados son los taxoles paclitaxel y docetaxel, los platinos carboplatino y cisplatino, y el antibiótico doxorubicina (Fleming, 2007). En este trabajo, en los experimentos realizados con líneas celulares se ha empleado paclitaxel y carboplatino para el modelo de cáncer de endometrio, y paclitaxel y cisplatino para el de cáncer cervical. Estos fármacos son los recogidos por la *American Cancer Society* como quimioterapia estándar (Colombo et al., 2016; Saslow et al., 2012). Nuestros datos muestran que JWG-071 sensibiliza frente a la citotoxicidad inducida por estos quimioterápicos en líneas celulares de cáncer endometrial (Ishikawa) y cervical (Hela) (**Figura 43 y 44**). De interés, los resultados obtenidos *in vivo* apoyan los generados en los modelos celulares, y el tratamiento sistémico con JWG-071 sinergiza con paclitaxel en la reducción del crecimiento de tumores *xenografts* de células Ishikawa (**Figura 46B y C**), posiblemente debido a una acción sinérgica en la activación de la apoptosis (**Figura 46E**).

En su conjunto, nuestros resultados permiten proponer el uso de inhibidores de ERK5 como terapia coadyuvante en el tratamiento quimioterapéutico estándar del cáncer endometriode. Estos resultados también apoyan trabajos previos que muestran que la inhibición de la actividad quinasa de ERK5 sensibiliza al tratamiento quimioterapéutico. Así, la inhibición de ERK5 por XMD8-92 (que presenta actividad BRD4) sinergiza con docetaxel y/o doxorubicina en modelos animales de cáncer cervical, pulmonar (Yang et al., 2013), de mama triple negativo (Al-Ejeh et al., 2014) y de carcinoma de células escamosas de piel (Finegan et al., 2015). También sensibiliza al tratamiento con 5-fluorouracilo en modelos de cáncer colorrectal p53-dependientes (Pereira et al., 2016), al tratamiento con docetaxel y cisplatino en cáncer de mama triple negativo (Ortiz-Ruiz et al., 2014), o a temozolamida en tumores de glioblastoma (Carmell, 2021). En la misma línea, el silenciamiento de ERK5 tiene un efecto sinérgico sobre la citotoxicidad de doxorubicina y cisplatino en modelos de mesotelioma maligno (Shukla et al., 2013), del quimioterápico estándar citarabina en células de leucemia mieloide aguda (Xu et al., 2015), y de doxorubicina, ciclofosfamida y paclitaxel en modelos de cáncer de mama (Pavan et al., 2018).

La sensibilización de la inhibición de ERK5 frente a la quimioterapia estándar en cáncer de endometrio podría deberse a, entre otras, las siguientes razones:

1. **Inhibición de la vía NF- κ B:** La activación de la vía NF- κ B está establecida como un mecanismo de resistencia de las células tumorales frente a la apoptosis inducida por quimioterápicos, a través de la inducción de la expresión de genes antiapoptóticos (Rocha et al., 2003; Kato et al., 2003). En cáncer de endometrio, la vía de NF- κ B se encuentra constitutivamente activa, y el tratamiento con JWG-071 inhibe la actividad basal de la vía de NF- κ B al inducir una reducción de los niveles de NEMO/IKK γ (**Figura 36A y 42**). En consonancia con nuestros resultados, la delección de NEMO/IKK γ sensibiliza a células y tumores *xenografts* de cáncer colorrectal frente a la apoptosis inducida por 5-fluoracilo (Sakamoto et al., 2009). Será importante comprobar si éste también es el caso para el modelo de cáncer endometriode, analizando si el silenciamiento de NEMO/IKK γ , o la inhibición farmacológica de la vía de NF- κ B (BAY-117082), también sensibilizan estas células a la quimioterapia.

2. **Efecto de ERK5 sobre los transportadores ABC:** El aumento de expresión de transportadores ABC es una de las principales causas de la resistencia a múltiples fármacos (Tiwari et al., 2011). Los transportadores ABC son bombas ATPasas que reducen la acumulación intracelular de numerosos fármacos antitumorales, lo que disminuye o anula la eficacia de tratamientos como la quimioterapia (Dean et al., 2001). El bloqueo de transportadores ABC mediado por la inhibición o el silenciamiento de ERK5 podría ser uno de los mecanismos por los que ERK5 regula la quimiorresistencia. Inicialmente, Shukla et al. mostraron que el silenciamiento de ERK5 reduce los niveles de los transportadores ABCB1, ABCC2, ABCA8, y ABCC5 en células de mesotelioma maligno (Shukla et al., 2013). En células MCF7 (cáncer de mama) y KB (cáncer cervical) el inhibidor de ERK5 ERK5-IN-1 inhibe el eflujo de doxorubicina al inhibir el transportador ABCB1 (Wang et al., 2020). Por último, dado que los promotores de varios transportadores ABC contienen un sitio de unión a MEF2, recientemente se ha propuesto que la vía MEK5-ERK5-MEF2 podría controlar la transcripción de estos transportadores (Belkahlia et al., 2018). Futuros experimentos deberán determinar si el JWG-071 también afecta a la expresión y/o actividad de los transportadores ABC de células de cáncer de endometrioide, y su implicación en la sensibilización que promueve la inhibición de ERK5 frente a la quimioterapia en este modelo tumoral.
3. **Estrés de retículo endoplasmático (ER):** Muy frecuentemente, los fármacos quimioterápicos inducen estrés de ER, y se ha relacionado con la resistencia al tratamiento (Schein, 2021). Sin embargo, también se ha observado que compuestos que activan el estrés de ER pueden sinergizar con quimioterápicos para sobreactivar la UPR (*Unfolded Protein Response*), de tal manera que se sobrepasa el umbral de protección de esta vía y se induce la muerte apoptótica de la célula tumoral (Healy et al., 2009). Recientemente, en nuestro laboratorio hemos observado que la inhibición de ERK5 con diferentes compuestos activa el estrés de ER y la vía pro-muerte de la UPR regulada por ATF4/CHOP. Dado que tanto la inhibición farmacológica (con el chaperón químico TUDC) como genética (silenciamiento de ATF4) atenúan la citotoxicidad (apoptosis) de los inhibidores de ERK5 (ERK5i), sugerimos que la inhibición de ERK5 activa una apoptosis mediada por el estrés de RE (Gámez et al., en revisión). Esta acción iría en la línea del mecanismo de acción de otras moléculas con actividad antitumoral. Así, durante los últimos años se han descrito pequeños compuestos (*small compounds*) que potencian la acción de la quimioterapia en el EC a través de la activación del estrés de RE y la UPR. Este es el caso del derivado lipídico ABTL0812 (en fase clínica 2/b para el tratamiento del EC avanzado, NCT02201823, Felip et al., 2019) y del glicolípido sulfatado PG545 (Hoffmann et al., 2020). Dado que los ERK5i sinergizan con inductores de estrés de ER (como Brefeldina A, Gámez et al., en revisión), nuestro laboratorio está interesado en investigar el papel del estrés de ER inducido por los ERK5i en la sensibilización de tumores endometrioides al tratamiento con taxoles o platinos.

2. ROL DE ERK5 EN EL NEUROBLASTOMA

El neuroblastoma es el tumor sólido extracraneal más frecuente en niños de cero a dos años, y representa aproximadamente el 8% de todos los cánceres infantiles y el 15% de la mortalidad por cáncer infantil (Maris, 2009). En Europa, la incidencia anual estimada es de 1000 nuevos casos al año, de los cuales el 60% se clasifican como de alto riesgo, con una supervivencia a los 5 años inferior al 50% (Maris et al., 2007; Maris, 2009; Matthay et al., 2016).

El neuroblastoma es un tumor neuroendocrino que surge en el sistema nervioso simpático en desarrollo (a partir de cualquier elemento de la cresta neural), lo que da lugar a tumores en las glándulas suprarrenales y/o ganglios simpáticos. El curso clínico del NBL es muy heterogéneo, desde la regresión espontánea sin necesidad de tratamiento o la remisión completa tras el tratamiento convencional, hasta la resistencia a las terapias multimodales intensivas (Matthay et al., 2016).

Se han descrito varias alteraciones genéticas en las células del neuroblastoma, como la amplificación de *NMYC* (que codifica el factor de transcripción *n-myc*), mutaciones en *ALK* (que codifica la quinasa del linfoma anaplásico *ALK*) y alteraciones cromosómicas segmentarias (Matthay et al., 2016). Los neuroblastomas más malignos cursan con amplificación de *NMYCN*, que se encuentra en aproximadamente el 20% de los tumores NBL (Bown, 2001). La amplificación de *NMYC* suele asociarse con la pérdida cromosómica segmentaria del brazo corto distal del cromosoma 1 (1p) y con escasa supervivencia de los pacientes (Leong et al., 1993; Thompson et al., 2016). Por otra parte, la mutación de ganancia de función de *ALK* en la línea germinal es la principal causa de aparición de los neuroblastomas hereditarios (Mossé et al., 2008). Estos hallazgos sugieren que *ALK* es un oncogén *driver* del neuroblastoma, y las mutaciones activadoras de *ALK* que concurren con amplificación de *NMYC* se asocian con enfermedad letal (Berry et al., 10.1016/j.ccr.2012.06.001). Así, se considera *ALK* como un biomarcador predictivo y diana terapéutica para un determinado grupo de pacientes (George et al., 2008).

Con el fin de establecer el tratamiento más idóneo, cada paciente de NBL se estratifica en diferentes categorías, en función de los factores de riesgos clínicos y moleculares: muy bajo riesgo, bajo riesgo, riesgo intermedio o alto riesgo. En infantes de <18 meses con una biología favorable, muchos tumores remiten espontáneamente sin necesidad de tratamiento, aunque presenten enfermedad metastásica. Por el contrario, los niños de más de 18 meses de edad con enfermedad metastásica o no resecable y biológicamente desfavorable (definida por una patología desfavorable y/o amplificación de *NMYC*), requieren un tratamiento multidisciplinar intensivo que puede incluir cirugía, radioterapia, quimioterapia y trasplante autólogo de células madre hematopoyéticas (Matthay et al., 2016). No obstante, la menor supervivencia global y la aparición de regresiones espontáneas hacen necesaria la búsqueda de terapias alternativas (Park et al., 2013).

Nuestros resultados preliminares muestran que las líneas celulares de NBL IMR-32 y SH-SY5Y quimiosensibles (*p53* funcional) presentan ERK5 citosólica y son sensibles a los inhibidores de ERK5, mientras que las líneas de NBL quimiorresistentes SK-N-BE(2), SK-N-AS, CHLA-90 y LA1-5S presentan una ERK5 mayoritariamente nuclear y menor sensibilidad a los inhibidores de ERK5 (**Figuras 49 y 50**). Dada la importancia de *NMYC* en el desarrollo y agresividad del NBL, para nuestro estudio escogimos líneas NBL

quimiosensibles y quimiorresistentes que presentan niveles de *NMYC* normales o amplificados (tabla de la **Figura 48A**). Dado que la potencia (IC_{50}) de los dos inhibidores de ERK5 utilizados (JWG-071 y XMD8-92) fue independiente del estado de amplificación de *NMYC*, nuestros resultados sugieren que la citotoxicidad inducida por estos compuestos no dependería del número de copias de *NMYC* que presentan las células de NBL. Sin embargo, será interesante determinar si la inhibición de ERK5 afecta a la estabilidad de la proteína n-myc de células y tumores de NBL. ERK5 fosforila la Ser62 de c-myc en el motivo PTPPLpSPSR (pS indica la serina fosforilada), lo que impide la ubiquitinación y degradación proteasomal de c-myc (Vaseva et al., 2018; Sears, 2004). De interés, a pesar de la escasa homología que presentan n-myc y c-myc, el motivo PTPPLpSPSR está 100% conservado en n-myc. En este sentido, se ha descrito que ALK regula la estabilidad de n-myc a través de la activación de ERK5, en modelos de NBL con ALK amplificado o con mutación activante del dominio quinasa de ALK (F1174L) (Umapathy et al., 2014). Aunque no se investigó si ERK5 fosforila a n-myc, estos autores muestran que la inhibición de ERK5 con XMD8-92 resulta en una drástica reducción de los niveles proteicos de n-myc, tanto en líneas celulares como en tumores *xenografts* (Umapathy et al., 2014).

Nuestro laboratorio pretende investigar este punto, que podría suponer un nuevo rol de ERK5 en la estabilidad de n-myc.

2.1. Papel de ERK5 nuclear en la resistencia del NBL a quimioterapia.

Los puntos más relevantes de nuestro trabajo son:

1. Las 4 líneas celulares de NBL quimiorresistentes analizadas presentan una localización de ERK5 constitutivamente nuclear (**Figura 50**).
2. La sobreexpresión de un mutante constitutivamente nuclear de ERK5 (ERK5-5E) confiere resistencia al cisplatino en líneas celulares de NBL quimiosensibles (**Figura 53**).
3. La adquisición del fenotipo quimiorresistente dependiente de ERK5 nuclear está mediado por una reducción de los niveles de expresión y de actividad transcripcional de p53, y de su sustrato pro-apoptótico de p53 PUMA (**Figura 54**).

Diferentes autores han puesto de manifiesto que ERK5 nuclear correlaciona con metástasis, baja supervivencia y mal pronóstico de pacientes de cáncer de próstata (McCracken et al., 2008), de hepatocarcinoma (Rovida et al., 2015) o de cáncer de mama (Borges et al., 2007). Asimismo, y relacionado con nuestras observaciones, se ha descrito que la sobreexpresión de una forma de ERK5 constitutivamente nuclear confiere resistencia al agonista de receptores de muerte TRAIL en líneas de cáncer de mama MCF-7 y BT474 que presentan que presentan ERK5 citosólica (Borges et al., 2007). Aunque estos autores no abordaron el mecanismo implicado, estas observaciones apuntarían a que ERK5 nuclear podría conferir resistencia a tratamientos pro-apoptóticos, tanto inductores de apoptosis intrínseca (quimioterápicos) como extrínseca (TRAIL).

Nuestros resultados preliminares suponen la primera evidencia experimental que muestra que ERK5 nuclear confiere resistencia a un tratamiento quimioterápico. Con la finalidad de establecer una relación de ERK5 nuclear y resistencia a tratamiento quimioterápico de pacientes con NBL, y evaluar ERK5 nuclear

DISCUSIÓN

como marcador de diagnóstico del NBL, se realizó un análisis inmunohistoquímico de ERK5 en muestras de tumores NBL humanos (facilitadas por la Dra Aroa Serrano y el Dr Miguel Segura, VHIR Barcelona). Se analizaron 41 tumores procedentes de diferentes grados de NBL, realizados por la Dra. Esparís-Ogando (CIC, Salamanca). Desafortunadamente, los tumores NBL presentaron baja tinción mientras que el estroma adyacente presentó una tinción muy intensa para ERK5, lo que dificultó el análisis e impidió llegar a una conclusión.

Las mutaciones en *TP53* son poco frecuentes en tumores NBL y líneas celulares derivadas (Chen & Tweddle, 2015). A pesar de ello, se ha demostrado que las anomalías en la vía de p53 están implicadas en la patogénesis, progresión, recaída y resistencia a fármacos en el paradigma del neuroblastoma. En este sentido, la inactivación de p53 es uno de los mecanismos más frecuentemente implicados en la resistencia a los fármacos en líneas celulares de neuroblastoma (Keshelava et al., 2001). Así, alrededor del 70% de los pacientes de neuroblastoma de alto riesgo muestran inicialmente una buena respuesta a la terapia en el momento del diagnóstico; sin embargo, estos pacientes presentan quimiorresistencia y radiorresistencia como consecuencia de la inactivación de la vía p53 en el momento de la recaída (Carr-wilkinson et al., 2010). Este hecho revela un papel crítico de p53 en la quimiorresistencia de tumores de neuroblastoma. Nuestros resultados preliminares muestran que el inhibidor de ERK5 XMD8-92 potencia la acción citotóxica del cisplatino (ensayos de MTT, resultados no mostrados) al promover un aumento en la expresión y actividad transcripcional de p53 (resultados no mostrados). De confirmarse con el inhibidor específico de ERK5 de última generación JWG-071 (XMD8-92 también afecta a la diana antitumoral BRD4), tanto en líneas celulares como en modelos animales con tumores *xenografts*, estos resultados propondrían a la inhibición de ERK5 como una nueva terapia coadyuvante en el tratamiento quimioterapéutico de tumores de NBL que presenten p53 funcional, tal y como ocurre en otros modelos tumorales como el colorrectal (Pereira et al., 2016) o el carcinoma de pulmón (Yang et al., 2013).

¿Cómo regula ERK5 negativamente a p53? Se han propuesto dos posibles mecanismos por los que la actividad quinasa de ERK5 regularía negativamente a p53. El primer mecanismo está relacionado con la proteína nuclear PML (*Promyelocytic leukemia protein*). PML permite la co-localización de ERK5 y p53 nucleares, lo que resulta en la interrupción de la interacción entre PML-MDM2 (E3 ligasa de p53), necesaria para la activación de p53. Por el contrario, la inhibición de ERK5 promovería la interacción PML-MDM2, lo que facilitaría la activación de p53 (Yang et al., 2013). El segundo mecanismo está relacionado con la E3 ligasa de p53 CHIP (*Carboxy-terminus of Hsc70 Interacting Protein*). ERK5 interacciona e induce la actividad ligasa de CHIP, lo que resulta en la poliubiquitinación y degradación proteasomal de p53 (Lim & Woo, 2011). Futuros experimentos deberán determinar la implicación de ERK5 y de su actividad quinasa en la degradación de p53 mediada por CHIP o MDM2 en neuroblastoma. En primer lugar, investigaremos la localización nuclear de ERK5, MDM2, p53 y PML en células de NBL con p53 funcional, con el fin de establecer si existe co-localización y cómo se ve afectada en respuesta a la inhibición de ERK5. También será necesario estudiar cómo la activación o inhibición de ERK5 afecta a la ubiquitinación de p53, además del papel de las E3 ligasas CHIP y MDM2 (experimentos de sobreexpresión y silenciamiento) en este proceso.

En todo caso, y como mostramos también para el cáncer de endometrio, los resultados de este trabajo proveen nuevas evidencias que apoyan la hipótesis de que la modulación de ERK5 puede ser una nueva estrategia para sensibilizar tumores agresivos a la quimioterapia.

2.2. Silenciamiento de ERK5 como estrategia para el tratamiento del NBL agresivo.

El tratamiento actual para los neuroblastomas más agresivos o de alto riesgo se basa en quimioterapia de inducción, con el fin de reducir la carga tumoral mediante la reducción del tumor primario y la reducción de las metástasis (Smith & Foster, 2018). La terapia de inducción incluye quimioterapia combinada con cuatro o seis agentes (normalmente carboplatino, cisplatino, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y topotecán) y una extracción de células madre de sangre periférica (Smith & Foster, 2018). Durante la terapia de inducción, puede producirse una evolución clonal y una resistencia a los fármacos, lo que suele conducir a una recaída del neuroblastoma (Mullasery et al., 2014). Después de cuatro o cinco ciclos de quimioterapia, se emplea cirugía citorrreductora para extirpar el tumor primario y, finalmente, se utiliza quimioterapia mieloablativa de alta dosis apoyada de un trasplante autólogo de células madre hematopoyéticas para eliminar la enfermedad remanente (Matthay et al., 2016; Smith & Foster, 2018). Esta terapia es seguida por radioterapia en la zona del tumor primario y, por último, por una terapia de mantenimiento de la enfermedad mínima residual con anticuerpos anti-GD2, citoquinas e isotretinoína (Yu et al., 2010).

A pesar de lo arriba expuesto, la resistencia a fármacos (y las consecuentes recidivas) se han vuelto un evento frecuente al aumentar la supervivencia global de los pacientes con NBL agresivo (Kramer et al., 2001; Matthay et al., 2003). Este hecho pone de manifiesto la necesidad de emplear nuevas terapias para atajar estas resistencias. Así, se han propuesto distintas terapias dirigidas según la naturaleza del tumor, algunas de ellas en fase clínica en la actualidad. El inhibidor de ALK crizotinib ha mostrado una gran eficacia en ensayos preclínicos, en modelos de alto riesgo NBL que cursan con mutaciones activantes de ALK (Sekimizu et al., 2018). A pesar de estos resultados prometedores, muy recientemente se han publicado los resultados preliminares del primer ensayo clínico (Fase I/II) del uso del crizotinib en NBL refractario/recurrente con mutaciones en ALK. En este estudio, el crizotinib no mostró eficacia, probablemente debido a que no se pudo llegar a concentraciones efectivas de crizotinib que aseguraran la inhibición de la ALK mutada o amplificada tumoral (Foster et al., 2021). Por otra parte, los inhibidores de la quinasa Aurora A o de las proteínas BET (*Bromodomain and Extra-Terminal*) en combinación con quimioterapia presentan una mayor eficacia, al desestabilizar n-myc (Dubois et al., 2016; Henssen et al., 2015; respectivamente). Estas combinaciones presentan resultados prometedores en adultos, pero aún no han sido testadas en neuroblastoma infantil (Dubois et al., 2016; Henssen et al., 2015; respectivamente).

Nuestros resultados muestran que el silenciamiento génico (shRNA) de ERK5 induce muerte apoptótica en células de NBL agresivo y quimiorresistentes (**Figura 55B y 55C**). El análisis preliminar de los cambios en la expresión génica de dos líneas de NBL quimiorresistentes (CHLA-90 y SK-N-BE(2)) mostró que el silenciamiento génico de ERK5 induce cambios significativos en genes implicados en transcripción génica, ciclo celular y apoptosis (**Figura 58**). Estos resultados están de acuerdo con el papel de ERK5 como co-

DISCUSIÓN

activador transcripcional (Kasler et al., 2000; Morimoto et al., 2007; Gomez et al., 2016), como regulador de la progresión del ciclo celular (ERK5 regula la transcripción de la ciclina D1, necesaria para la transición G1/S en respuesta a factores de crecimiento (Hayashi *et al.*, 2001; Mulloy *et al.*, 2003), y como factor de supervivencia de la célula tumoral (Buschbeck & Ullrich, 2005; Carvajal-Vergara et al., 2005; Ortiz-Ruiz et al., 2014). Particularmente interesante fue la constatación de que el silenciamiento de ERK5 en estas células de NBL quimiorresistentes indujo cambios en la expresión génica de proteínas claves reguladoras de la apoptosis y que como *Bcl-2*, *BAD* y *XIAP*. Estos resultados confirman los reportados en otros trabajos, donde describen una reducción de los transcritos de *Bcl-2* en líneas celulares de leucemia mieloide aguda (Kang et al., 2018) y de *BAD* en células endoteliales (Pi et al., 2004), en respuesta a la inhibición de ERK5 con XMD8-92.

En general, nuestros resultados sugieren que el silenciamiento de ERK5 en modelos celulares de NBL de alto riesgo compromete el ciclo celular e induce muerte celular apoptótica. Sin embargo, una caracterización más precisa de los determinantes moleculares de la acción citotóxica inducida por el silenciamiento de ERK5 en el NBL agresivo requerirá de la determinación de cambios en el proteoma. En este sentido, y entre otros sustratos, ERK5 controla la actividad de al menos dos E3 ligasas: Mdm2 (Yang et al., 2013) y CHIP (Lim & Woo, 2011). Es plausible, pues, que gran parte del impacto observado en la supervivencia en respuesta al silenciamiento de ERK5 sea consecuencia de la ausencia de modificaciones postraduccionales, inducidas tanto por la actividad quinasa de ERK5 como su posible papel como proteína *scaffolding* (el interactoma de ERK5 ha mostrado que ERK5 es una proteína promiscua, Erazo et al., 2013). Nuestra hipótesis consiste en que ERK5 podría contribuir a una correcta proteostasis para el mantenimiento de la proliferación y viabilidad de la célula tumoral.

De interés, el silenciamiento de ERK5 también permitió observar cambios significativos en un *cluster* de genes relacionados con la macroautofagia, como *ATG4D*, *ATG9A*, *TP53INP2*, *DAP*, *VPS39* o *PIK3CB*. La macroautofagia -a partir de este punto denominada autofagia- es un proceso celular altamente conservado que juega un papel primordial en el mantenimiento de la homeostasis celular, a través de la degradación y el reciclaje de componentes intracelulares como agregados de proteína, orgánulos no funcionales e incluso patógenos (Parzych & Klionsky, 2014). Nuestro laboratorio ha observado una relación entre ERK5 y autofagia en modelos de cáncer endometrial y pancreático (Gamez et al, en revisión). Así, en estos modelos la inhibición o el silenciamiento de ERK5 induce una autofagia citotóxica, que es requerida para la activación de la caspasa 3. En este sentido, será interesante investigar si, tal y como apunta el análisis de los cambios de expresión génica, el silenciamiento de ERK5 también induce autofagia en células de NBL, y si este proceso celular media en la citotoxicidad inducida por este silenciamiento. Aunque es un campo poco explorado, recientemente se ha observado que fármacos en desarrollo preclínico que inducen autofagia citotóxica, como el derivado lipídico ABTL0812, tienen impacto en la viabilidad de células de NBL y reducen el crecimiento de los correspondientes tumores *xenografts* (París-Coderch et al., 2020).

Durante los últimos años, numerosos trabajos han optimizado el desarrollo de moléculas que inducen la degradación de proteínas diana (Farnaby et al., 2021). En este sentido, recientemente se ha validado el uso de compuestos PROTAC (*PROteolysis TArgeting Chimera*) como una estrategia válida para anular

farmacológicamente la expresión de proteínas. Entre otros, el fármaco oral PROTAC ARV-110, que induce la degradación específica del receptor de andrógenos, ha mostrado eficacia en estudios clínicos en pacientes con cáncer de próstata metastásico resistente a la castración (CRPC) (Neklesa et al., 2019). Los PROTACs son compuestos bifuncionales que unen la proteína diana y una E3 ligasa específica, lo que resulta en la ubiquitinación y degradación proteasomal de la proteína diana (An & Fu, 2018). En colaboración con el Prof. NS Gray (Harvard Medical School), nuestro desarrolla las primeras moléculas PROTAC específicas ERK5, utilizando el grupo principal del JWG-071 (benzo[e]pirimido[5,4-b][1,4]diazepin-6(11H)-ona) y el ligando VL-269T que une a la E3 ligasa VHL (*Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor*). Los resultados preliminares son prometedores, y muestran una rápida pérdida de expresión de la proteína ERK5 (90%) tras 6h de incubación (Sergio Espinosa-Gil, resultados no mostrados). Dada la agresividad y escasas opciones terapéuticas del NBL quimiorresistente, y dados los resultados mostrados en esta Tesis, este modelo tumoral podría constituir un excelente modelo para comprobar la eficacia de los PROTAC ERK5 desarrollados, para realizar los correspondientes estudios preclínicos, y comprobar el alcance de la pérdida de ERK5 en el tratamiento de este tipo de tumores con mal pronóstico.

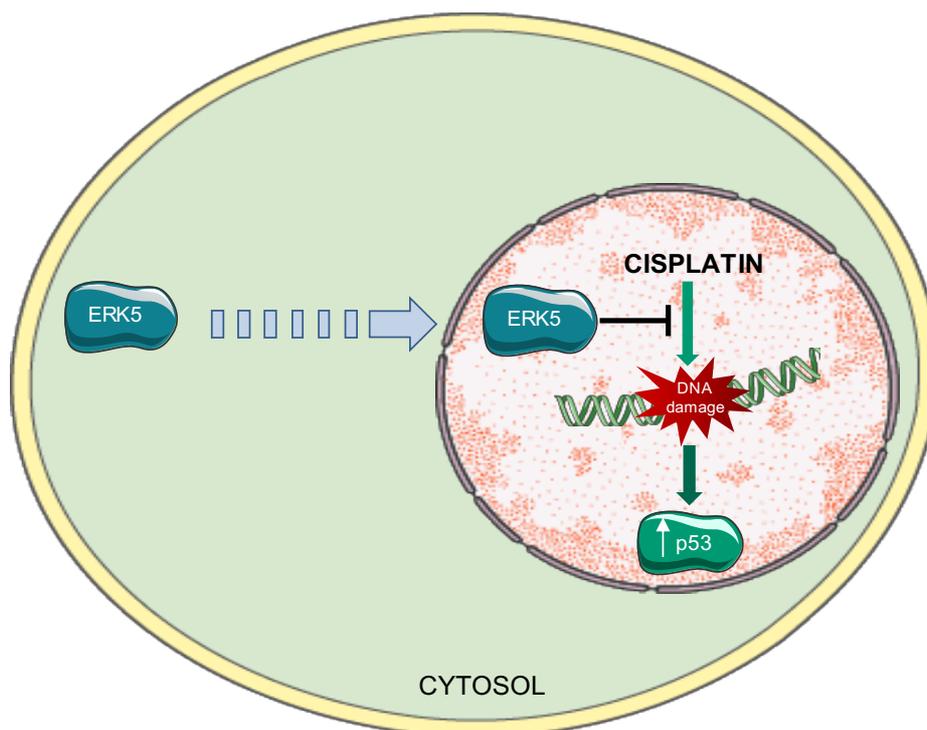


Figura 62. Graphical abstract del papel de ERK5 nuclear en neuroblastoma. ERK5 nuclear confiere resistencia a cisplatino mediante un mecanismo dependiente de p53 en células de neuroblastoma con p53 funcional.

CONCLUSIONES

1. We have characterized JWG-071, a new generation ERK5 specific inhibitor without BRD4 activity. This small compound exhibits excellent pharmacokinetic parameters, and inhibits ERK5 efficiently in cell lines and in xenograft tumors (systemic administration).
2. ERK5 regulates proliferation in gynecological cancer cell models. ERK5 inhibition reduces basal and EGF-induced proliferation in endometrioid (Ishikawa) and cervical (Hela) cancer cells by preventing ERK5 activation. ERK5 inhibition impairs EGF-induced nuclear translocation of ERK5, and activity of the AP-1 transcription factor.
3. ERK5 kinase activity regulates endometrioid cancer proliferation. Pharmacological (JWG-071) or genetic (CRISPR/Cas9 MEK5^{-/-} cells) inhibition of ERK5 kinase activity impairs growth and proliferation (Ki67) of endometrioid cancer xenografts (Ishikawa).
4. ERK5 kinase activity is required for endometrioid and cervical cancer cell survival. JWG-071 impairs viability of a broad panel of human tumor cell lines. ERK5 inhibition induces apoptosis in endometrial (Ishikawa and AN3CA) and cervical (Hela) cancer cells, as well as in endometrioid tumor xenografts.
5. We demonstrate a functional relationship between ERK5 and the NF- κ B canonical pathway (a driver of endometrioid cancer survival and proliferation). Tumor samples from endometrioid cancer patients show increased (and correlated) ERK5 and p65/RELA protein expression, compared to peritumoral tissue.
6. ERK5 inhibition impairs the NF- κ B canonical pathway in endometrioid cancer cells and tumor xenografts, by reducing the expression of the upstream regulator NEMO/IKK γ , leading to impaired expression, nuclear localization and transcriptional activity of p65/RELA.
7. ERK5 inhibition activates the NF- κ B-mediated JNK pro-apoptotic pathway. Accordingly, NEMO/IKK γ overexpression protects endometrioid cells from ERK5i-induced cytotoxicity, whereas pharmacologic (BAY-117082) or genetic (overexpression of the I κ B super-repressor SR-I κ B) inhibition of p65/RELA induced the JNK pro-apoptotic pathway.
8. ERK5 inhibition sensitizes endometrioid (Ishikawa) and cervical (Hela) cells to gold-standard chemotherapies (cisplatin, paclitaxel and carboplatin). More importantly, systemic administration of ERK5 inhibitor JWG-071 sensitizes endometrioid (Ishikawa) tumor xenografts to paclitaxel-induced apoptosis. Therefore, we propose ERK5 as a new target to tackle endometrioid cancer.

CONCLUSIONES

9. We provide preliminary evidences showing that nuclear ERK5 plays a role in modulating neuroblastoma cancer survival and resistance to chemotherapy. Using a panel of NBL cell lines, we found that chemosensitive (functional p53) NBL cells are sensitive to ERK5 inhibitors and show cytosolic ERK5 localization. On the contrary, chemoresistant (non-functional p53) NBL cells are less sensitive to ERK5 inhibitors and show nuclear ERK5 localization. Overexpression of a nuclear ERK5 mutant in chemosensitive NBL cells confers resistance to cisplatin, by reducing p53 expression and transcriptional activity. Our results point to nuclear ERK5 as player in resistance of NBL to chemotherapy.
10. Finally, we also provide evidences showing that ERK5 silencing impairs viability of high-risk chemoresistant NBL cells. Preliminary transcriptomic analysis shows that ERK5 depletion induces major changes in genes related to cell cycle, transcription and apoptosis. These results validate the use of ERK5 degrader drugs (PROTACs) to tackle high-risk NBL cancer.

BIBLIOGRAFÍA

A

- Abe, J. I., Kusuvara, M., Ulevitch, R. J., Berk, B. C., & Lee, J. D. (1996). Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 271(28), 16586–16590. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.28.16586>
- Adam, C., Fusi, L., Weiss, N., Goller, S. G., Meder, K., Frings, V. G., Kneitz, H., Goebeler, M., Houben, R., Schrama, D., & Schmidt, M. (2020). Efficient Suppression of NRAS-Driven Melanoma by Co-Inhibition of ERK1/2 and ERK5 MAPK Pathways. *Journal of Investigative Dermatology*, 140(12), 2455–2465. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.03.972>
- Adam, C., Glück, L., Ebert, R., Goebeler, M., Jakob, F., & Schmidt, M. (2018). The MEK5/ERK5 mitogen-activated protein kinase cascade is an effector pathway of bone-sustaining bisphosphonates that regulates osteogenic differentiation and mineralization. *Bone*, 111, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.03.020>
- Adhikari, A., Xu, M., & Chen, Z. J. (2007). Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. *Oncogene*, 26(22), 3214–3226. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210413>
- Aghajanian, C., Sill, M. W., Darcy, K. M., Greer, B., McMeekin, D. S., Rose, P. G., Rotmensch, J., Barnes, M. N., Hanjani, P., & Leslie, K. K. (2011). Phase II trial of bevacizumab in recurrent or persistent endometrial cancer: A gynecologic oncology group study. *Journal of Clinical Oncology*, 29(16), 2259–2265. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.32.6397>
- Ahmad, I., Singh, L. B., Yang, Z. H., Kalna, G., Fleming, J., Fisher, G., Cooper, C., Cuzick, J., Berney, D. M., Møller, H., Scardino, P., & Leung, H. Y. (2013). Mir143 expression inversely correlates with nuclear ERK5 immunoreactivity in clinical prostate cancer. *British Journal of Cancer*, 108(1), 149–154. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.510>
- Akao, Y., Nakagawa, Y., Lio, A., & Naoe, T. (2009). Role of microRNA-143 in Fas-mediated apoptosis in human T-cell leukemia Jurkat cells. *Leukemia Research*, 33(11), 1530–1538. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2009.04.019>
- Akao, Y., Nakagawa, Y., & Naoe, T. (2006). MicroRNAs 143 and 145 are possible common onco-microRNAs in human cancers. *Oncology Reports*, 16(4), 845–850. <https://doi.org/10.3892/or.16.4.845>
- Al-Ejeh, F., Miranda, M., Shi, W., Simpson, P. T., Song, S., Vargas, A. C., Saunus, J. M., Smart, C. E., Mariasegaram, M., Wiegman, A. P., Chenevix-Trench, G., Lakhani, S. R., & Khanna, K. K. (2014). Kinome profiling reveals breast cancer heterogeneity and identifies targeted therapeutic opportunities for triple negative breast cancer. *Oncotarget*, 5(10), 3145–3158. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1865>
- Almoguera, C., Shibata, D., Forrester, K., Martin, J., Arnheim, N., & Perucho, M. (1988). Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell*, 53(4), 549–554. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90571-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90571-5)
- Álvarez-Fernández, S., Ortiz-Ruiz, M. J., Parrott, T., Zaknoen, S., Ocio, E. M., Miguel, J. S., Burrows, F. J., Esparís-Ogando, A., & Pandiella, A. (2013). Potent antimyeloma activity of a novel ERK5/CDK inhibitor. *Clinical Cancer Research*, 19(10), 2677–2687. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2118>
- Alvarez, E. A., Brady, W. E., Walker, J. L., Rotmensch, J., Zhou, X. C., Kendrick, J. E., Yamada, S. D., Schilder, J. M., Cohn, D. E., Harrison, C. R., Moore, K. N., & Aghajanian, C. (2013). Phase II trial of combination bevacizumab and temsirolimus in the treatment of recurrent or persistent endometrial carcinoma: A Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic Oncology*, 129(1), 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.12.022>
- An, S., & Fu, L. (2018). EBioMedicine Small-molecule PROTACs: An emerging and promising approach for the development of targeted therapy drugs. *The Lancet EBio Medicine*, 12(3), 1–10.

Angel, P., & Karin, M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *BBA - Reviews on Cancer*, *1072*(2–3), 129–157. [https://doi.org/10.1016/0304-419X\(91\)90011-9](https://doi.org/10.1016/0304-419X(91)90011-9)

Antoon, J. W., Martin, E. C., Lai, R., Salvo, V. A., Tang, Y., Nitzchke, A. M., Elliott, S., Nam, S. Y., Xiong, W., Rhodes, L. V., Collins-Burow, B., David, O., Wang, G., Shan, B., Beckman, B. S., Nephew, K. P., & Burow, M. E. (2013). MEK5/ERK5 Signaling Suppresses Estrogen Receptor Expression and Promotes Hormone-Independent Tumorigenesis. *PLoS ONE*, *8*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069291>

B

Baeuerle, P. A., & Henkel, T. (1994). Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annual Review of Immunology*, *12*(2), 141–179. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.001041>

Bassères, D. S., Ebbs, A., Levantini, E., & Baldwin, A. S. (2010). Requirement of the NF- κ B subunit p65/RelA for K-Ras-induced lung tumorigenesis. *Cancer Research*, *70*(9), 3537–3546. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4290>

Belkahla, S., Khan, A. U. H., Gitenay, D., Alexia, C., Gondeau, C., Vo, D. N., Orecchioni, S., Talarico, G., Bertolini, F., Cartron, G., Hernandez, J., Daujat-Chavanieu, M., Allende-Vega, N., & Gonzalez, M. V. (2018). Changes in metabolism affect expression of ABC transporters through ERK5 and depending on p53 status. *Oncotarget*, *9*(1), 1114–1129. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23305>

Benito-Jardon, L., Díaz-Martínez, M., Arellano-Sanchez, N., Vaquero-Morales, P., Esparís-Ogando, A., & Teixido, J. (2019). Resistance to MAPK inhibitors in melanoma involves activation of the IGF1R-MEK5-Erk5 pathway. *Cancer Research*, *79*(9), 2244–2256. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2762>

Bera, A., Das, F., Ghosh-Choudhury, N., Li, X., Pal, S., Gorin, Y., Kasinath, B. S., Abboud, H. E., & Ghosh Choudhury, G. (2014). A positive feedback loop involving Erk5 and Akt turns on mesangial cell proliferation in response to PDGF. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *306*(11), 1089–1101. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00387.2013>

Berkers, J. A., van Bergen en Henegouwen, P. M., & Boonstra, J. (1991). Three Classes of Epidermal Growth Factor Receptors on HeLa Cells. *The journal of biological chemistry*, *266*(15), 922–927. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)35261-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)35261-4)

Bernardi, R., & Pandolfi, P. P. (2007). Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *8*(12), 1006–1016. <https://doi.org/10.1038/nrm2277>

Bethesda (2021). Endometrial Cancer Treatment (PDQ®) Health Professional Version. PDQ Adult Treatment Editorial Board.

Bogliolo, S., Gardella, B., Dominoni, M., Musacchi, V., Cassani, C., Zanellini, F., De Silvestri, A., Gaggero, C. R., Babilonti, L., & Spinillo, A. (2016). Effectiveness of aromatase inhibitors in the treatment of advanced endometrial adenocarcinoma. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, *293*(4), 701–708. <https://doi.org/10.1007/s00404-015-3974-9>

Bokhman JV. (1983). Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecologic Oncology*, *15*(1), 10–17.

Borges, J., Pandiella, A., & Esparís-ogando, A. (2007). Erk5 nuclear location is independent on dual phosphorylation, and favours resistance to TRAIL-induced apoptosis. *Cellular Signalling*, *19*(7), 1473–1487. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.01.023>

Borralho, P. M., Simões, A. E. S., Gomes, S. E., Lima, R. T., Carvalho, T., Ferreira, D. M. S., Vasconcelos, M. H., Castro, R. E., & Rodrigues, C. M. P. (2011). MiR-143 overexpression impairs growth of human colon carcinoma xenografts in mice with induction of apoptosis and inhibition of proliferation. *PLoS ONE*, *6*(8), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023787>

- Bown, N. (2001). Reviews Neuroblastoma tumour genetics: clinical and biological aspects. *Journal of Clinical Pathology*, 54(12), 897–910.
- Bregar, A. J., & Growdon, W. B. (2016). Emerging strategies for targeting PI3K in gynecologic cancer. *Gynecologic Oncology*, 140(2), 333–344. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.09.083>
- Broustas, C. G., Duval, A. J., Chaudhary, K. R., Friedman, R. A., Virk, R. K., & Lieberman, H. B. (2019). Targeting MEK5 impairs non-homologous end-joining repair and sensitizes prostate cancer to DNA damaging agents. *Oncogene*, 39(12), 2467–2477. <https://doi.org/10.1101/737080>
- Buschbeck, M., & Ullrich, A. (2005). The Unique C-terminal Tail of the Mitogen-activated Protein Kinase ERK5 Regulates Its Activation and Nuclear Shuttling. *Journal of Biological Chemistry*, 280(4), 2659–2667. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412599200>

C

- Cameron, S. J., Abe, J. I., Malik, S., Che, W., & Yang, J. (2004). Differential Role of MEK5 α and MEK5 β in BMK1/ERK5 Activation. *Journal of Biological Chemistry*, 279(2), 1506–1512. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308755200>
- Cameron, S. J., Malik, S., Akaike, M., Lerner-Marmarosh, N., Yan, C., Lee, J. D., Abe, J. I., & Yang, J. (2003). Regulation of epidermal growth factor-induced connexin 43 gap junction communication by big mitogen-activated protein kinase 1/ERK5 but not ERK1/2 kinase activation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(20), 18682–18688. <https://doi.org/10.1074/jbc.M213283200>
- Carmell, N., Brown, S., & Khamisy, S. (2018). Novel drug targets to augment temozolomide. *Neuro-Oncology*, 20(5), 346–348. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nyy129.005>
- Carr-wilkinson, J., Toole, K. O., Wood, K. M., Challen, C. C., Baker, A. G., Board, J. R., Evans, L., Cole, M., Cheung, N. V., Boos, J., Köhler, G., Leuschner, I., Pearson, A. D. J., Lunec, J., & Tweddle, D. A. (2010). High Frequency of p53/MDM2/p14 ARF Pathway Abnormalities in Relapsed Neuroblastoma. *Clinical Cancer Research*, 2(6), 1108–1119. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1865>
- Carter, E. J., Cosgrove, R. A., Gonzalez, I., Eisemann, J. H., Lovett, F. A., Cobb, L. J., & Pell, J. M. (2009). MEK5 and ERK5 are mediators of the pro-myogenic actions of IGF-2. *Journal of Cell Science*, 122(17), 3104–3112. <https://doi.org/10.1242/jcs.045757>
- Carvajal-Vergara, X., Tabera, S., Montero, J. C., Esparís-Ogando, A., López-Pérez, R., Mateo, G., Gutiérrez, N., Pardo-Cabañas, M., Teixidó, J., San Miguel, J. F., & Pandiella, A. (2005). Multifunctional role of Erk5 in multiple myeloma. *Blood*, 105(11), 4492–4499. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-08-2985>
- Casas, S., Ollila, J., Aventín, A., Vihinen, M., Sierra, J., & Knuutila, S. (2003). Changes in apoptosis-related pathways in acute myelocytic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 146(2), 89–101. [https://doi.org/10.1016/S0165-4608\(03\)00102-X](https://doi.org/10.1016/S0165-4608(03)00102-X)
- Cavanaugh, J. E. (2004). Role of extracellular signal regulated kinase 5 in neuronal survival. *European Journal of Biochemistry*, 271(11), 2056–2059. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04131.x>
- Chang, L., & Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410(6824), 37–40. <https://doi.org/10.1038/35065000>
- Chao, T. H., Hayashi, M., Tapping, R. I., Kato, Y., & Lee, J. D. (1999). MEKK3 directly regulates MEK5 activity as part of the big mitogen- activated protein kinase 1 (BMK1) signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 274(51), 36035–36038. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.51.36035>

- Charni, S., Aguilo, J. I., Garaude, J., de Bettignies, G., Jacquet, C., Hipskind, R. A., Singer, D., Anel, A., & Villalba, M. (2009). ERK5 Knockdown Generates Mouse Leukemia Cells with Low MHC Class I Levels That Activate NK Cells and Block Tumorigenesis. *The Journal of Immunology*, *182*(6), 3398–3405. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803006>
- Chen, L., & Tweddle, D. A. (2015). Neuroblastoma and the p53 Pathway. *Pediatric and Adolescent Medicine*, *20*(2), 59–80. <https://doi.org/10.1159/000382087>
- Chen, R., Yang, Q., & Lee, J. D. (2012). BMK1 kinase suppresses epithelial-mesenchymal transition through the Akt/GSK3 β signaling pathway. *Cancer Research*, *72*(6), 1579–1587. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2055>
- Chen, T. H., Chen, C. Y., Wen, H. C., Chang, C. C., Wang, H. D., Chuu, C. P., & Chang, C. H. (2017). YAP promotes myogenic differentiation via the MEK5-ERK5 pathway. *FASEB Journal*, *31*(7), 2963–2972. <https://doi.org/10.1096/fj.201601090R>
- Cheung, L. W. T., Hennessy, B. T., Li, J., Yu, S., Myers, A. P., Djordjevic, B., Lu, Y., Katherine, S. H., Dyer, M. D., Zhang, F., Ju, Z., Cantley, L. C., Scherer, S. E., Liang, H., Lu, K. H., Broaddus, R. R., & Mills, G. B. (2011). High frequency of PIK3R1 and PIK3R2 mutations in endometrial cancer elucidates a novel mechanism for regulation of PTEN protein stability. *Cancer Discovery*, *1*(2), 170–185. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0039>
- Chou, T. C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. *Cancer Research*, *70*(2), 440–446. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1947>
- Ciceri, P., Müller, S., O'Mahony, A., Fedorov, O., Filippakopoulos, P., Hunt, J. P., Lasater, E. A., Pallares, G., Picaud, S., Wells, C., Martin, S., Wodicka, L. M., Shah, N. P., Treiber, D. K., & Knapp, S. (2014). Dual kinase-bromodomain inhibitors for rationally designed polypharmacology. *Nature Chemical Biology*, *10*(4), 305–312. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1471>
- Clapé, C., Fritz, V., Henriquet, C., Apparailly, F., Fernandez, P. L., Iborra, F., Avancès, C., Villalba, M., Culline, S., & Fajas, L. (2009). miR-143 interferes with ERK5 signaling, and abrogates prostate cancer progression in mice. *PLoS ONE*, *4*(10), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007542>
- Cohen, C., Zavala-Pompa, A., Sequeira, J. H., Shoji, M., Sexton, D. G., Cotsonis, G., Cerimele, F., Govindarajan, B., Macaron, N., & Arbiser, J. L. (2002). Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clinical Cancer Research*, *8*(12), 3728–3733.
- Cohen, Y., Shalmon, B., Korach, J., Barshack, I., Fridman, E., & Rechavi, G. (2010). AKT1 pleckstrin homology domain E17K activating mutation in endometrial carcinoma. *Gynecologic Oncology*, *116*(1), 88–91. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2009.09.038>
- Colombo, N., Creutzberg, C., Amant, F., Bosse, T., González-Martón, A., Ledermann, J., Marth, C., Nout, R., Querleu, D., Mirza, M. R., Sessa, C., Abal, M., Altundag, O., Banerjee, S., Casado, A., De Agustín, L. C., Cibula, D., Del Campo, J. M., Emons, G., Zeimet, A. G. (2016). ESMO-ESGO-ESTRO consensus conference on endometrial cancer: Diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, *27*(1), 16–41. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv484>
- Creasman, W. (2009). Revised FIGO staging for carcinoma of the endometrium. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, *105*(2), 109. <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2009.02.010>
- Creutzberg, C. L., Nout, R. A., Lybeert, M. L. M., Wárlám-Rodenhuis, C. C., Jobsen, J. J., Mens, J. W. M., Lutgens, L. C. H. W., Pras, E., Van De Poll-Franse, L. V., & Van Putten, W. L. J. (2011). Fifteen-year radiotherapy outcomes of the randomized PORTEC-1 trial for Endometrial Carcinoma. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, *81*(4), 631–638. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2011.04.013>

- Creutzberg, C. L., Van Putten, W. L. J., Koper, P. C. M., Lybeert, M. L. M., Jobsen, J. J., Wárlám-Rodenhuis, C. C., De Winter, K. A. J., Lutgens, L. C. H. W., Van Den Bergh, A. C. M., Van De Steen-Banasik, E., Beerman, H., & Van Lent, M. (2000). Surgery and postoperative radiotherapy versus surgery alone for patients with stage-1 endometrial carcinoma: Multicentre randomised trial. *Lancet*, *355*(9213), 1404–1411. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02139-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02139-5)
- Cristea, S., Coles, G. L., Hornburg, D., Gershkovitz, M., Arand, J., Cao, S., Sen, T., Williamson, S. C., Kim, J. W., Drainas, A. P., He, A., Le Cam, L., Byers, L. A., Snyder, M. P., Contrepolis, K., & Sage, J. (2020). The MEK5-ERK5 kinase axis controls lipid metabolism in small-cell lung cancer. *Cancer Research*, *80*(6), 1293–1303. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-1027>
- Cude, K., Wang, Y., Choi, H. J., Hsuan, S. L., Zhang, H., Wang, C. Y., & Xia, Z. (2007). Regulation of the G2-M cell cycle progression by the ERK5-NFκB signaling pathway. *Journal of Cell Biology*, *177*(2), 253–264. <https://doi.org/10.1083/jcb.200609166>

D

- Datta, S. R., Dudek, H., Xu, T., Masters, S., Haian, F., Gotoh, Y., & Greenberg, M. E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell- intrinsic death machinery. *Cell*, *91*(2), 231–241. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80405-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80405-5)
- de Boer, S. M., Powell, M. E., Mileshkin, L., Katsaros, D., Bessette, P., Haie-Meder, C., Ottevanger, P. B., Ledermann, J. A., Khaw, P., D'Amico, R., Fyles, A., Baron, M. H., Jürgenliemk-Schulz, I. M., Kitchener, H. C., Nijman, H. W., Wilson, G., Brooks, S., Gribaudo, S., Provencher, D., Tubiana-Mathieu, N. (2019). Adjuvant chemoradiotherapy versus radiotherapy alone in women with high-risk endometrial cancer (PORTEC-3): patterns of recurrence and post-hoc survival analysis of a randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, *20*(9), 1273–1285. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30395-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30395-X)
- De Jong, P. R., Taniguchi, K., Harris, A. R., Bertin, S., Takahashi, N., Duong, J., Campos, A. D., Powis, G., Corr, M., Karin, M., & Raz, E. (2016). ERK5 signalling rescues intestinal epithelial turnover and tumour cell proliferation upon ERK1/2 abrogation. *Nature Communications*, *7*(11551), 1–15. <https://doi.org/10.1038/ncomms11551>
- De Smaele, E., Zazzeroni, F., Papa, S., Nguyen, D. U., Jin, R., Jones, J., Cong, R., & Franzoso, G. (2001). Induction of gadd4β by NF-κB downregulates pro-apoptotic JNK signalling. *Nature*, *414*(6861), 308–313. <https://doi.org/10.1038/35104560>
- Dean, M., Hamon, Y., & Chimini, G. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of Lipid Research*, *42*(7), 1007–1017. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)31588-1](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)31588-1)
- Deng, X., Elkins, J. M., Zhang, J., Yang, Q., Erazo, T., Gomez, N., Choi, H. G., Wang, J., Dzamko, N., Lee, J. D., Sim, T., Kim, N., Alessi, D. R., Lizcano, J. M., Knapp, S., & Gray, N. S. (2013). Structural determinants for ERK5 (MAPK7) and leucine rich repeat kinase 2 activities of benzo[e]pyrimido-[5,4-b]diazepine-6(11H)-ones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *70*, 758–767. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.10.052>
- Deng, X., Yang, Q., Kwiatkowski, N., Sim, T., Mcdermott, U., Settleman, E., Lee, J., & Gray, N. S. (2011). Discovery of a benzo[e]pyrimido-[5,4-b][1,4]diazepin-6(11H)-one as a Potent and Selective Inhibitor of Big MAP Kinase 1. *ACS Medical Chemistry Letters*, *6*(3), 195–200.
- DeWire, S. M., Ahn, S., Lefkowitz, R. J., & Shenoy, S. K. (2007). β-Arrestins and cell signaling. *Annual Review of Physiology*, *69*, 483–510. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.022405.154749>
- Di Fiore, P. P., Pierce, J. H., Fleming, T. P., Hazan, R., Ullrich, A., King, C. R., Schlessinger, J., & Aaronson, S. A. (1987). Overexpression of the human EGF receptor confers an EGF-dependent transformed phenotype to NIH 3T3 cells. *Cell*, *51*(6), 1063–1070. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90592-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90592-7)

- Díaz-Rodríguez, E., & Pandiella, A. (2010). Multisite phosphorylation of Erk5 in mitosis. *Journal of Cell Science*, 123(18), 3146–3156. <https://doi.org/10.1242/jcs.070516>
- Dinev, D., Jordan, B. W. M., Neufeld, B., Lee, J., Lindemann, D., Rapp, U. R., & Ludwig, S. (2001). Extracellular signal regulated kinase 5 (ERK5) is required for the differentiation of muscle cells. *EMBO Rep.* 2(9), 829–834. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve177>
- Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J., & Matias-Guiu, X. (2005). NF-κB in development and progression of human cancer. *Virchows Archiv*, 446(5), 475–482. <https://doi.org/10.1007/s00428-005-1264-9>
- Dong, F., Gutkind, J. S., & Lerner, A. C. (2001). Granulocyte colony-stimulating factor induces Erk5 activation, which is differentially regulated by protein-tyrosine kinases and protein kinase C: Regulation of cell proliferation and survival. *Journal of Biological Chemistry*, 276(14), 10811–10816. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008748200>
- Dong, M., Jiang, S., Tian, W., Yan, Y., Gao, C., Gao, J., Sheng, Y., Wang, Y., & Xue, F. (2018). Preliminary clinical application of an aromatase inhibitor and a gonadotropin-releasing hormone agonist combination for inoperable endometrial cancer patients with comorbidities: case report and literature review. *Cancer Biology and Therapy*, 19(11), 956–961. <https://doi.org/10.1080/15384047.2018.1456609>
- Dong, W., Li, H., Zhang, Y., Yang, H., Guo, M., Li, L., & Liu, T. (2011). Matrix metalloproteinase 2 promotes cell growth and invasion in colorectal cancer. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 43(11), 840–848. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmr085>
- Dubois, S. G., Marachelian, A., Fox, E., Kudgus, R. A., Reid, J. M., Groshen, S., Malvar, J., Bagatell, R., Wagner, L., Maris, J. M., Hawkins, R., Courtier, J., Lai, H., Goodarzian, F., Shimada, H., Czarnecki, S., Tsao-wei, D., Matthay, K. K., & Mosse, Y. P. (2016). Phase I Study of the Aurora A Kinase Inhibitor Alisertib in Combination With Irinotecan and Temozolomide for Patients With Relapsed or Refractory Neuroblastoma: A NANT (New Approaches to Neuroblastoma Therapy) Trial. *Journal of Clinical Oncology*, 34(12), 1–10. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.65.4889>

E

- Ember, S. W. J., Zhu, J. Y., Olesen, S. H., Martin, M. P., Becker, A., Berndt, N., Georg, G. I., & Schonbrunn, E. (2014). Acetyl-lysine binding site of bromodomain-containing protein 4 (BRD4) interacts with diverse kinase inhibitors. *ACS Chemical Biology*, 9(5), 1160–1171. <https://doi.org/10.1021/cb500072z>
- Engelsen, I. B., Akslén, L. A., & Salvesen, H. B. (2009). Biologic markers in endometrial cancer treatment. *Apmis*, 117(10), 693–707. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02467.x>
- English, J. M., Vanderbilt, C. A., Xu, S., Marcus, S., & Cobb, M. H. (1995). Isolation of MEK5 and differential expression of alternatively spliced forms. *Journal of Biological Chemistry*, 270(48), 28897–28902. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.48.28897>
- English, J. M., Pearson, G., Baer, R., & Cobb, M. H. (1998). Identification of substrates and regulators of the mitogen-activated protein kinase ERK5 using chimeric protein kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 273(7), 3854–3860. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.7.3854>
- Erazo, T., Moreno, A., Ruiz-Babot, G., Rodríguez-Asiain, A., Morrice, N. A., Espadamala, J., Bayascas, J. R., Gomez, N., & Lizcano, J. M. (2013). Canonical and Kinase Activity-Independent Mechanisms for Extracellular Signal-Regulated Kinase 5 (ERK5) Nuclear Translocation Require Dissociation of Hsp90 from the ERK5-Cdc37 Complex. *Molecular and Cellular Biology*, 33(8), 1671–1686. <https://doi.org/10.1128/mcb.01246-12>
- Erazo, T., Espinosa-Gil, S., Diéguez-Martínez, N., Gómez, N., & Lizcano, J. M. (2020). SUMOylation Is Required for ERK5 Nuclear Translocation and ERK5-Mediated Cancer Cell Proliferation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 2203. <https://doi.org/10.3390/ijms21062203>

Esparis-Ogando, A., Diaz-Rodriguez, E., Montero, J. C., Yuste, L., Crespo, P., & Pandiella, A. (2002). Erk5 Participates in Neuregulin Signal Transduction and Is Constitutively Active in Breast Cancer Cells Overexpressing ErbB2. *Mol. Cell Biol.* 22(1), 270–285. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.1.270-285.2002>

F

Fader, A. N., Roque, D. M., Siegel, E., Buza, N., Hui, P., Abdelghany, O., Chambers, S., Secord, A. A., Havrilesky, L., O'Malley, D. M., Backes, F. J., Nevadunsky, N., Edraki, B., Pikaart, D., Lowery, W., ElSahwi, K., Celano, P., Bellone, S., Azodi, M., Santin, A. D. (2020). Randomized Phase II Trial of Carboplatin-Paclitaxel Compared with Carboplatin-Paclitaxel-Trastuzumab in Advanced (Stage III-IV) or Recurrent Uterine Serous Carcinomas that Overexpress Her2/Neu (NCT01367002): Updated Overall Survival Analysis. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 26(15), 3928–3935. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-0953>

Farnaby, W., Koegl, M., McConnell, D. B., & Ciulli, A. (2021). Transforming targeted cancer therapy with PROTACs: A forward-looking perspective. *Curr. Opin. Pharmacology*, 30(57), 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2021.02.009>

Felip, I., Pablo, C., Megino-luque, C., Lopez-gil, C., Cabrera, S., Solé-sánchez, S., Muñoz-guardiola, P., Megias-Roda, E., Pérez-montoyo, H., Alfon, J., Yeste-velasco, M., Santacana, M., Dolcet, X., Reques, A., Oaknin, A., Rodríguez-freixinos, V., Miguel, J., Domènech, C., Gil-moreno, A., Eritja, N. (2019). Gynecologic Oncology Therapeutic potential of the new TRIB3-mediated cell autophagy anticancer drug ABTL0812 in endometrial cancer. *Gynecologic Oncology*, 153(2), 425–435. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2019.03.002>

Ferguson, F. M., Nabet, B., Raghavan, S., Liu, Y., Leggett, A. L., Kuljanin, M., Kalekar, R. L., Yang, A., He, S., Wang, J., Ng, R. W. S., Sulahian, R., Li, L., Poulin, E. J., Huang, L., Koren, J., Dieguez-Martinez, N., Espinosa, S., Zeng, Z., Gray, N. S. (2020). Discovery of a selective inhibitor of doublecortin like kinase 1. *Nature Chemical Biology*, 16(6), 635–643. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0506-0>

Finegan, K. G., Wang, X., Lee, E. J., Robinson, A. C., & Tournier, C. (2009). Regulation of neuronal survival by the extracellular signal-regulated protein kinase 5. *Cell Death and Differentiation*, 16(5), 674–683. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.193>

Finegan, Katherine G., Perez-Madrigal, D., Hitchin, J. R., Davies, C. C., Jordan, A. M., & Tournier, C. (2015). ERK5 is a critical mediator of inflammation-driven cancer. *Cancer Research*, 75(4), 742–753. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3043>

Fleming, G. F. (2007). Systemic chemotherapy for uterine carcinoma: Metastatic and adjuvant. *Journal of Clinical Oncology*, 25(20), 2983–2990. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.10.8431>

Fleming, G. F., Filiaci, V. L., Marzullo, B., Zaino, R. J., Davidson, S. A., Pearl, M., Makker, V., Burke, J. J., Zweizig, S. L., Van Le, L., Hanjani, P., Downey, G., Walker, J. L., Reyes, H. D., & Leslie, K. K. (2014). Temsirolimus with or without megestrol acetate and tamoxifen for endometrial cancer: A gynecologic oncology group study. *Gynecologic Oncology*, 132(3), 585–592. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.01.015>

Fleming, G. F., Sill, M. W., Darcy, K. M., McMeekin, D. S., Thigpen, J. T., Adler, L. M., Berek, J. S., Chapman, J. A., DiSilvestro, P. A., Horowitz, I. R., & Fiorica, J. V. (2010). Phase II trial of trastuzumab in women with advanced or recurrent, HER2-positive endometrial carcinoma: A Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic Oncology*, 116(1), 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2009.09.025>

Foster, J. H., Voss, S. D., Hall, D. C., Minard, C. G., Balis, F. M., Wilner, K., Berg, S. L., Fox, E., Adamson, P. C., Blaney, S. M., Weigel, B. J., & Moss, Y. P. (2021). Activity of Crizotinib in Patients with ALK-Aberrant Relapsed / Refractory Neuroblastoma: A Children' s Oncology Group Study (ADVLO912). *Clinical Cancer Research*, 30(12), 1–7. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-4224>

Fusco, F., Mercadante, V., Miano, M. G., & Ursini, M. V. (2006). Multiple regulatory regions and tissue-specific transcription initiation mediate the expression of NEMO/IKK γ gene. *Gene*, 383(13), 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.07.022>

G

Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O., Castedo, M., & Kroemer, G. (2012). Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*, 31(15), 1869–1883. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.384>

Gao, J., Tian, J., Lv, Y., Shi, F., Kong, F., Shi, H., & Zhao, L. (2009). Leptin induces functional activation of and PI3K / AKT pathways in human endometrial cancer cells. *The Official Journal of Japanese Cancer Association*, 100(3), 389–395. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.01053.x>

Garaude, J., Cherni, S., Kaminski, S., Delepine, E., Chable-Bessia, C., Benkirane, M., Borges, J., Pandiella, A., Iñiguez, M. A., Fresno, M., Hipskind, R. A., & Villalba, M. (2006). ERK5 Activates NF- κ B in Leukemic T Cells and Is Essential for Their Growth In Vivo. *The Journal of Immunology*, 177(11), 7607–7617. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.11.7607>

Gavagni, F. M., Arnesen, V. S., Jacobsen, R. G., Krakstad, C., Hoivik, E. A., & Lewis, A. E. (2018). Class I phosphoinositide 3-kinase PIK3CA/p110 α and PIK3CB/p110 β isoforms in endometrial cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms19123931>

Gavine, P. R., Wang, M., Yu, D., Hu, E., Huang, C., Xia, J., Su, X., Fan, J., Zhang, T., Ye, Q., Zheng, L., Zhu, G., Qian, Z., Luo, Q., Hou, Y. Y., & Ji, Q. (2015). Identification and validation of dysregulated MAPK7 (ERK5) as a novel oncogenic target in squamous cell lung and esophageal carcinoma. *BMC Cancer*, 15(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1455-y>

Gehrig, P. A., & Bae-Jump, V. L. (2010). Promising novel therapies for the treatment of endometrial cancer. *Gynecologic Oncology*, 116(2), 187–194. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2009.10.041>

George, R. E., Sanda, T., Hanna, M., Fröhling, S., Luther, W., Zhang, J., Ahn, Y., Zhou, W., London, W. B., McGrady, P., Xue, L., Zozulya, S., Gregor, V. E., Webb, T. R., Gray, N. S., Gilliland, D. G., Diller, L., Greulich, H., Morris, S. W., Look, A. T. (2008). Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature*, 455(7215), 975–978. <https://doi.org/10.1038/nature07397>

Gilmore, T. D. (2006). Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 25(3), 6680–6684. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209954>

Gírio, A., Montero, J. C., Pandiella, A., & Chatterjee, S. (2007). ERK5 is activated and acts as a survival factor in mitosis. *Cellular Signalling*, 19(9), 1964–1972. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.05.005>

Goh, K. C., Novotny-Diermayr, V., Hart, S., Ong, L. C., Loh, Y. K., Cheong, A., Tan, Y. C., Hu, C., Jayaraman, R., William, A. D., Sun, E. T., Dymock, B. W., Ong, K. H., Ethirajulu, K., Burrows, F., & Wood, J. M. (2012). TG02, a novel oral multi-kinase inhibitor of CDKs, JAK2 and FLT3 with potent anti-leukemic properties. *Leukemia*, 26(2), 236–243. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.218>

Gomez, N., Erazo, T., & Lizcano, J. M. (2016). ERK5 and cell proliferation: Nuclear localization is what matters. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00105>

Gray, P. J., Stevenson, M. A., & Calderwood, S. K. (2007). Targeting Cdc37 inhibits multiple signaling pathways and induces growth arrest in prostate cancer cells. *Cancer Research*, 67(24), 11942–11950. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-3162>

Guan, K., Broyles, S., & Dixon, J. E. (1991). A Tyr/Ser protein phosphatase encoded by vaccinia virus. *Nature*, 354(2), 56–58.

Guo, Z., Clydesdale, G., Cheng, J., Kim, K., Gan, L., McConkey, D. J., Ullrich, S. E., Zhuang, Y., & Su, B. (2002). Disruption of Mekk2 in Mice Reveals an Unexpected Role for MEKK2 in Modulating T-Cell Receptor Signal Transduction. *Molecular and Cellular Biology*, 22(16), 5761–5768. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.16.5761-5768.2002>

H

Hanker, A. B., Kaklamani, V., & Arteaga, C. L. (2019). Challenges for the Clinical Development of PI3K Inhibitors: Strategies to Improve Their Impact in Solid Tumors. *Cancer Discovery*, 9(4), 1–11. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-1175>

Hartmann, J. U., Bräuer-Hartmann, D., Kardosova, M., Wurm, A. A., Wilke, F., Schödel, C., Gerloff, D., Katzerke, C., Krakowsky, R., Namasu, C. Y., Bill, M., Schwind, S., Müller-Tidow, C., Niederwieser, D., Alberich-Jorda, M., & Behre, G. (2018). MicroRNA-143 targets ERK5 in granulopoiesis and predicts outcome of patients with acute myeloid leukemia. *Cell Death and Disease*, 9(8). <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0837-x>

Hay, N. (2005). The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. *Cancer Cell*, 8(3), 179–183. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.08.008>

Hayashi, M., Fearn, C., Eliceiri, B., Yang, Y., & Lee, J. D. (2005). Big mitogen-activated protein kinase 1/extracellular signal-regulated kinase 5 signaling pathway is essential for tumor-associated angiogenesis. *Cancer Research*, 65(17), 7699–7706. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4540>

Hayashi, M., & Lee, J. D. (2004). Role of the BMK1/ERK5 signaling pathway: Lessons from knockout mice. *Journal of Molecular Medicine*, 82(12), 800–808. <https://doi.org/10.1007/s00109-004-0602-8>

Hayashi, M., Tapping, R. I., Chao, T. H., Lo, J. F., King, C. C., Yang, Y., & Lee, J. D. (2001). BMK1 Mediates Growth Factor-induced Cell Proliferation through Direct Cellular Activation of Serum and Glucocorticoid-inducible Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(12), 8631–8634. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000838200>

Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2008). Shared Principles in NF- κ B Signaling. *Cell*, 132(3), 344–362. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.020>

Healy, S. J. M., Gorman, A. M., Mousavi-Shafaei, P., Gupta, S., & Samali, A. (2009). Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy. *European Journal of Pharmacology*, 625(1–3), 234–246. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.06.064>

Heidorn, S. J., Milagre, C., Whittaker, S., Nourry, A., Niculescu-Duvas, I., Dhomen, N., Hussain, J., Reis-Filho, J. S., Springer, C. J., Pritchard, C., & Marais, R. (2010). Kinase-Dead BRAF and Oncogenic RAS Cooperate to Drive Tumor Progression through CRAF. *Cell*, 140(2), 209–221. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.040>

Henssen, A., Althoff, K., Odersky, A., Beckers, A., Speleman, F., Schäfers, S., Bell, E., Nortmeyer, M., Preter, K., De, Florin, A., Heukamp, L., Spruessel, A., Astrahaneff, K., Lindner, S., Sadowski, N., & Schramm, A. (2015). Targeting MYCN-driven transcription by BET-bromodomain inhibition Results: *Clinical Cancer Research*, 22(10), 2470–2481. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1449>

Heudel, P. E., Fabbro, M., Roemer-Becuwe, C., Kaminsky, M. C., Arnaud, A., Joly, F., Roche-Forestier, S., Meunier, J., Foa, C., You, B., Priou, F., Tazi, Y., Floquet, A., Selle, F., Berton-Rigaud, D., Lesoin, A., Kalbacher, E., Lortholary, A., Favier, L., ... Ray-Coquard, I. (2017). Phase II study of the PI3K inhibitor BKM120 in patients with advanced or recurrent endometrial carcinoma: A stratified type I-type II study from the GINECO group. *British Journal of Cancer*, 116(3), 303–309. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.430>

Hoang, V. T., Matossian, M. D., Ucar, D. A., Elliott, S., La, J., Wright, M. K., Burks, H. E., Perles, A., Hossain, F., King, C. T., Browning, V. E., Bursavich, J., Fang, F., Del Valle, L., Bhatt, A. B., Cavanaugh, J. E., Flaherty, P. T., Anbalagan, M., Rowan, B. G., Burow, M. E. (2020). ERK5 Is Required for Tumor Growth and Maintenance Through Regulation of the Extracellular Matrix in Triple Negative Breast Cancer. *Frontiers in Oncology*, 10(2), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01164>

- Hoffmann, R., Sarkar, S., Roy, D., Winterhoff, B., Schmidmaier, R., Dredge, K., Hammond, E., & Shridhar, V. (2020). Sulfated glycolipid PG545 induces endoplasmic reticulum stress and augments autophagic flux by enhancing anticancer chemotherapy efficacy in endometrial cancer. *Biochemical Pharmacology*, *178*(114003), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114003>
- Hsieh, F., Cheng, G., & Lin, J. (2005). Evaluation of potential Stat3-regulated genes in human breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. *335*(2), 292–299. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.07.075>
- Huang, C., Ma, W. Y., & Dong, Z. (1996). Requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in epidermal growth factor-induced AP-1 transactivation and transformation in JB6 P+ cells. *Molecular and Cellular Biology*, *16*(11), 6427–6435. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.11.6427>
- Huang, C. Y., & Tan, T. H. (2012). DUSPs, to MAP kinases and beyond. *Cell and Bioscience*, *2*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-2-24>
- Huang, Y., Yao, J., Zhu, B., Zhang, J., & Sun, T. (2017). Mitogen-activated protein kinase 7 promotes cell proliferation, migration and invasion in SOSP-M human osteosarcoma cell line. *Tumori*, *103*(5), 483–488. <https://doi.org/10.5301/tj.5000399>

I

- Ibrahim, A. F., Weirauch, U., Thomas, M., Grünweller, A., Hartmann, R. K., & Aigner, A. (2011). MicroRNA replacement therapy for miR-145 and miR-33a is efficacious in a model of colon carcinoma. *Cancer Research*, *71*(15), 5214–5224. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4645>
- Iñesta-Vaquera, F. A., Campbell, D. G., Tournier, C., Gómez, N., Lizcano, J. M., & Cuenda, A. (2010). Alternative ERK5 regulation by phosphorylation during the cell cycle. *Cellular Signalling*, *22*(12), 1829–1837. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.07.010>
- Irizarry, R. A., Hobbs, B., Beazer-barclay, Y. D., Antonellis, K. J., Scherf, U. W. E., & Speed, T. P. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*, *4*(2), 249–264. <https://doi.org/10.1093/biostatistics/4.2.249>

J

- Jacque, E., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V. L. J., & Ley, S. C. (2015). BAFF activation of the ERK5 MAP kinase pathway regulates B cell survival The Journal of Experimental Medicine. *The Journal of Experimental Medicine*, *212*(6), 883–892. <https://doi.org/10.1084/jem.20142127>
- Jančík, S., Drábek, J., Radzioch, D., & Hajdúch, M. (2010). Clinical relevance of KRAS in human cancers. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2010*(2), 1–13. <https://doi.org/10.1155/2010/150960>
- Javelaud, D., & Besançon, F. (2001). NF-κB activation results in rapid inactivation of JNK in TNFα-treated Ewing sarcoma cells: A mechanism for the anti-apoptotic effect of NF-κB. *Oncogene*, *20*(32), 4365–4372. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204570>
- Jewell, E., Secord, A. A., Brotherton, T., & Berchuck, A. (2006). Use of trastuzumab in the treatment of metastatic endometrial cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*, *16*(3), 1370–1373. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1438.2006.00543.x>
- Jiang, W., Cai, F., Xu, H., Lu, Y., Chen, J., Liu, J., Cao, N., Zhang, X., Chen, X., Huang, Q., Zhuang, H., & Hua, Z. C. (2020). Extracellular signal regulated kinase 5 promotes cell migration, invasion and lung metastasis in a FAK-dependent manner. *Protein and Cell*, *11*(11), 825–845. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00701-1>

- Jiang, W., Jin, G., Cai, F., Chen, X., Cao, N., Zhang, X., Liu, J., Chen, F., Wang, F., Dong, W., Zhuang, H., & Hua, Z. C. (2019). Extracellular signal-regulated kinase 5 increases radioresistance of lung cancer cells by enhancing the DNA damage response. *Experimental and Molecular Medicine*, *51*(2), 1–20. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0209-3>
- Johnson, G. L., & Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*, *298*(5600), 1911–1912. <https://doi.org/10.1126/science.1072682>
- Jongen, W. F., Fitzgerald, D. J., Asamoto, M., Piccoli, C., Slaga, T. J., Gros, D., Takeichi, M., & Yamasaki, H. (1991). Regulation of connexin 43-mediated gap junctional intercellular communication by Ca²⁺ in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin. *Journal of Cell Biology*, *114*(3), 545–555. <https://doi.org/10.1083/jcb.114.3.545>
- Jonkers, I., & Lis, J. T. (2015). Getting up to speed with transcription elongation by RNA polymerase II. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *16*(3), 167–177. <https://doi.org/10.1038/nrm3953>
- Jost, P. J., & Ruland, J. (2016). Review in translational hematology Aberrant NF-κB signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. *Blood Journal*, *109*(7), 2700–2708. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-07-025809>

K

- Kamakura, S., Moriguchi, T., & Nishida, E. (1999). Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(37), 26563–26571. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.37.26563>
- Kanamori, Y., Kigawa, J., Itamochi, H., Sultana, H., Suzuki, M., Ohwada, M., Kamura, T., Sugiyama, T., Kikuchi, Y., Kita, T., Fujiwara, K., & Terakawa, N. (2002). PTEN expression is associated with prognosis for patients with advanced endometrial carcinoma undergoing postoperative chemotherapy. *International Journal of Cancer*, *100*(6), 686–689. <https://doi.org/10.1002/ijc.10542>
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nuclei Acids Research*, *28*(1), 27–30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Furumichi, M., & Tanabe, M. (2012). KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nuclei Acids Research*, *40*(3), 109–114. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr988>
- Kang, C., Kim, J. S., Kim, C. Y., Kim, E. Y., & Chung, H. M. (2018). The pharmacological inhibition of ERK5 enhances apoptosis in acute myeloid leukemia cells. *International Journal of Stem Cells*, *11*(2), 227–234. <https://doi.org/10.15283/ijsc18053>
- Karin, M. (1995). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(28), 16483–16486. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.28.16483>
- Karin, M., & Ben-neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: The Control of NF-κB Activity. *Annual Review of Immunology*, *18*(2), 621–663. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.621>
- Kasler, H. G., Victoria, J., Duramad, O., & Winoto, A. (2000). ERK5 Is a Novel Type of Mitogen-Activated Protein Kinase Containing a Transcriptional Activation Domain. *Molecular and Cellular Biology*, *20*(22), 8382–8389. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.22.8382-8389.2000>
- Katayama, Y., Sakai, A., Okikawa, Y., Oue, N., Asaoku, H., Sasaki, A., Imanaka, F., Tsujimoto, T., Takimoto, Y., Masuda, R., Nakaju, N., Otsuki, T., Yasui, W., & Kimura, A. (2004). Cyclin D1 overexpression is not a specific grouping marker, but may collaborate with CDC37 in myeloma cells. *International Journal of Oncology*, *25*(3), 579–595. <https://doi.org/10.3892/ijo.25.3.579>

- Kato, T., Delhase, M., Hoffmann, A., & Karin, M. (2003). CK2 is a C-terminal I κ B kinase responsible for NF- κ B activation during the UV response. *Molecular Cell*, *12*(4), 829–839. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00358-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00358-7)
- Kato, Y., Chao, T. H., Hayashi, M., Tapping, R. I., & Lee, J. D. (2000). Role of BMK1 in regulation of growth factor-induced cellular responses. *Immunologic Research*, *21*(2–3), 233–237. <https://doi.org/10.1385/ir:21:2-3:233>
- Kato, Y., Kravchenko, V. V., Tapping, R. I., Han, J., Ulevitch, R. J., & Lee, J. D. (1997). BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *EMBO Journal*, *16*(23), 7054–7066. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.23.7054>
- Kato Y., Tapping, R. I., Huang S., Watson, M. H., Ulevitch, R. J., & Lee, J. D. (1998). Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature*, *246*(5429), 170. <https://doi.org/10.1038/246170a0>
- Kesavan, K., Lobel-Rice, K., Sun, W., Lapadat, R., Webb, S., Johnson, G. L., & Garrington, T. P. (2004). MEKK2 Regulates the Coordinate Activation of ERK5 and JNK in Response to FGF-2 in Fibroblasts. *Journal of Cellular Physiology*, *199*(1), 140–148. <https://doi.org/10.1002/jcp.10457>
- Keshelava, N., Seeger, R. C., Groshen, S., & Reynolds, C. P. (1998). Drug resistance patterns of human neuroblastoma cell lines derived from patients at different phases of therapy. *Cancer Research*, *58*(23), 5396–5405.
- Keshelava, N., Zuo, J. J., Chen, P., Waidyaratne, S. N., Luna, M. C., Gomer, C. J., Triche, T. J., & Reynolds, C. P. (2001). Loss of p53 Function Confers High-Level Multidrug Resistance in Neuroblastoma cell lines. *Cancer Research*, *61*(4), 6185–6193.
- Kim, S., Lee, H., Park, Y., Lee, Y., & Seo, S. W. (2011). ERK5 Regulates Invasiveness of Osteosarcoma by Inducing MMP-9. *Journal of Orthopaedic Research*, *30*(7), 1040–1044. <https://doi.org/10.1002/jor.22025>
- Kimura, T. E., Jin, J., Zi, M., Prehar, S., Liu, W., Oceandy, D., Abe, J. I., Neyses, L., Weston, A. H., Cartwright, E. J., & Wang, X. (2010). Targeted deletion of the extracellular signal-regulated protein kinase 5 attenuates hypertrophic response and promotes pressure overload-induced apoptosis in the heart. *Circulation Research*, *106*(5), 961–970. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.209320>
- Koboldt, D. C., Fulton, R. S., McLellan, M. D., Schmidt, H., Kalicki-Veizer, J., McMichael, J. F., Fulton, L. L., Dooling, D. J., Ding, L., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Ally, A., Balasundaram, M., Butterfield, Y. S. N., Carlsen, R., Carter, C., Chu, A., Chuah, E., Chun, H. J. E., Palchik, J. D. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, *490*(7418), 61–70. <https://doi.org/10.1038/nature11412>
- Kokka, F., Brockbank, E., Oram, D., Gallagher, C., & Bryant, A. (2010). Hormonal therapy in advanced or recurrent endometrial cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, *2010*(12). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007926.pub2>
- Kondoh, K., Terasawa, K., Morimoto, H., & Nishida, E. (2006). Regulation of Nuclear Translocation of Extracellular Signal-Regulated Kinase 5 by Active Nuclear Import and Export Mechanisms. *Molecular and Cellular Biology*, *26*(5), 1679–1690. <https://doi.org/10.1128/mcb.26.5.1679-1690.2006>
- Konecny, G. E., Santos, L., Winterhoff, B., Hatmal, M., Keeney, G. L., Mariani, A., Jones, M., Neuper, C., Thomas, B., Muderspach, L., Riehle, D., Wang, H. J., Dowdy, S., Podratz, K. C., & Press, M. F. (2009). HER2 gene amplification and EGFR expression in a large cohort of surgically staged patients with nonendometrioid (type II) endometrial cancer. *British Journal of Cancer*, *100*(1), 89–95. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604814>
- Koul, A., Willén, R., Bendahl, P. O., Nilbert, M., & Borg, Å. (2002). Distinct sets of gene alterations in endometrial carcinoma implicate alternate modes of tumorigenesis. *Cancer*, *94*(9), 2369–2379. <https://doi.org/10.1002/cncr.10498>

Kramer, K., Kushner, B., Heller, G., & Cheung, N. K. (2001). Neuroblastoma metastatic to the central nervous system. The Memorial Sloan-Kettering Cancer Center Experience and A Literature Review. *Cancer*, *91*(8), 1510–1519. <https://doi.org/10.1172/JCI37539>

L

Lagarda, H., Catusas, L., Arguelles, R., Matias-Guiu, X., & Prat, J. (2001). K-ras mutations in endometrial carcinomas with microsatellite instability. *Journal of Pathology*, *193*(2), 193–199. [https://doi.org/10.1002/1096-9896\(2000\)9999:9999::AID-PATH769>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1096-9896(2000)9999:9999::AID-PATH769>3.0.CO;2-9)

Latchman, D. S. (1997). Transcription factors: An overview. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *29*(12), 1305–1312. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(97\)00085-X](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(97)00085-X)

Lee, J., Ulevitch, R., & Han, J. (1995). Primary structure of BMK1: a new mammalian MAP Kinase. *Biochem Biophys Res Commun*. *213*(2), 715–724. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2189>

Leong, P., Thorner, P., Yeger, H., Ng, K., Zhang, Z., & Squire, J. (1993). Detection of MYCN gene amplification and deletions of chromosome 1p in neuroblastoma by in situ hybridization using routine histologic sections. *Lab Invest*, *69*(1), 43–50. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1947>

Levine, D. A., Getz, G., Gabriel, S. B., Cibulskis, K., Lander, E., Sivachenko, A., Sougnez, C., Lawrence, M., Kandoth, C., Dooling, D., Fulton, R., Fulton, L., Kalicki-Veizer, J., McLellan, M. D., O’Laughlin, M., Schmidt, H., Wilson, R. K., Ye, K., Li, D., Gordon Robertson, A. (2013). Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*, *497*(7447), 67–73. <https://doi.org/10.1038/nature12113>

Li, T., Pan, Y. W., Wang, W., Abel, G., Zou, J., Xu, L., Storm, D. R., & Xia, Z. (2013). Targeted Deletion of the ERK5 MAP Kinase Impairs Neuronal Differentiation, Migration, and Survival during Adult Neurogenesis in the Olfactory Bulb. *PLoS ONE*, *8*(4), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061948>

Lim, J. H., & Woo, C.-H. (2011). Laminar flow activation of ERK5 leads to cytoprotective effect via CHIP-mediated p53 ubiquitination in endothelial cells. *Anatomy & Cell Biology*, *44*(4), 265. <https://doi.org/10.5115/acb.2011.44.4.265>

Lin, E. C. K., Amantea, C. M., Nomanbhoy, T. K., Weissig, H., Ishiyama, J., Hu, Y., Sidique, S., Li, B., Kozarich, J. W., & Rosenblum, J. S. (2016). ERK5 kinase activity is dispensable for cellular immune response and proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(42), 11865–11870. <https://doi.org/10.1073/pnas.1609019113>

Liu, F., Zhang, H., & Song, H. (2017). Upregulation of MEK5 by Stat3 promotes breast cancer cell invasion and metastasis. *Oncology Reports*, *37*(1), 83–90. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5256>

Liu, H., Wen, T., Zhou, Y., Fan, X., Du, T., Gao, T., Li, L., Liu, J., Yang, L., Yao, J., Ge, Y., & An, G. (2019). DCLK1 plays a metastatic-promoting role in Human Breast Cancer Cells. *BioMed Research International*, *2019*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2019/1061979>

Liu, L., Cavanaugh, J. E., Wang, Y., Sakagami, H., Mao, Z., & Xia, Z. (2003). ERK5 activation of MEF2-mediated gene expression plays a critical role in BDNF-promoted survival of developing but not mature cortical neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(14), 8532–8537. <https://doi.org/10.1073/pnas.1332804100>

Liu, L., Cundiff, P., Abel, G., Wang, Y., Faigle, R., Sakagami, H., Xu, M., & Xia, Z. (2006). Extracellular signal-regulated kinase (ERK) 5 is necessary and sufficient to specify cortical neuronal fate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(25), 9697–9702. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603373103>

Lizcano, J. M., & Alessi, D. R. (2002). The insulin signalling pathway. In *Current Biology*, *12*, (7), 236–238. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00777-7](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00777-7)

- Locasale, J. W., Shaw, A. S., & Chakraborty, A. K. (2007). Scaffold proteins confer diverse regulatory properties to protein kinase cascades. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(33), 13307–13312. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706311104>
- Lochhead, P. A., Clark, J., Wang, L. Z., Gilmour, L., Squires, M., Gilley, R., Foxton, C., Newell, D. R., Wedge, S. R., & Cook, S. J. (2016). Tumor cells with KRAS or BRAF mutations or ERK5/MAPK7 amplification are not addicted to ERK5 activity for cell proliferation. *Cell Cycle*, *15*(4), 506–518. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1120915>
- Lorusso, D., Ferrandina, G., Colombo, N., Pignata, S., Pietragalla, A., Sonetto, C., Pisano, C., Lapresa, M. T., Savarese, A., Tagliaferri, P., Lombardi, D., Cinieri, S., Breda, E., Sabatucci, I., Sabbatini, R., Conte, C., Cecere, S. C., Maltese, G., & Scambia, G. (2019). Carboplatin-paclitaxel compared to Carboplatin-Paclitaxel-Bevacizumab in advanced or recurrent endometrial cancer: MITO END-2 - A randomized phase II trial. *Gynecologic Oncology*, *155*(3), 406–412. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2019.10.013>
- Lorusso, D., Ferrandina, G., Colombo, N., Pignata, S., Salutati, V., Maltese, G., Pisano, C., Lapresa, M., Savarese, A., Tagliaferri, P., Sorio, R., Cinieri, S., Breda, E., Sabbatini, R., Lepori, S., Conte, C., Cecere, S., Raspagliesi, F., & Scambia, G. (2015). Randomized phase II trial of carboplatin-paclitaxel (CP) compared to carboplatin-paclitaxel-bevacizumab (CP-B) in advanced (stage III-IV) or recurrent endometrial cancer: The MITO END-2 trial. *J Clin Oncol*, *33*(15), 5502–5502.
- Lowe, S. W. (1995). Cancer therapy and p53. *Curr Opin Oncology*, *7*(6), 547–553. <https://doi.org/10.1097/00001622-199511000-00013>.
- Luedde, T., Beraza, N., Kotsikoris, V., Loo, G. Van, Nenci, A., Vos, R. De, Roskams, T., Trautwein, C., & Pasparakis, M. (2007). Deletion of NEMO/IKK γ in Liver Parenchymal Cells Causes Steatohepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Cell*, *11*(2), 119–132. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.12.016>
- Luiz, J. P. M., Toller-Kawahisa, J. E., Viacava, P. R., Nascimento, D. C., Pereira, P. T., Saraiva, A. L., Prado, D. S., LeBert, M., Giurisato, E., Tournier, C., Cunha, T. M., Cunha, F. Q., Quesniaux, V., Ryffel, B., & Alves-Filho, J. C. (2020). MEK5/ERK5 signaling mediates IL-4-induced M2 macrophage differentiation through regulation of c-Myc expression. *Journal of Leukocyte Biology*, *108*(4), 1215–1223. <https://doi.org/10.1002/JLB.1MA0520-016R>

M

- Maier, H. J., Wagner, M., Schips, T. G., Salem, H. H., Baumann, B., & Wirth, T. (2012). Requirement of NEMO/IKK γ for effective expansion of KRAS-induced precancerous lesions in the pancreas. *Oncogene*, *32*(21), 2690–2695. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.272>
- Makker, V., Recio, F. O., Ma, L., Matulonis, U. A., Lauchle, J. O., Parmar, H., Gilbert, H. N., Ware, J. A., Zhu, R., Lu, S., Huw, L. Y., Wang, Y., Koeppen, H., Spoerke, J. M., Lackner, M. R., & Aghajanian, C. A. (2016). A multicenter, single-arm, open-label, phase 2 study of apitolisib (GDC-0980) for the treatment of recurrent or persistent endometrial carcinoma (MAGGIE study). *Cancer*, *122*(22), 3519–3528. <https://doi.org/10.1002/cncr.30286>
- Mansour, M. A., Hyodo, T., Ito, S., Kurita, K., Kokuryo, T., Uehara, K., Nagino, M., Takahashi, M., Hamaguchi, M., & Senga, T. (2015). SATB2 suppresses the progression of colorectal cancer cells via inactivation of MEK5/ERK5 signaling. *FEBS Journal*, *282*(8), 1394–1405. <https://doi.org/10.1111/febs.13227>
- Maris, J. M. (2009). Recent advances in neuroblastoma. *Current Opinion in Pediatrics*, *21*(3), 350–356. <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e32832b1240>
- Maris, J. M., Hogarty, M. D., Bagatell, R., & Cohn, S. L. (2007). Neuroblastoma. *Nature Reviews*, *2*(1), 1–21. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60983-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60983-0)

- Matei, D., Filiaci, V., Randall, M. E., Mutch, D., Steinhoff, M. M., DiSilvestro, P. A., Moxley, K. M., Kim, Y. M., Powell, M. A., O'Malley, D. M., Spirtos, N. M., Small, W., Tewari, K. S., Richards, W. E., Nakayama, J., Matulonis, U. A., Huang, H. Q., & Miller, D. S. (2019). Adjuvant Chemotherapy plus Radiation for Locally Advanced Endometrial Cancer. *New England Journal of Medicine*, *380*(24), 2317–2326. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1813181>
- Matthay, K. K., Brisse, H., Couanet, D., Couturier, J., Bénard, J., Mosseri, V., Edeline, V., Lumbroso, J., Valteau-Couanet, D., & Michon, J. (2003). Central nervous system metastases in neuroblastoma: Radiologic, clinical, and biologic features in 23 patients. *Cancer*, *98*(1), 155–165. <https://doi.org/10.1002/cncr.11448>
- Matthay, K. K., Maris, J. M., Schleiermacher, G., Nakagawara, A., Mackall, C. L., Diller, L., & Weiss, W. A. (2016). Neuroblastoma. *Nature Reviews*, *2*(1), 1–21. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.78>
- Matulonis, U., Vergote, I., Backes, F., Martin, L. P., McMeekin, S., Birrer, M., Campana, F., Xu, Y., Egile, C., & Ghamande, S. (2015). Phase II study of the PI3K inhibitor pilaralisib (SAR245408; XL147) in patients with advanced or recurrent endometrial carcinoma. *Gynecologic Oncology*, *136*(2), 246–253. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.12.019>
- Maxwell L., G., Risinger, J. I., Gumbs, C., Shaw, H., Bentley, R. C., Barrett, J. C., Berchuck, A., & Futreal, A. (1998). Mutation of the PTEN tumor suppressor gene in endometrial hyperplasias. *Cancer Research*, *58*(12), 2500–2503.
- May, M. J., & Ghosh, S. (1997). Rel/NF- κ B and I κ B proteins: An overview. *Seminars in Cancer Biology*, *8*(2), 63–73. <https://doi.org/10.1006/scbi.1997.0057>
- McCluggage, W. G., & Jenkins, D. (2003). P16 Immunoreactivity May Assist in the Distinction Between Endometrial and Endocervical Adenocarcinoma. *International Journal of Gynecological Pathology*, *22*(3), 231–235. <https://doi.org/10.1097/01.PGP.0000055172.04957.2F>
- McCracken, S. R. C., Ramsay, A., Heer, R., Mathers, M. E., Jenkins, B. L., Edwards, J., Robson, C. N., Marquez, R., Cohen, P., & Leung, H. Y. (2008). Aberrant expression of extracellular signal-regulated kinase 5 in human prostate cancer. *Oncogene*, *27*(21), 2978–2988. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210963>
- Medunjanin, S., Schleithoff, L., Fiegehenn, C., Weinert, S., Zuschratter, W., & Braun-Dullaues, R. C. (2016). GSK-3 β controls NF- κ B activity via IKK γ /NEMO. *Scientific Reports*, *6*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep38553>
- Mehta, P. B., Jenkins, B. L., McCarthy, L., Thilak, L., Robson, C. N., Neal, D. E., & Leung, H. Y. (2003). MEK5 overexpression is associated with metastatic prostate cancer, and stimulates proliferation, MMP-9 expression and invasion. *Oncogene*, *22*(9), 1381–1389. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206154>
- Melisi, D., & Chiao, P. J. (2007). NF- κ B as a target for cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, *11*(2), 133–144. <https://doi.org/10.1517/14728222.11.2.133>
- Minaguchi, T., Yoshikawa, H., Oda, K., Ishino, T., Yasugi, T., Onda, T., Nakagawa, S., Matsumoto, K., Kawana, K., & Taketani, Y. (2001). PTEN mutation located only outside exons 5, 6, and 7 is an independent predictor of favorable survival in endometrial carcinomas. *Clinical Cancer Research*, *7*(9), 2636–2642.
- Mizumoto, Y., Kyo, S., Kiyono, T., Takakura, M., Nakamura, M., Maida, Y., Mori, N., Bono, Y., Sakurai, H., & Inoue, M. (2011). Activation of NF- κ B is a novel target of KRAS-induced endometrial carcinogenesis. *Clinical Cancer Research*, *17*(6), 1341–1350. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2291>
- Mody, N., Campbell, D. G., Morrice, N., Pegg, M., & Cohen, P. (2003). An analysis of the phosphorylation and activation of extracellular-signal-regulated protein kinase 5 (ERK5) by mitogen-activated protein kinase kinase 5 (MKK5) in vitro. *Biochemical Journal*, *372*(2), 567–575. <https://doi.org/10.1042/BJ20030193>

- Molife, L. R., Yan, L., Vitfell-Rasmussen, J., Zernhelt, A. M., Sullivan, D. M., Cassier, P. A., Chen, E., Biondo, A., Tetteh, E., Siu, L. L., Patnaik, A., Papadopoulos, K. P., De Bono, J. S., Tolcher, A. W., & Minton, S. (2014). Phase 1 trial of the oral AKT inhibitor MK-2206 plus carboplatin/ paclitaxel, docetaxel, or erlotinib in patients with advanced solid tumors. *Journal of Hematology and Oncology*, *7*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-7-1>
- Montero, J. C., Ocaña, A., Abad, M., Ortiz-Ruiz, M. J., Pandiella, A., & Esparís-Ogando, A. (2009). Expression of Erk5 in early stage breast cancer and association with disease free survival identifies this kinase as potential therapeutic target. *PLoS ONE*, *4*(5), e5565 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005565>
- Morice, P., Leary, A., Creutzberg, C., Abu-Rustum, N., & Darai, E. (2016). Endometrial cancer. *The Lancet*, *387*(3), 1094–1108. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2011.12.007>
- Morimoto, H., Kondoh, K., Nishimoto, S., Terasawa, K., & Nishida, E. (2007). Activation of a C-terminal Transcriptional Activation Domain of ERK5 by Autophosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(49), 35449–35456. <https://doi.org/10.1074/jbc.m704079200>
- Morrison, D. K. (2001). KSR: A MAPK scaffold of the Ras pathway? *Journal of Cell Science*, *114*(9), 1609–1612.
- Morrison, D. K., & Davis, R. J. (2003). Regulation of MAP Kinase Signaling Modules by Scaffold Proteins in Mammals. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *19*(1), 91–118. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.111401.091942>
- Mossé, Y. P., Laudenslager, M., Longo, L., Cole, K. A., Wood, A., Attiyeh, E. F., Laquaglia, M. J., Sennett, R., Lynch, J. E., Perri, P., Laureys, G., Speleman, F., Kim, C., Hou, C., Hakonarson, H., Torkamani, A., Schork, N. J., Brodeur, G. M., Tonini, G. P., Maris, J. M. (2008). Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature*, *455*(7215), 930–935. <https://doi.org/10.1038/nature07261>
- Mullassery, D., Farrelly, P., & Losty, P. D. (2014). Does aggressive surgical resection improve survival in advanced stage 3 and 4 neuroblastoma? A systematic review and meta-analysis. *Pediatric Hematology and Oncology*, *31*(8), 703–716. <https://doi.org/10.3109/08880018.2014.947009>
- Mulloy, R., Salinas, S., Philips, A., & Hipskind, R. A. (2003). Activation of cyclin D1 expression by the ERK5 cascade. *Oncogene*, *22*(35), 5387–5398. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206839>
- Murphy, L. J., Gong, Y., and Murphy, L. C., (1991). Regulation of transforming growth factor gene expression in human endometrial adenocarcinoma cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *41*(3–8), 309–314. [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(92\)90356-N](https://doi.org/10.1016/0960-0760(92)90356-N)

N

- Nakamura, K., & Johnson, G. L. (2003). PB1 domains of MEKK2 and MEKK3 interact with the MEK5 PB1 domain for activation of the ERK5 pathway. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(39), 36989–36992. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300313200>
- Nakaoka, Y., Nishida, K., Fujio, Y., Izumi, M., Terai, K., Oshima, Y., Sugiyama, S., Matsuda, S., Koyasu, S., Yamauchi-Takahara, K., Hirano, T., Kawase, I., & Hirota, H. (2003). Activation of gp130 transduces hypertrophic signal through interaction of scaffolding/docking protein Gab1 with tyrosine phosphatase SHP2 in cardiomyocytes. *Circulation Research*, *93*(3), 221–229. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000085562.48906.4A>
- Neklesa, T., Snyder, L. B., Willard, R. R., Vitale, N., Pizzano, J., Gordon, D. A., Bookbinder, M., Macaluso, J., Dong, H., Ferraro, C., Wang, G., Wang, J., Crews, C. M., Houston, J., Crew, A. P., & Taylor, I. (2019). ARV-110: An oral androgen receptor PROTAC degrader for prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology*, *10*(8), 250–259. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-NB2020-054>

- Nguyen, D., Lemos, C., Wortmann, L., Eis, K., Holton, S. J., Boemer, U., Moosmayer, D., Eberspaecher, U., Weiske, J., Lechner, C., Prechtel, S., Suelzle, D., Siegel, F., Prinz, F., Lesche, R., Nicke, B., Nowak-Reppel, K., Himmel, H., Mumberg, D., ... Haegebarth, A. (2019). Discovery and Characterization of the Potent and Highly Selective (Piperidin-4-yl)pyrido[3,2- d]pyrimidine Based in Vitro Probe BAY-885 for the Kinase ERK5 [Research-article]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(2), 928–940. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01606>
- Nishimoto, S., Kusakabe, M., & Nishida, E. (2005). Requirement of the MEK5-ERK5 pathway for neural differentiation in *Xenopus* embryonic development. *EMBO Reports*, 6(11), 1064–1069. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400515>
- Nishimoto, S., & Nishida, E. (2006). MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. *EMBO Reports*, 7(8), 782–786. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400755>

O

- O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L. A., Hausmann, G., Adams, J. M., Cory, S., & Huang, D. C. S. (1998). Bim: A novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO Journal*, 17(2), 384–395. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.2.384>
- O'Reilly, K. E., Rojo, F., She, Q. B., Solit, D., Mills, G. B., Smith, D., Lane, H., Hofmann, F., Hicklin, D. J., Ludwig, D. L., Baselga, J., & Rosen, N. (2006). mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Research*, 66(3), 1500–1508. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2925>
- Okuda, T., Sekizawa, A., Purwosunu, Y., Nagatsuka, M., Morioka, M., Hayashi, M., & Okai, T. (2010). Genetics of Endometrial Cancers. *Obstetrics and Gynecology International*, 2010, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2010/984013>
- Ortiz-Ruiz, M. J., Álvarez-Fernández, S., Parrott, T., Zaknoen, S., Burrows, F. J., Ocaña, A., Pandiella, A., & Esparís-Ogando, A. (2014). Therapeutic potential of ERK5 targeting in triple negative breast cancer. *Oncotarget*, 5(22), 11308–11318. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2324>
- Oza, A. M., Elit, L., Tsao, M. S., Kamel-Reid, S., Biagi, J., Provencher, D. M., Gotlieb, W. H., Hoskins, P. J., Ghatage, P., Tonkin, K. S., Mackay, H. J., Mazurka, J., Sederias, J., Ivy, P., Dancey, J. E., & Eisenhauer, E. A. (2011). Phase II study of temsirolimus in women with recurrent or metastatic endometrial cancer: A trial of the NCIC Clinical Trials Group. *Journal of Clinical Oncology*, 29(24), 3278–3285. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.34.1578>

P

- Pahl, H. L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene*, 18(49), 6853–6866. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203239>
- Pallares, J., Martínez-Guitarte, J. L., Dolcet, X., Llobet, D., Rue, M., Palacios, J., Prat, J., & Matias-Guiu, X. (2004). Abnormalities in the NF- κ B family and related proteins in endometrial carcinoma. *Journal of Pathology*, 204(5), 569–577. <https://doi.org/10.1002/path.1666>
- Papa, S., Zazzeroni, F., Pham, C. G., Bubici, C., & Franzoso, G. (2004). Linking JNK signaling to NF- κ B: A key to survival. *Journal of Cell Science*, 117(22), 5197–5208. <https://doi.org/10.1242/jcs.01483>

- París-Coderch, L., Soriano, A., Jiménez, C., Erazo, T., Muñoz-Guardiola, P., Masanas, M., Antonelli, R., Boloix, A., Alfón, J., Pérez-Montoyo, H., Yeste-Velasco, M., Domènech, C., Roma, J., Sánchez de Toledo, J., Moreno, L., Lizcano, J. M., Gallego, S., & Segura, M. F. (2020). The antitumour drug ABTL0812 impairs neuroblastoma growth through endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy and apoptosis. *Cell Death and Disease*, *11*(9), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02986-w>
- Park, J. R., Eggert, A., & Caron, H. (2008). Neuroblastoma: Biology, Prognosis, and Treatment. *Pediatric Clinics of North America*, *55*(1), 97–120. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2007.10.014>
- Park, S. J., Choi, Y. S., Lee, S., Lee, Y. J., Hong, S., Han, S., & Kim, B. C. (2016). BIX02189 inhibits TGF- β 1-induced lung cancer cell metastasis by directly targeting TGF- β type I receptor. *Cancer Letters*, *381*(2), 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.08.010>
- Parsons, J. T., Slack-Davis, J., Tilghman, R., & Roberts, W. G. (2008). Focal adhesion kinase: Targeting adhesion signaling pathways for therapeutic intervention. In *Clinical Cancer Research*, *14*(3), 627–632. Clin Cancer Res. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-2220>
- Parzych, K. R., & Klionsky, D. J. (2014). An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxidants & redox signaling*, *20*(3), 460–473. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5371>
- Pavan, S., Meyer-Schaller, N., Diepenbruck, M., Kalathur, R. K. R., Saxena, M., & Christofori, G. (2018). A kinome-wide high-content siRNA screen identifies MEK5–ERK5 signaling as critical for breast cancer cell EMT and metastasis. *Oncogene*, *37*(31), 4197–4213. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0270-8>
- Pearcey, R. G., & Petereit, D. G. (2000). Post-operative high dose rate brachytherapy in patients with low to intermediate risk endometrial cancer. *Radiotherapy and Oncology*, *56*(1), 17–22. [https://doi.org/10.1016/S0167-8140\(00\)00171-7](https://doi.org/10.1016/S0167-8140(00)00171-7)
- Pearson, G., Robinson, F., Gibson, T. B., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., & Cobb, M. H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews*, *22*(2), 153–183. <https://doi.org/10.1210/er.22.2.153>
- Pereira, D. M., Simões, A. E. S., Gomes, S. E., Castro, R. E., Carvalho, T., Rodrigues, C. M. P., & Borralho, P. M. (2016). MEK5/ERK5 signaling inhibition increases colon cancer cell sensitivity to 5-fluorouracil through a p53-dependent mechanism. *Oncotarget*, *7*(23), 34322–34340. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9107>
- Perez-Madrigal, D., Finegan, K. G., Paramo, B., & Tournier, C. (2012). The extracellular-regulated protein kinase 5 (ERK5) promotes cell proliferation through the down-regulation of inhibitors of cyclin dependent protein kinases (CDKs). *Cellular Signalling*, *24*(12), 2360–2368. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.08.001>
- Pi, X., Yan, C., & Berk, B. C. (2004). Big Mitogen-Activated Protein Kinase (BMK1)/ERK5 Protects Endothelial Cells from Apoptosis. *Circulation Research*, *94*(3), 362–369. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000112406.27800.6F>
- Picard, D. (2006). Chaperoning steroid hormone action. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *17*(6), 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2006.06.003>
- Pierce, J. W., Schoenleber, R., Jesmok, G., Best, J., Moore, S. A., Collins, T., & Gerritsen, M. E. (1997). Novel inhibitors of cytokine-induced I κ B α phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(34), 21096–21103. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.34.21096>
- Poulikakos, P. I., Zhang, C., Bollag, G., Shokat, K. M., & Rosen, N. (2010). RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature*, *464*(7287), 427–430. <https://doi.org/10.1038/nature08902>
- Putcha, G. V., Le, S., Frank, S., Besirli, C. G., Clark, K., Chu, B., Alix, S., Youle, R. J., LaMarche, A., Maroney, A. C., & Johnson, E. M. (2003). JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron*, *38*(6), 899–914. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00355-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00355-6)

R

- Ramsay, A. K., McCracken, S. R. C., Soofi, M., Fleming, J., Yu, A. X., Ahmad, I., Morland, R., MacHesky, L., Nixon, C., Edwards, D. R., Nuttall, R. K., Seywright, M., Marquez, R., Keller, E., & Leung, H. Y. (2011). ERK5 signalling in prostate cancer promotes an invasive phenotype. *British Journal of Cancer*, *104*(4), 664–672. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6606062>
- Randall, M. E., Filiaci, V. L., Muss, H., Spirtos, N. M., Mannel, R. S., Fowler, J., Thigpen, J. T., Benda, J. A., & Mackey, D. (2006). Randomized phase III trial of whole-abdominal irradiation versus doxorubicin and cisplatin chemotherapy in advanced endometrial carcinoma: A gynecologic oncology group study. *Journal of Clinical Oncology*, *24*(1), 36–44. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.00.7617>
- Ranganathan, A., Pearson, G. W., Chrestensen, C. A., Sturgill, T. W., & Cobb, M. H. (2006). The MAP kinase ERK5 binds to and phosphorylates p90 RSK. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *449*(1–2), 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2006.02.023>
- Razumovskaya, E., Sun, J., & Rönnstrand, L. (2011). Inhibition of MEK5 by BIX02188 induces apoptosis in cells expressing the oncogenic mutant FLT3-ITD. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *412*(2), 307–312. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.07.089>
- Regan, C. P., Li, W., Boucher, D. M., Spatz, S., Su, M. S., & Kuida, K. (2002). Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(14), 9248–9253. <https://doi.org/10.1073/pnas.142293999>
- Reyes, H. D., Thiel, K. W., Carlson, M. J., Meng, X., Yang, S., Stephan, J. M., & Leslie, K. K. (2014). Comprehensive profiling of EGFR/HER receptors for personalized treatment of gynecologic cancers. *Molecular Diagnosis and Therapy*, *18*(2), 137–151. <https://doi.org/10.1007/s40291-013-0070-3>
- Roberts, O. L., Holmes, K., Müller, J., Cross, D. A. E., & Cross, M. J. (2010). ERK5 is required for VEGF-mediated survival and tubular morphogenesis of primary human microvascular endothelial cells. *Journal of Cell Science*, *123*(19), 3413. <https://doi.org/10.1242/jcs.080663>
- Rocha, S., Campbell, K. J., & Perkins, N. D. (2003). p53- and Mdm2-independent repression of NF-κB transactivation by the ARF tumor suppressor. *Molecular Cell*, *12*(1), 15–25. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00223-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00223-5)
- Rohan, P. J., Davis, P., Moskaluk, C. A., Kearns, M., Krutzsch, H., Siebenlist, U., & Kelly, K. (1993). PAC-1: A mitogen-induced nuclear protein tyrosine phosphatase. *Science*, *259*(5102), 1763–1766. <https://doi.org/10.1126/science.7681221>
- Rovida, E., Di Maira, G., Tusa, I., Cannito, S., Paternostro, C., Navari, N., Vivoli, E., Deng, X., Gray, N. S., Esparís-Ogando, A., David, E., Pandiella, A., Sbarba, P., Dello, Parola, M., & Marra, F. (2015). The mitogen-activated protein kinase ERK5 regulates the development and growth of hepatocellular carcinoma. *Gut*, *64*(9), 1454–1465. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-306761>
- Rovida, E., Navari, N., Caligiuri, A., Dello Sbarba, P., & Marra, F. (2008). ERK5 differentially regulates PDGF-induced proliferation and migration of hepatic stellate cells. *Journal of Hepatology*, *48*(1), 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.08.010>

S

- Saeed, A. I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M., Sturn, A., Snuffin, M., Rezantsev, A., Popov, D., Ryltsov, A., Kostukovich, E., Borisovsky, I., Liu, Z., Vinsavich, A., ... Quackenbush, J. (2003). TM4: A Free, Open-Source System for Microarray Data Management and Analysis. *BioTechniques*, 34(2), 374–377.
- Sakamoto, K., Maeda, S., Hikiba, Y., Nakagawa, H., Hayakawa, Y., Shibata, W., Yanai, A., Ogura, K., & Omata, M. (2009). Constitutive NF- κ B activation in colorectal carcinoma plays a key role in angiogenesis, promoting tumor growth. *Clinical Cancer Research*, 15(6), 2248–2259. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1383>
- Samatar, A. A., & Poulidakos, P. I. (2014). Targeting RAS-ERK signalling in cancer: Promises and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(12), 928–942. <https://doi.org/10.1038/nrd4281>
- Sánchez-Fdez, A., Ortiz-Ruiz, M. J., Re-Louhau, M. F., Ramos, I., Blanco-Múñez, Ó., Ludeña, D., Abad, M., Sánchez-Martín, M., Pandiella, A., & Esparís-Ogando, A. (2019). MEK5 promotes lung adenocarcinoma. *The European Respiratory Journal*, 53(2), 8–11. <https://doi.org/10.1183/13993003.01327-2018>
- Sasaki, H., Nishii, H., Takahashi, H., Tada, A., Furusato, M., Terashima, Y., Slegai, G. P., Parker, S. L., Kohler, M. F., Berchuck, A., & Boyd, J. (1993). Mutation of the Ki-ras Protooncogene in Human Endometrial Hyperplasia and Carcinoma. *Cancer Research*, 53(8), 1906–1910.
- Saslow, D., Solomon, D., Lawson, H. W., Killackey, M., Kulasingam, S. L., Cain, J., Garcia, F. A. R., Moriarty, A. T., Waxman, A. G., Wilbur, D. C., Wentzensen, N., Downs, L. S., Spitzer, M., Moscicki, A.-B., Franco, E. L., Stoler, M. H., Schiffman, M., Castle, P. E., & Myers, E. R. (2012). American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 62(3), 147–172. <https://doi.org/10.3322/caac.21139>
- Sawhney, R. S., Liu, W., & Brattain, M. G. (2009). A novel role of ERK5 in integrin-mediated cell adhesion and motility in cancer cells via FAK signaling. *Journal of Cellular Physiology*, 219(1), 152–161. <https://doi.org/10.1002/jcp.21662>
- Schein, C. H. (2021). Repurposing approved drugs for cancer therapy. *British Medical Bulletin*, 2(2), 13–27. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldaa045>
- Schwab, M. (1985). Amplification of N-myc in human neuroblastomas. *Trends in Genetics*, 1(3), 271–275. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(85\)90103-9](https://doi.org/10.1016/0168-9525(85)90103-9)
- Sears, R. C. (2004). The life cycle of c-Myc: From synthesis to degradation. *Cell Cycle*, 3(9), 1131–1135. <https://doi.org/10.4161/cc.3.9.1145>
- Sekimizu, M., Osumi, T., Fukano, R., Koga, Y., Kada, A., Saito, A. M., & Mori, T. (2018). A Phase I/II Study of Crizotinib for Recurrent or Refractory Anaplastic Lymphoma Kinase-Positive Anaplastic Large Cell Lymphoma and a Phase I Study of Crizotinib for Recurrent or Refractory Neuroblastoma: Study Protocol for a Multicenter Single-arm Open-. *Acta Med. Okayama*, 72(4), 61–63. <https://doi.org/10.18926/AMO/56184>
- Seyfried, J., Wang, X., Kharebava, G., & Tournier, C. (2005). A Novel Mitogen-Activated Protein Kinase Docking Site in the N Terminus of MEK5 α Organizes the Components of the Extracellular Signal-Regulated Kinase 5 Signaling Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 25(22), 9820–9828. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.22.9820-9828.2005>
- Shao, Y., Akmentin, W., Toledo-Aral, J. J., Rosenbaum, J., Valdez, G., Cabot, J. B., Hilbush, B. S., & Halegoua, S. (2002). Pincher, a pinocytic chaperone for nerve growth factor/TrkA signaling endosomes. *Journal of Cell Biology*, 157(4), 679–691. <https://doi.org/10.1083/jcb.200201063>

- Sherman, M. E., Bur, M. E., & Kurman, R. J. (1995). p53 in endometrial cancer and its putative precursors: Evidence for diverse pathways of tumorigenesis. *Human Pathology*, 26(11), 1268–1274. [https://doi.org/10.1016/0046-8177\(95\)90204-X](https://doi.org/10.1016/0046-8177(95)90204-X)
- Shi, Y., Liu, J., Zhao, Y., Cao, J., Li, Y., & Guo, F. (2019). Bromodomain-Containing Protein 4: A Druggable Target. *Curr. Drug Target*, 20(15), 1517–1536. <https://doi.org/10.2174/1574885514666190618113519>.
- Shukla, A., Miller, J. M., Cason, C., Sayan, M., MacPherson, M. B., Beuschel, S. L., Hillegass, J., Vacek, P. M., Pass, H. I., & Mossman, B. T. (2013). Extracellular signal-regulated kinase 5: A potential therapeutic target for malignant mesotheliomas. *Clinical Cancer Research*, 19(8), 2071–2083. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3202>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21442>
- Simões, A., Pereira, D. M., Gomes, S. E., Brito, H., Carvalho, T., French, A., Castro, R. E., Steer, C. J., Thibodeau, S. N., Rodrigues, C. M. P., & Borralho, P. M. (2015). Aberrant MEK5/ERK5 signalling contributes to human colon cancer progression via NF-κB activation. *Cell Death and Disease*, 6(4), 1–15. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.83>
- Slomovitz, B. M., Lu, K. H., Johnston, T., Coleman, R. L., Munsell, M., Broaddus, R. R., Walker, C., Ramondetta, L. M., Burke, T. W., Gershenson, D. M., & Wolf, J. (2010). A phase 2 study of the oral mammalian target of rapamycin inhibitor, everolimus, in patients with recurrent endometrial carcinoma. *Cancer*, 116(23), 5415–5419. <https://doi.org/10.1002/cncr.25515>
- Smith, J. R., Clarke, P. A., De Billy, E., & Workman, P. (2009). Silencing the cochaperone CDC37 destabilizes kinase clients and sensitizes cancer cells to HSP90 inhibitors. *Oncogene*, 28(2), 157–169. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.380>
- Smith, V., & Foster, J. (2018). High-Risk Neuroblastoma Treatment Review. *Children*, 5(9), 114. <https://doi.org/10.3390/children5090114>
- Sohn, S. J., Sarvis, B. K., Cado, D., & Winoto, A. (2002). ERK5 MAPK regulates embryonic angiogenesis and acts as a hypoxia-sensitive repressor of vascular endothelial growth factor expression. *Journal of Biological Chemistry*, 277(45), 43344–43351. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207573200>
- Sole, C., Dolcet, X., Segura, M. F., Gutierrez, H., Diaz-Meco, M. T., Gozzelino, R., Sanchis, D., Bayascas, J. R., Gallego, C., Moscat, J., Davies, A. M., & Comella, J. X. (2004). The death receptor antagonist FAIM promotes neurite outgrowth by a mechanism that depends on ERK and NF-κB signaling. *Journal of Cell Biology*, 167(3), 479–492. <https://doi.org/10.1083/jcb.200403093>
- Song, C., Wang, L., Xu, Q., Wang, K., Xie, D., Yu, Z., Jiang, K., Liao, L., Yates, J. R., Lee, J. D., & Yang, Q. (2017). Targeting BMK1 Impairs the Drug Resistance to Combined Inhibition of BRAF and MEK1/2 in Melanoma. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep46244>
- Song, C., Xu, Q., Jiang, K., Zhou, G., Yu, X., Wang, L., Zhu, Y., Fang, L., Yu, Z., Lee, J. D., Yu, S. C., & Yang, Q. (2015). Inhibition of BMK1 pathway suppresses cancer stem cells through BNIP3 and BNIP3L. *Oncotarget*, 6(32), 33279–33289. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5337>
- Song, H., Jin, X., & Lin, J. (2004). Stat3 upregulates MEK5 expression in human breast cancer cells. *Oncogene*, 23(50), 8301–8309. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208026>
- Sorosky, J. I. (2008). Endometrial Cancer. *Obstetrics & Gynecology*, 111(2), 436–447. <https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e318162f690>
- Stecca, B., & Rovida, E. (2019). Impact of ERK5 on the hallmarks of cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms20061426>

- Stepanova, L., Yang, G., DeMayo, F., Wheeler, T. M., Finegold, M., Thompson, T. C., & Harper, J. W. (2000). Induction of human Cdc37 in prostate cancer correlates with the ability of targeted Cdc37 expression to promote prostatic hyperplasia. *Oncogene*, *19*(18), 2186–2193. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203561>
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., & Ebert, B. L. (2005). Gene set enrichment analysis : A knowledge-based approach for interpreting genome-wide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(43), 15545–15550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>
- Sun, W., Kesavan, K., Schaefer, B. C., Garrington, T. P., Ware, M., Johnson, N. L., Gelfand, E. W., & Johnson, G. L. (2001). MEKK2 Associates with the Adapter Protein Lad/RIBP and Regulates the MEK5-BMK1/ERK5 Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(7), 5093–5100. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003719200>
- Sun, Y., Liang, Y., Li, Z., & Xia, N. (2020). Liraglutide Promotes Osteoblastic Differentiation in MC3T3-E1 Cells by ERK5 Pathway. *International Journal of Endocrinology*, *2020*, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2020/8821077>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3):209-249 <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Sureban, S. M., May, R., Weygant, N., Qu, D., Chandrakesan, P., Bannerman-Menson, E., Ali, N., Pantazis, P., Westphalen, C. B., Wang, T. C., & Houchen, C. W. (2014). XMD8-92 inhibits pancreatic tumor xenograft growth via a DCLK1-dependent mechanism. *Cancer Letters*, *351*(1), 151–161. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.05.011>
- Suzaki, Y., Yoshizumi, M., Kagami, S., Hajime Koyama, A., Taketani, Y., Houchi, H., Tsuchiya, K., Takeda, E., & Tamaki, T. (2002). Hydrogen peroxide stimulates c-Src-mediated big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) and the MEF2C signaling pathway in PC12 cells. Potential role in cell survival following oxidative insults. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(11), 9614–9621. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111790200>

T

- Talhok, A., Hoang, L. N., McConechy, M. K., Nakonechny, Q., Leo, J., Cheng, A., Leung, S., Yang, W., Lum, A., Köbel, M., Lee, C. H., Soslow, R. A., Huntsman, D. G., Gilks, C. B., & McAlpine, J. N. (2016). Molecular classification of endometrial carcinoma on diagnostic specimens is highly concordant with final hysterectomy: Earlier prognostic information to guide treatment. *Gynecologic Oncology*, *143*(1), 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2016.07.090>
- Tanaka, M., Roberts, J. M., Seo, H. S., Souza, A., Paulk, J., Scott, T. G., Deangelo, S. L., Dhe-Paganon, S., & Bradner, J. E. (2016). Design and characterization of bivalent BET inhibitors. *Nature Chemical Biology*, *12*(12), 1089–1096. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2209>
- Tang, G., Minemoto, Y., Dibling, B., Purcell, N. H., Li, Z., Karin, M., & Lin, A. (2001). Inhibition of JNK activation through NF- κ B target genes. *Nature*, *414*(6861), 313–317. <https://doi.org/10.1038/35104568>
- Tanoue, T., Adachi, M., Moriguchi, T., & Nishida, E. (2000). A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nature Cell Biology*, *2*(2), 110–116. <https://doi.org/10.1038/35000065>
- Tanoue, T., Maeda, R., Adachi, M., & Nishida, E. (2001). Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. *EMBO Journal*, *20*(3), 466–479. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.3.466>
- Tashiro, H., Isacson, C., Levine, R., Kurman, R. J., Cho, K. R., & Hedrick, L. (1997). P53 Gene Mutations Are Common in Uterine Serous Carcinoma and Occur Early in Their Pathogenesis. *American Journal of Pathology*, *150*(1), 177–185.

- Tatake, R. J., O'Neill, M. M., Kennedy, C. A., Wayne, A. L., Jakes, S., Wu, D., Kugler, S. Z., Kashem, M. A., Kaplita, P., & Snow, R. J. (2008). Identification of pharmacological inhibitors of the MEK5/ERK5 pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *377*(1), 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.09.087>
- Terasawa, K., Okazaki, K., & Nishida, E. (2003). Regulation of c-Fos and Fra-1 by the MEK5-ERK5 pathway. *Genes Cells*, *8*(3), 263–273. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2003.00631.x>
- Thigpen, T., Brady, M. F., Homesley, H. D., Soper, J. T., & Bell, J. (2001). Tamoxifen in the treatment of advanced or recurrent endometrial carcinoma: A Gynecologic Oncology Group study. *Journal of Clinical Oncology*, *19*(2), 364–367. <https://doi.org/10.1200/JCO.2001.19.2.364>
- Thompson, D., Vo, K. T., London, W. B., Fischer, M., Ambros, P. F., Nakagawara, A., Brodeur, G. M., Matthay, K. K., & DuBois, S. G. (2016). Identification of patient subgroups with markedly disparate rates of MYCN amplification in neuroblastoma: A report from the International Neuroblastoma Risk Group project. *Cancer*, *122*(6), 935–945. <https://doi.org/10.1002/cncr.29848>
- Thompson, J. K., Shukla, A., Leggett, A. L., Munson, P. B., Miller, J. M., MacPherson, M. B., Beuschel, S. L., Pass, H. I., & Shukla, A. (2018). Extracellular signal regulated kinase 5 and inflammasome in progression of mesothelioma. *Oncotarget*, *9*(1), 293–305. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22968>
- Tiwari, A. K., Sodani, K., Dai, C.-L., R. Ashby, C., & Chen, Z.-S. (2011). Revisiting the ABCs of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *12*(4), 570–594. <https://doi.org/10.2174/138920111795164048>
- Tsoref, D., Welch, S., Lau, S., Biagi, J., Tonkin, K., Martin, L. A., Ellard, S., Ghatage, P., Elit, L., MacKay, H. J., Allo, G., Tsao, M. S., Kamel-Reid, S., Eisenhauer, E. A., & Oza, A. M. (2014). Phase II study of oral ridaforolimus in women with recurrent or metastatic endometrial cancer. *Gynecologic Oncology*, *135*(2), 184–189. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.06.033>
- Turjanski, A. G., Vaqué, J. P., & Gutkind, J. S. (2007). MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene*, *26*(22), 3240–3253. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210415>
- Tusa, I., Cheloni, G., Poteti, M., Gozzini, A., DeSouza, N. H., Shan, Y., Deng, X., Gray, N. S., Li, S., Roviada, E., & Sbarba, P. Dello. (2018). Targeting the Extracellular Signal-Regulated Kinase 5 Pathway to Suppress Human Chronic Myeloid Leukemia Stem Cells. *Stem Cell Reports*, *7*(1), 55–68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.06.006>
- Tusa, I., Gagliardi, S., Tubita, A., Pandolfi, S., Urso, C., Borgognoni, L., Wang, J., Deng, X., Gray, N. S., Stecca, B., & Roviada, E. (2018). ERK5 is activated by oncogenic BRAF and promotes melanoma growth. *Oncogene*, *37*(19), 2601–2614. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0164-9>

U

- Umopathy, G., Wakil, A. El, Witek, B., Chesler, L., Danielson, L., Deng, X., Gray, N. S., Johansson, M., Kvarnbrink, S., Ruuth, K., Schönherr, C., Palmer, R. H., & Hallberg, B. (2014). The kinase ALK stimulates the kinase ERK5 to promote the expression of the oncogene MYCN in neuroblastoma. *Science Signaling*, *7*(349), 1–11. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005470>

V

- Vaseva, A. V., Blake, D. R., Gilbert, T. S. K., Ng, S., Hostetter, G., Azam, S. H., Ozkan-Dagliyan, I., Gautam, P., Bryant, K. L., Pearce, K. H., Herring, L. E., Han, H., Graves, L. M., Witkiewicz, A. K., Knudsen, E. S., Pecot, C. V., Rashid, N., Houghton, P. J., Wennerberg, K., Der, C. J. (2018). KRAS Suppression-Induced Degradation of MYC Is Antagonized by a MEK5-ERK5 Compensatory Mechanism. *Cancer Cell*, *34*(5), 807–822. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.10.001>
- Vaughn, C. P., ZoBell, S. D., Furtado, L. V., Baker, C. L., & Samowitz, W. S. (2011). Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS Mutations in Colorectal Cancer. *Genes, chromosomes & cancer*, *50*(5), 307–312. <https://doi.org/10.1002/gcc>
- Villella, J. A., Cohen, S., Smith, D. H., Hibshoosh, H., & Hershman, D. (2006). HER-2/neu overexpression in uterine papillary serous cancers and its possible therapeutic implications. *International Journal of Gynecological Cancer*, *16*(5), 1897–1902. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1438.2006.00664.x>

W

- Wake, M. S., & Watson, C. J. (2015). STAT3 the oncogene - Still eluding therapy? *FEBS Journal*, *282*(14), 2600–2611. <https://doi.org/10.1111/febs.13285>
- Wang, F., Li, D., Zheng, Z., Kin Wah To, K., Chen, Z., Zhong, M., Su, X., Chen, L., & Fu, L. (2020). Reversal of ABCB1-related multidrug resistance by ERK5-IN-1. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, *39*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-1537-9>
- Wang, J., Erazo, T., Ferguson, F. M., Buckley, D. L., Gomez, N., Muñoz-Guardiola, P., Diéguez-Martínez, N., Deng, X., Hao, M., Masefski, W., Fedorov, O., Offei-Addo, N. K., Park, P. M., Dai, L., Dibona, A., Becht, K., Kim, N. D., McKeown, M. R., Roberts, J. M., ... Gray, N. S. (2018). Structural and Atropisomeric Factors Governing the Selectivity of Pyrimido-benzodiazipinones as Inhibitors of Kinases and Bromodomains. *ACS Chemical Biology*, *13*(9), 2438–2448. <https://doi.org/10.1021/acschembio.7b00638>
- Wang, X., Finegan, K. G., Robinson, A. C., Knowles, L., Khosravi-Far, R., Hinchliffe, K. A., Boot-Handford, R. P., & Tournier, C. (2006). Activation of extracellular signal-regulated protein kinase 5 downregulates FasL upon osmotic stress. *Cell Death and Differentiation*, *13*(12), 2099–2108. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401969>
- Wang, Xin, Merritt, A. J., Seyfried, J., Guo, C., Papadakis, E. S., Finegan, K. G., Kayahara, M., Dixon, J., Boot-Handford, R. P., Cartwright, E. J., Mayer, U., & Tournier, C. (2005). Targeted Deletion of mek5 Causes Early Embryonic Death and Defects in the Extracellular Signal-Regulated Kinase 5/Myocyte Enhancer Factor 2 Cell Survival Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(1), 336–345. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.1.336-345.2005>
- Wang, X., & Tournier, C. (2006). Regulation of cellular functions by the ERK5 signalling pathway. *Cellular Signalling*, *18*(6), 753–760. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.11.003>
- Wang, X., Pesakhov, S., Harrison, J. S., Danilenko, M., & Studzinski, G. P. (2014). ERK5 pathway regulates transcription factors important for monocytic differentiation of human myeloid leukemia cells. *Journal of Cellular Physiology*, *229*(7), 856–867. <https://doi.org/10.1002/jcp.24513>
- Wang, X., Pesakhov, S., Weng, A., Kafka, M., Gocek, E., Nguyen, M., Harrison, J. S., Danilenko, M., & Studzinski, G. P. (2013). ERK5/MAPK pathway has a major role in 1,25-(OH)₂ vitamin D₃-induced terminal differentiation of myeloid leukemia cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. *144*, 223–227. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.10.002>

- Wang, Y., Gao, C., Zhang, Y., Gao, J., Teng, F., Tian, W., Yang, W., Yan, Y., & Xue, F. (2016). Visfatin stimulates endometrial cancer cell proliferation via activation of PI3K/Akt and MAPK/ERK1/2 signalling pathways. *Gynecologic Oncology*, *143*(1), 168–178. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2016.07.109>
- Watson, F. L., Heerssen, H. M., Bhattacharyya, A., Klesse, L., Lin, M. Z., & Segal, R. A. (2001). Neurotrophins use the Erk5 pathway to mediate a retrograde survival response. *Nature Neuroscience*, *4*(10), 981–988. <https://doi.org/10.1038/nn720>
- Westin, S. N., Sill, M. W., Coleman, R. L., Waggoner, S., Moore, K. N., Mathews, C. A., Martin, L. P., Modesitt, S. C., Lee, S., Ju, Z., Mills, G. B., Schilder, R. J., Fracasso, P. M., Birrer, M. J., & Aghajanian, C. (2019). Safety lead-in of the MEK inhibitor trametinib in combination with GSK2141795, an AKT inhibitor, in patients with recurrent endometrial cancer: An NRG Oncology/GOG study. *Gynecologic Oncology*, *155*(3), 420–428. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2019.09.024>
- Weston, C. R., Lambright, D. G., & Davis, R. J. (2002). MAP Kinase Signaling Specificity. *Science*, *296*(5577), 2345–2347. <https://doi.org/10.1126/science.1073344>
- Westphal, D., Dewson, G., Czabotar, P. E., Kluck, R. M. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta*, *1813*(4):521–531. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.12.019>.
- Whitmarsh, A. J., & Davis, R. J. (1998). Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends in Biochemical Sciences*, *23*(12), 481–485. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01309-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01309-7)
- Williams, C. A. C., Fernandez-Alonso, R., Wang, J., Toth, R., Gray, N. S., & Findlay, G. M. (2016). Erk5 Is a Key Regulator of Naive-Primed Transition and Embryonic Stem Cell Identity. *Cell Reports*, *16*(7), 1820–1828. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.033>
- Wisdom, R., Johnson, R. S., & Moore, C. (1999). c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *EMBO Journal*, *18*(1), 188–197. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.1.188>
- Wright, T. D., Raybuck, C., Bhatt, A., Monlish, D., Chakrabarty, S., Wendekier, K., Gartland, N., Gupta, M., Burow, M. E., Flaherty, P. T., & Cavanaugh, J. E. (2020). Pharmacological inhibition of the MEK5/ERK5 and PI3K/Akt signaling pathways synergistically reduces viability in triple-negative breast cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, *121*(2), 1156–1168. <https://doi.org/10.1002/jcb.29350>

X

- Xia, C., Yang, Y., Kong, F., Kong, Q., & Shan, C. (2018). MiR-143-3p inhibits the proliferation, cell migration and invasion of human breast cancer cells by modulating the expression of MAPK7. *Biochimie*, *147*, 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.01.003>
- Xiong, Y., Zhang, L., & Wang, T. (2016). Phosphorylation of BMK1 induces prostatic carcinoma cell proliferation by promoting entry into the S phase of the cell cycle. *Oncology Letters*, *11*(1), 99–104. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3909>
- Xu, Y., Cao, C., Gong, X., & Rong, L. J. (2015). Inhibition of ERK5 enhances cytarabine-induced apoptosis in acute myeloid leukemia cells. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, *8*(4), 6446–6455.

Y

- Yan, C., Luo, H., Lee, J. D., Abe, J. ichi, & Berk, B. C. (2001). Molecular Cloning of Mouse ERK5/BMK1 Splice Variants and Characterization of ERK5 Functional Domains. *Journal of Biological Chemistry*, 276(14), 10870–10878. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009286200>
- Yan, D., Yan, X., Dai, X., Chen, L., Sun, L., Li, T. A. O., He, F., Lian, J., & Cai, W. (2019). *Activation of AKT/AP1/FoxM1 signaling confers sorafenib resistance to liver cancer cells*. 42(2), 785–796. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7192>
- Yan, L., Carr, J., Ashby, P. R., Murry-tait, V., Thompson, C., & Arthur, J. S. C. (2003). Knockout of ERK5 causes multiple defects in placental and embryonic development. *BMC Developmental Biology*, 21(3), 1–21.
- Yang, J., Boerm, M., McCarty, M., Bucana, C., Fidler, I. J., Zhuang, Y., & Su, B. (2000). Mekk3 is essential for early embryonic cardiovascular development. *Nature Genetics*, 24(3), 309–313. <https://doi.org/10.1038/73550>
- Yang, Q., Liao, L., Deng, X., Chen, R., Gray, N. S., Yates, J. R., & Lee, J. D. (2013). BMK1 is involved in the regulation of p53 through disrupting the PML-MDM2 interaction. *Oncogene*, 32(26), 3156–3164. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.332>
- Yang, Q., Deng, X., Lu, B., Cameron, M., Fearn, C., Patricelli, M. P., Iij, J. R. Y., Gray, N. S., & Lee, J. (2010). Pharmacological Inhibition of BMK1 Suppresses Tumor Growth Through PML. *Cancer Cell*, 18(3), 258–267. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.08.008>. Pharmacological
- Yang, S., Thiel, K. W., & Leslie, K. K. (2011). Progesterone: The ultimate endometrial tumor suppressor. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 22(4), 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2011.01.005>
- Yasuda, J., Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Sharma, M., & Davis, R. J. (1999). The JIP Group of Mitogen-Activated Protein Kinase Scaffold Proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 19(10), 7245–7254. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.10.7245>
- Yemelyanova, A., Ji, H., Shih, I. M., Wang, T. L., Wu, L. S. F., & Ronnett, B. M. (2009). Utility of p16 expression for distinction of uterine serous carcinomas from endometrial endometrioid and endocervical adenocarcinomas: Immunohistochemical analysis of 201 cases. *American Journal of Surgical Pathology*, 33(10), 1504–1514. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3181ac35f5>
- Yin, M. B., Guo, B., Panadero, A., Frank, C., Wrzosek, C., Slocum, H. K., & Rustum, Y. M. (1999). Cyclin E-Cdk2 activation is associated with cell cycle arrest and inhibition of DNA replication induced by the thymidylate synthase inhibitor tomudex. *Experimental Cell Research*, 247(1), 189–199.
- Yin, Y., Kizer, N. T., Thaker, P. H., Chiappinelli, K. B., Trinkaus, K. M., Goodfellow, P. J., & Ma, L. (2013). Glycogen synthase kinase 3 β inhibition as a therapeutic approach in the treatment of endometrial cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(8), 16617–16637. <https://doi.org/10.3390/ijms140816617>
- Yoon, M. S., Huh, S. J., Kim, H. J., Kim, Y. S., Kim, Y. B., Kim, J. Y., Lee, J. H., Kim, H. J., Cha, J., Kim, J. H., Kim, J., Yoon, W. S., Choi, J. H., Chun, M., Choi, Y., Lee, K. K., Kim, M., Jeong, J. U., Chang, S. K., & Park, W. (2016). Adjuvant treatment after surgery in stage IIIA endometrial adenocarcinoma. *Cancer Research and Treatment*, 48(3), 1074–1083. <https://doi.org/10.4143/crt.2015.356>
- Yu, A., Gilman, A., Ozkaynak, M. F., London, W. B., Kreissman, S. G., Chen, H. X., Smith, M., Anderson, B., Villablanca, J. G., Matthay, K., Shimada, H., Grupp, S. A., Seeger, R., Reynolds, C. P., Buxton, A., Reisfeld, R. A., Gillies, S. D., Cohn, S. L., Maris, J. M., & Sondel, P. M. (2010). Anti-GD2 Antibody with GM-CSF, Interleukin-2, and Isotretinoin for Neuroblastoma. *The New England Journal of Medicine*, 363(14), 1324–1334. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0911123>
- Yue, B., Ren, Q. X., Su, T., Wang, L. N., & Zhang, L. (2014). ERK5 silencing inhibits invasion of human osteosarcoma cell via modulating the Slug/MMP-9 pathway. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 18(18), 2640–2647. <https://doi.org/10.4172/2161-0681.1000182>

Z

- Zamani, A., Fan, H., & Luo, G. (2017). Identification of cellular genes and pathways important for tumorigenicity of hepatocellular carcinoma cell lines by proteomic profiling. *Oncotarget*, *8*(56), 96171–96183. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21821>.
- Zen, K., Yasui, K., Nakajima, T., Zen, Y., Zen, K., Gen, Y., & Mitsuyoshi, H. (2009). ERK5 is a Target for Gene Amplification at 17p11 and Promotes Cell Growth in Hepatocellular Carcinoma by Regulating Mitotic Entry. *Genes, chromosomes & cancer*, *48*(2), 109–120. <https://doi.org/10.1002/gcc>
- Zhai, L., Ma, C., Li, W., Yang, S., & Liu, Z. (2016). miR-143 suppresses epithelial–mesenchymal transition and inhibits tumor growth of breast cancer through down-regulation of ERK5. *Molecular Carcinogenesis*, *55*(12), 1990–2000. <https://doi.org/10.1002/mc.22445>
- Zhang, Z., Yi, P., Tu, C., Zhan, J., Jiang, L., & Zhang, F. (2019). Curcumin Inhibits ERK/c-Jun Expressions and Phosphorylation against Endometrial Carcinoma. *BioMed Research International*, *2019*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1155/2019/8912961>
- Zhou, C., Nitschke, A. M., Xiong, W., Zhang, Q., Tang, Y., Bloch, M., Elliott, S., Zhu, Y., Bazzone, L., Yu, D., Weldon, C. B., Schiff, R., McLachlan, J. A., Beckman, B. S., Wiese, T. E., Nephew, K. P., Shan, B., Burow, M. E., & Wang, G. (2008). Proteomic analysis of tumor necrosis factor- α resistant human breast cancer cells reveals a MEK5/Erk5-mediated epithelial-mesenchymal transition phenotype. *Breast Cancer Research*, *10*(6), 1–14. <https://doi.org/10.1186/bcr2210>
- Zhou, G., Bao, Z. Q., & Dixon, J. E. (1995). Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(21), 12665–12669. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.21.12665>
- Zhuang, K., Zhang, J., Xiong, M., Wang, X., Luo, X., Han, L., Meng, Y., Zhang, Y., Liao, W., & Liu, S. (2016). CDK5 functions as a tumor promoter in human colorectal cancer via modulating the ERK5–AP-1 axis. *Cell Death and Disease*, *7*(10), <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.333>
- Zimprich, A., Biskup, S., Leitner, P., Lichtner, P., Farrer, M., Lincoln, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Uitti, R. J., Calne, D. B., Stoessl, A. J., Pfeiffer, R. F., Patenge, N., Carbajal, I. C., Vieregge, P., Asmus, F., Mu, B., Dickson, D. W., Meitinger, T., Gasser, T. (2004). Mutations in LRRK2 Cause Autosomal-Dominant Parkinsonism with Pleomorphic Pathology. *Neuron*, *44*(4), 601–607. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.11.005>

ANEXOS

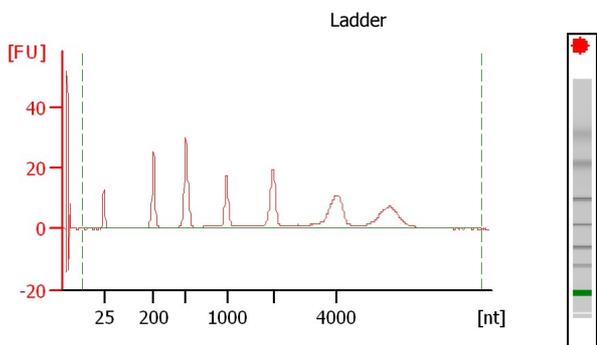
UAT	Muestra		
Código	Replicado	Constructo	Línea celular
UAT-2018-F-0251	1	shNSC	SK-N-BE(2)
UAT-2018-F-0252	2		
UAT-2018-F-0253	3		
UAT-2018-F-0254	1	shERK5 #1	
UAT-2018-F-0255	2		
UAT-2018-F-0256	3		
UAT-2018-F-0257	1	shERK5 #2	
UAT-2018-F-0258	2		
UAT-2018-F-0259	3		
UAT-2018-F-0260	1	shNSC	CHLA-90
UAT-2018-F-0261	2		
UAT-2018-F-0262	3		
UAT-2018-F-0263	1	shERK5 #1	
UAT-2018-F-0264	2		
UAT-2018-F-0265	3		
UAT-2018-F-0266	1	shERK5 #2	
UAT-2018-F-0267	2		
UAT-2018-F-0268	3		

Anexo 1: Código de las muestras empleadas en el análisis de microarray de células quimiorresistentes SK-N-BE(2) y CHLA-90 silenciadas con dos shRNAs distintos contra ERK5.

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
 Data Path: D:\...8-1622 CQ1_Eukaryote Total RNA Nano_2018-04-11_15-08-55.xad

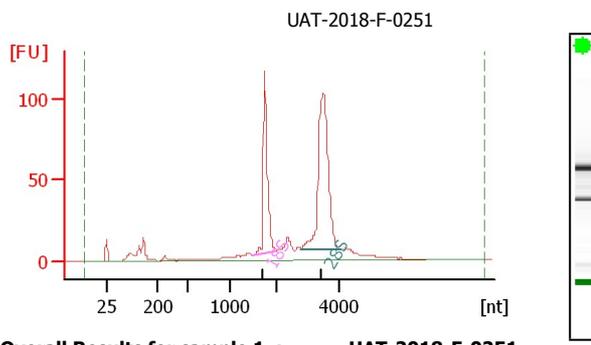
Created: 4/11/2018 3:08:55 PM
 Modified: 4/11/2018 3:36:09 PM

Electropherogram Summary



Overall Results for Ladder

RNA Area: 275.1
 RNA Concentration: 150 ng/ul
 Result Flagging Color: ████████
 Result Flagging Label: Bad RNA quality.

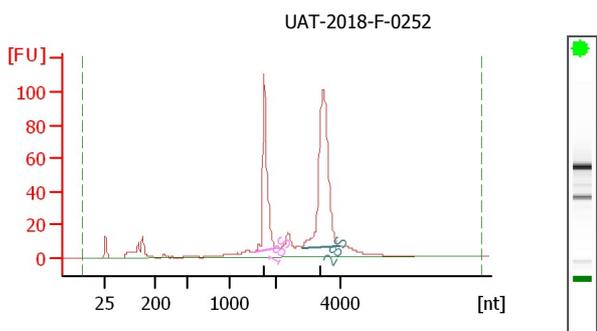


Overall Results for sample 1 : UAT-2018-F-0251

RNA Area: 724.8
 RNA Concentration: 395 ng/ul
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.8
 RNA Integrity Number (RIN): 9.6 (B.02.08)
 Result Flagging Color: ████████
 Result Flagging Label: Good RNA quality.

Fragment table for sample 1 : UAT-2018-F-0251

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,492	1,974	156.1	21.5
28S	2,793	4,034	273.7	37.8

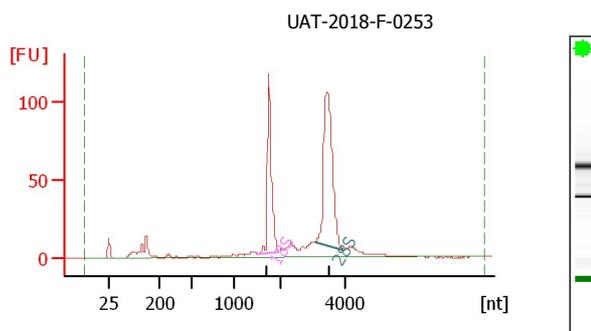


Overall Results for sample 2 : UAT-2018-F-0252

RNA Area: 690.9
 RNA Concentration: 377 ng/ul
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.7
 RNA Integrity Number (RIN): 9.6 (B.02.08)
 Result Flagging Color: ████████
 Result Flagging Label: Good RNA quality.

Fragment table for sample 2 : UAT-2018-F-0252

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,506	1,976	150.5	21.8
28S	2,790	3,985	257.0	37.2



Overall Results for sample 3 : UAT-2018-F-0253

RNA Area: 667.2
 RNA Concentration: 364 ng/ul
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.7
 RNA Integrity Number (RIN): 9.7 (B.02.08)
 Result Flagging Color: ████████
 Result Flagging Label: Good RNA quality.

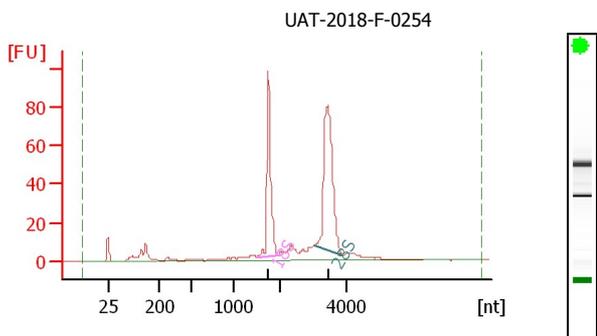
Fragment table for sample 3 : UAT-2018-F-0253

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,485	1,960	150.0	22.5
28S	3,040	3,923	250.5	37.5

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
 Data Path: D:\...8-1622 CQ1_Eukaryote Total RNA Nano_2018-04-11_15-08-55.xad

Created: 4/11/2018 3:08:55 PM
 Modified: 4/11/2018 3:36:09 PM

Electropherogram Summary Continued ...

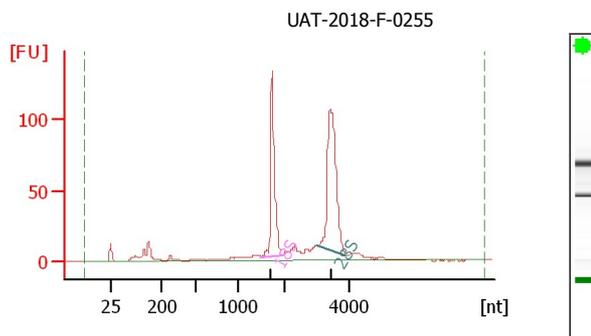


Overall Results for sample 4 : UAT-2018-F-0254

RNA Area: 486.8
 RNA Concentration: 265 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.6
 RNA Integrity Number (RIN): 9.7 (B.02.08)
 Result Flagging Color: ████████
 Result Flagging Label: Good RNA quality.

Fragment table for sample 4 : UAT-2018-F-0254

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,490	1,953	119.0	24.5
28S	3,060	3,926	190.0	39.0

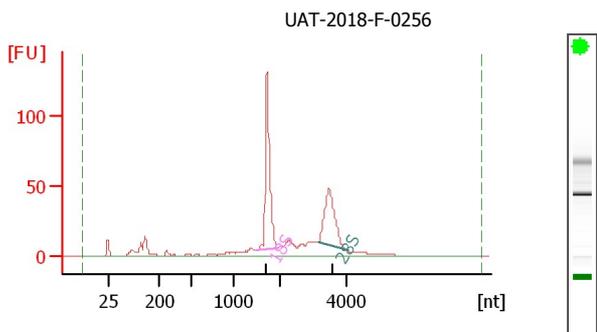


Overall Results for sample 5 : UAT-2018-F-0255

RNA Area: 678.2
 RNA Concentration: 370 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.5
 RNA Integrity Number (RIN): 9.6 (B.02.08)
 Result Flagging Color: ████████
 Result Flagging Label: Good RNA quality.

Fragment table for sample 5 : UAT-2018-F-0255

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,476	1,946	166.7	24.6
28S	2,982	3,869	251.9	37.1

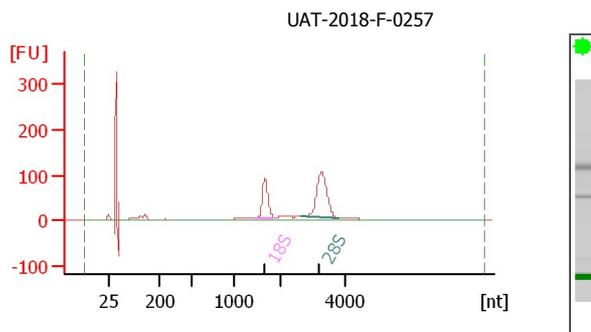


Overall Results for sample 6 : UAT-2018-F-0256

RNA Area: 608.8
 RNA Concentration: 332 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 0.7
 RNA Integrity Number (RIN): 9.2 (B.02.08, Anomaly Threshold(s) manually adapted)
 Result Flagging Color: ████████
 Result Flagging Label: Good RNA quality.

Fragment table for sample 6 : UAT-2018-F-0256

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,481	1,927	181.2	29.8
28S	3,136	4,063	118.7	19.5



Overall Results for sample 7 : UAT-2018-F-0257

RNA Area: 973.3
 RNA Concentration: 531 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.8
 RNA Integrity Number (RIN): 8.9 (B.02.08)
 Result Flagging Color: ████████
 Result Flagging Label: Good RNA quality.

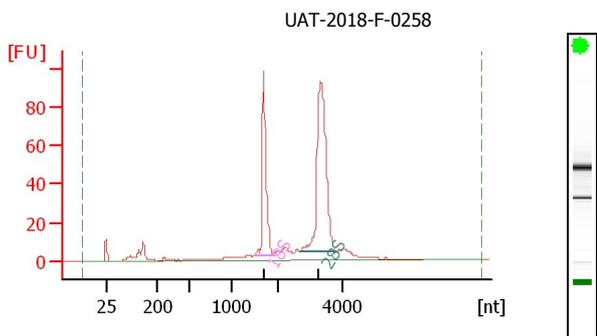
Fragment table for sample 7 : UAT-2018-F-0257

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,425	1,856	166.0	17.1
28S	2,623	3,797	293.6	30.2

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
 Data Path: D:\...8-1622 CQ1_Eukaryote Total RNA Nano_2018-04-11_15-08-55.xad

Created: 4/11/2018 3:08:55 PM
 Modified: 4/11/2018 3:36:09 PM

Electropherogram Summary Continued ...

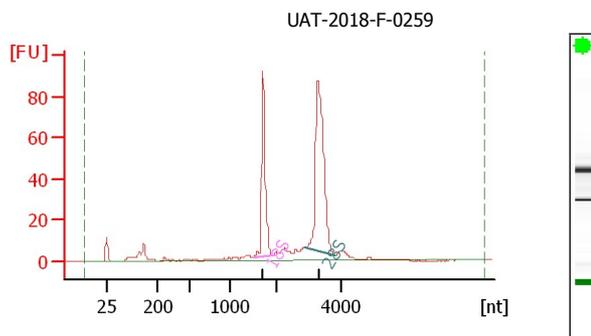


Overall Results for sample 8 : UAT-2018-F-0258

RNA Area: 531.8
 RNA Concentration: 290 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.8
 RNA Integrity Number (RIN): 9.8 (B.02.08)
 Result Flagging Color: ████████
 Result Flagging Label: Good RNA quality.

Fragment table for sample 8 : UAT-2018-F-0258

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,509	1,907	123.6	23.2
28S	2,700	3,851	226.9	42.7

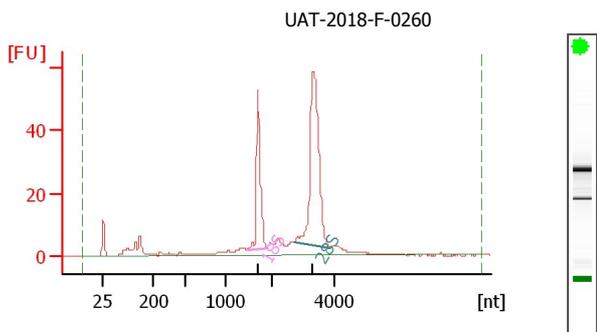


Overall Results for sample 9 : UAT-2018-F-0259

RNA Area: 454.1
 RNA Concentration: 248 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.8
 RNA Integrity Number (RIN): 9.8 (B.02.08)
 Result Flagging Color: ████████
 Result Flagging Label: Good RNA quality.

Fragment table for sample 9 : UAT-2018-F-0259

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,485	1,896	109.6	24.1
28S	2,856	3,788	196.6	43.3

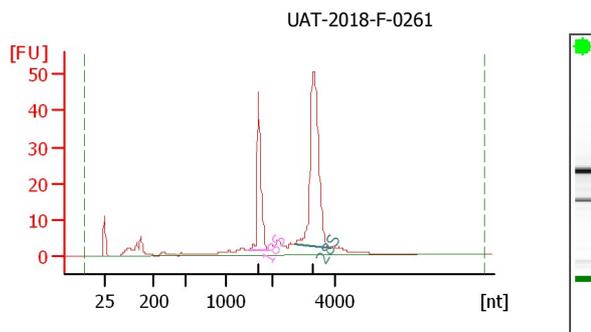


Overall Results for sample 10 : UAT-2018-F-0260

RNA Area: 353.6
 RNA Concentration: 193 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 2.2
 RNA Integrity Number (RIN): 9.7 (B.02.08)
 Result Flagging Color: ████████
 Result Flagging Label: Good RNA quality.

Fragment table for sample 10 : UAT-2018-F-0260

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,445	1,893	66.8	18.9
28S	2,693	3,810	144.0	40.7



Overall Results for sample 11 : UAT-2018-F-0261

RNA Area: 293.6
 RNA Concentration: 160 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 2.2
 RNA Integrity Number (RIN): 9.8 (B.02.08)
 Result Flagging Color: ████████
 Result Flagging Label: Good RNA quality.

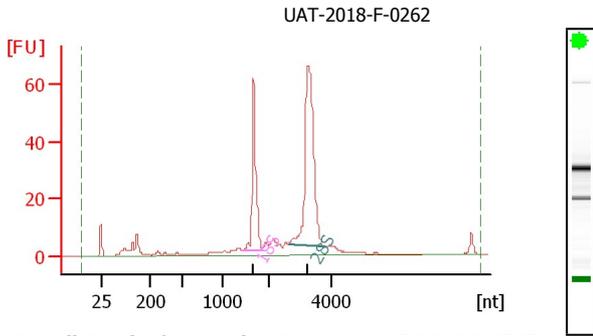
Fragment table for sample 11 : UAT-2018-F-0261

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,457	1,891	56.1	19.1
28S	2,695	3,846	122.0	41.6

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
 Data Path: D:\...8-1622 CQ1_Eukaryote Total RNA Nano_2018-04-11_15-08-55.xad

Created: 4/11/2018 3:08:55 PM
 Modified: 4/11/2018 3:36:09 PM

Electropherogram Summary Continued ...



Overall Results for sample 12 : UAT-2018-F-0262

RNA Area: 401.7
 RNA Concentration: 219 ng/μl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 2.1
 RNA Integrity Number (RIN): 9.7 (B.02.08)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: Good RNA quality.

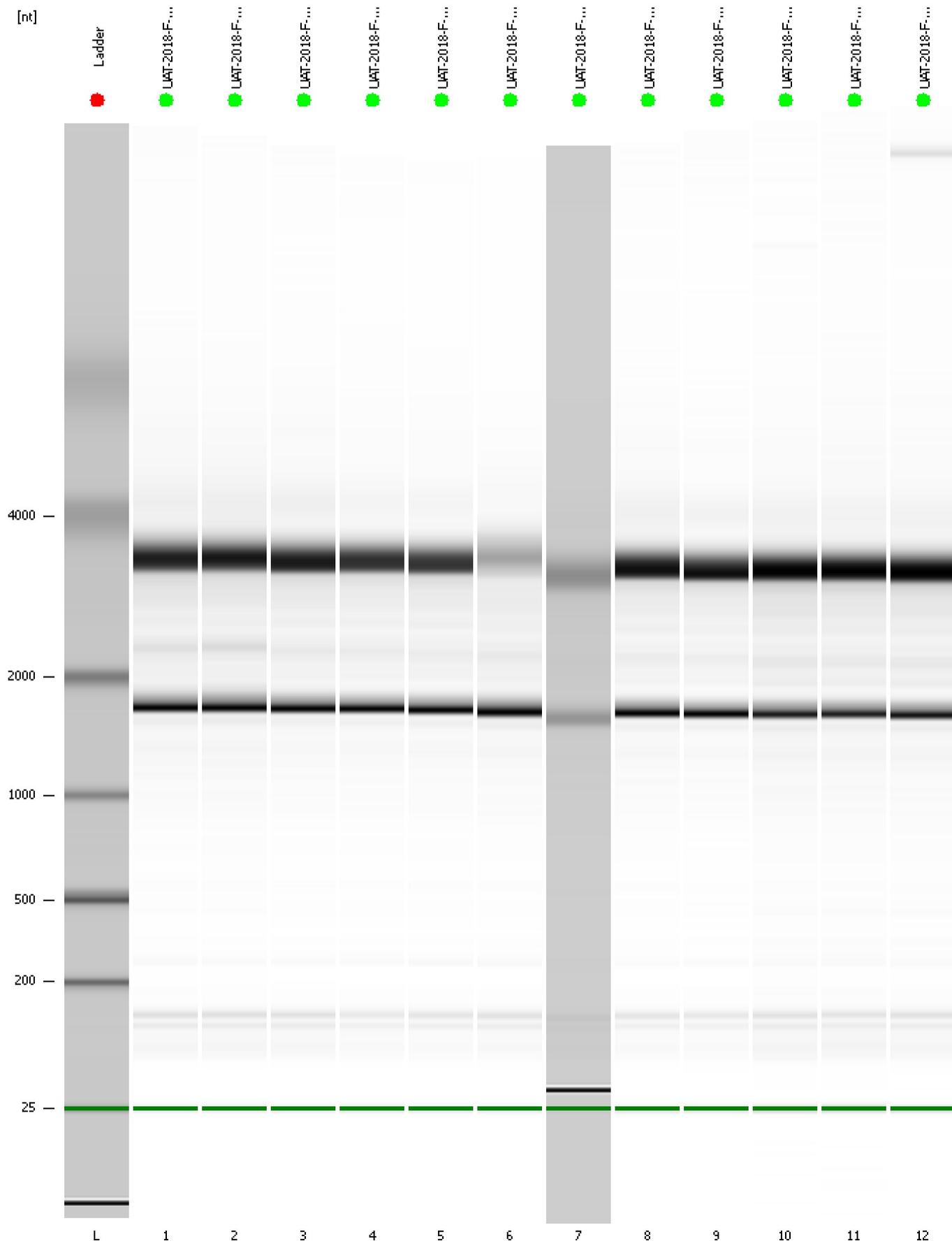
Fragment table for sample 12 : UAT-2018-F-0262

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,438	1,881	77.0	19.2
28S	2,657	3,811	164.0	40.8

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
Data Path: D:\...8-1622 CQ1_Eukaryote Total RNA Nano_2018-04-11_15-08-55.xad

Created: 4/11/2018 3:08:55 PM
Modified: 4/11/2018 3:36:09 PM

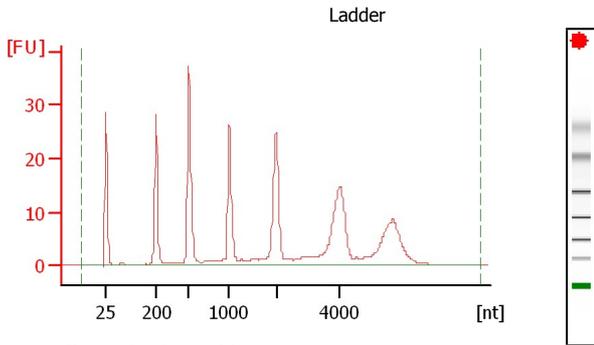
Gel Image



Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
 Data Path: D:\...8-1622 CQ2_Eukaryote Total RNA Nano_2018-04-11_16-11-12.xad

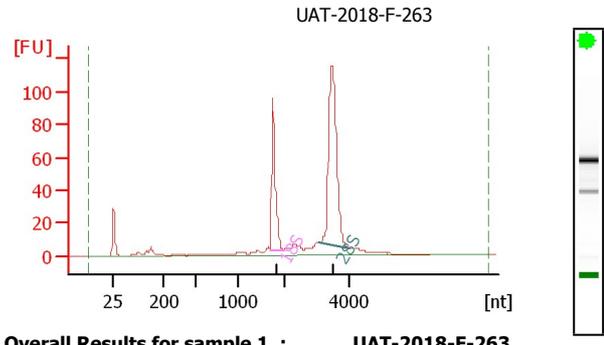
Created: 4/11/2018 4:11:12 PM
 Modified: 4/11/2018 4:34:27 PM

Electropherogram Summary



Overall Results for Ladder

RNA Area: 316.9
 RNA Concentration: 150 ng/ul
 Result Flagging Color: ████████
 Result Flagging Label: Bad RNA quality.

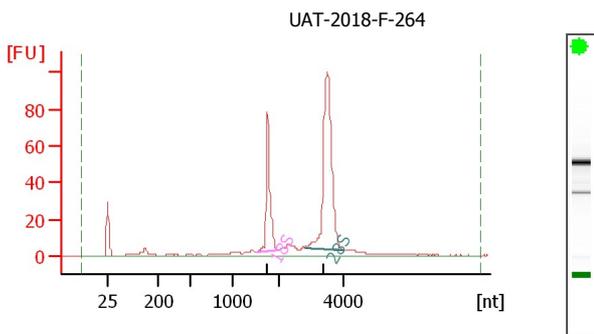


Overall Results for sample 1 : UAT-2018-F-263

RNA Area: 561.4
 RNA Concentration: 266 ng/ul
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 2.3
 RNA Integrity Number (RIN): 10 (B.02.08)
 Result Flagging Color: ████████
 Result Flagging Label: Good RNA quality.

Fragment table for sample 1 : UAT-2018-F-263

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,688	1,983	109.3	19.5
28S	3,106	4,009	251.7	44.8

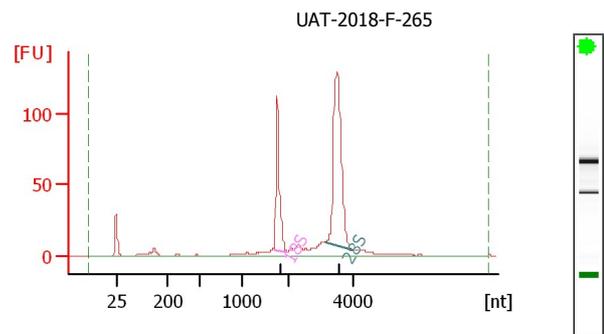


Overall Results for sample 2 : UAT-2018-F-264

RNA Area: 471.4
 RNA Concentration: 223 ng/ul
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 2.5
 RNA Integrity Number (RIN): 10 (B.02.08)
 Result Flagging Color: ████████
 Result Flagging Label: Good RNA quality.

Fragment table for sample 2 : UAT-2018-F-264

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,511	1,985	92.8	19.7
28S	2,811	4,011	230.4	48.9



Overall Results for sample 3 : UAT-2018-F-265

RNA Area: 589.1
 RNA Concentration: 279 ng/ul
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 2.3
 RNA Integrity Number (RIN): 10 (B.02.08)
 Result Flagging Color: ████████
 Result Flagging Label: Good RNA quality.

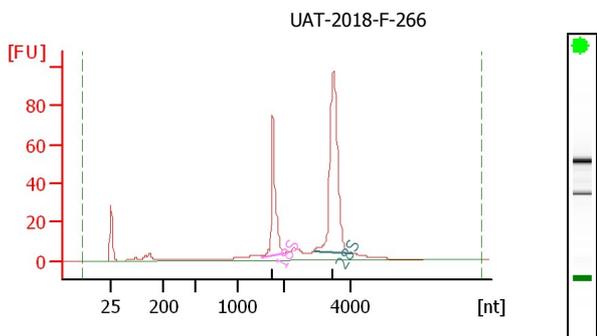
Fragment table for sample 3 : UAT-2018-F-265

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,687	1,961	120.2	20.4
28S	3,097	3,975	279.4	47.4

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
 Data Path: D:\...8-1622 CQ2_Eukaryote Total RNA Nano_2018-04-11_16-11-12.xad

Created: 4/11/2018 4:11:12 PM
 Modified: 4/11/2018 4:34:27 PM

Electropherogram Summary Continued ...

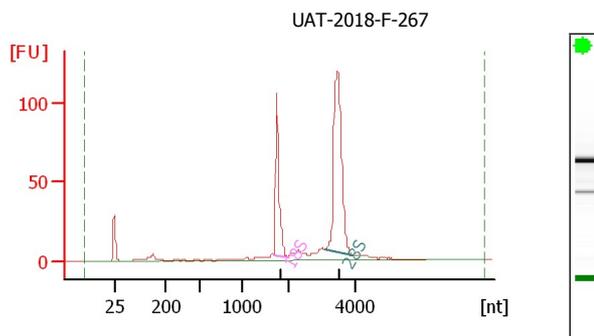


Overall Results for sample 4 : UAT-2018-F-266

RNA Area: 462.9
 RNA Concentration: 219 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 2.3
 RNA Integrity Number (RIN): 10 (B.02.08)
 Result Flagging Color: ████████
 Result Flagging Label: Good RNA quality.

Fragment table for sample 4 : UAT-2018-F-266

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,512	1,997	91.9	19.9
28S	2,881	4,078	215.5	46.6

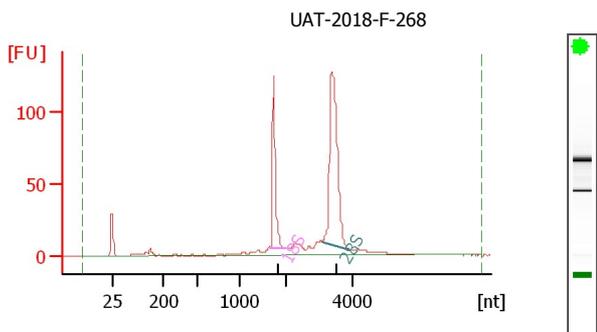


Overall Results for sample 5 : UAT-2018-F-267

RNA Area: 524.6
 RNA Concentration: 248 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 2.3
 RNA Integrity Number (RIN): 10 (B.02.08)
 Result Flagging Color: ████████
 Result Flagging Label: Good RNA quality.

Fragment table for sample 5 : UAT-2018-F-267

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,685	1,973	110.7	21.1
28S	3,102	3,971	256.3	48.9

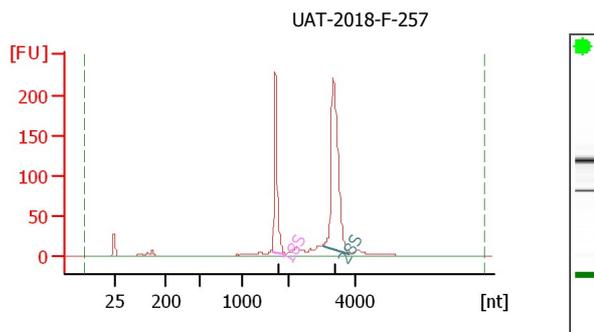


Overall Results for sample 6 : UAT-2018-F-268

RNA Area: 608.6
 RNA Concentration: 288 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 2.3
 RNA Integrity Number (RIN): 9.8 (B.02.08)
 Result Flagging Color: ████████
 Result Flagging Label: Good RNA quality.

Fragment table for sample 6 : UAT-2018-F-268

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,668	1,973	113.5	18.6
28S	3,090	3,934	263.0	43.2



Overall Results for sample 7 : UAT-2018-F-257

RNA Area: 857.3
 RNA Concentration: 406 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 2.0
 RNA Integrity Number (RIN): 9.9 (B.02.08)
 Result Flagging Color: ████████
 Result Flagging Label: Good RNA quality.

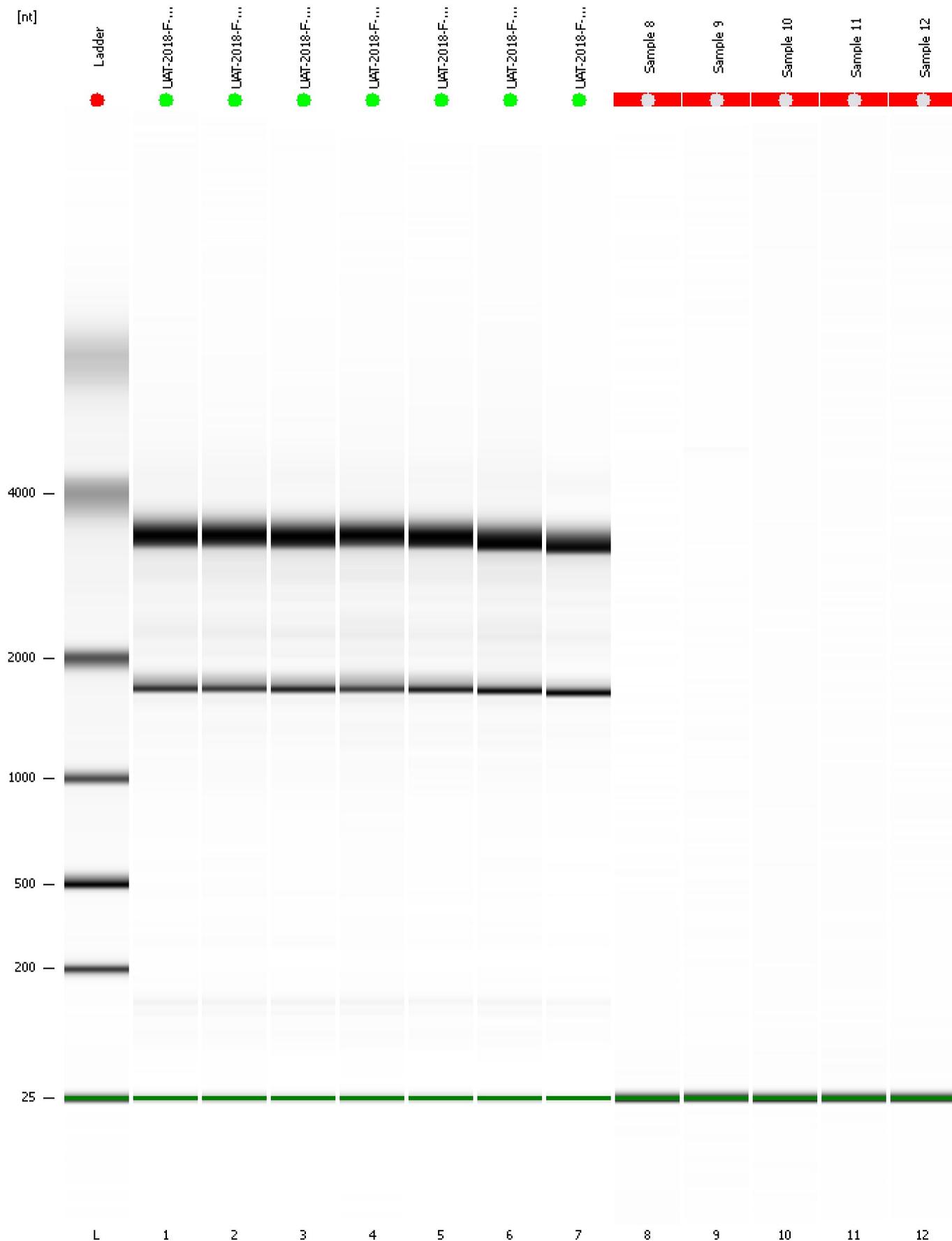
Fragment table for sample 7 : UAT-2018-F-257

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,651	1,914	210.6	24.6
28S	3,028	3,847	424.9	49.6

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
Data Path: D:\...8-1622 CQ2_Eukaryote Total RNA Nano_2018-04-11_16-11-12.xad

Created: 4/11/2018 4:11:12 PM
Modified: 4/11/2018 4:34:27 PM

Gel Image



Upregulated genes SK-N-BE(2) cells

shNSC (log2)	shERKS_1 (log2)	Fold Change	P-val	FDR P-val	Gene Symbol	Description
8,7	12,7	16,04	4,06E-07	0,0005	DYNLRB1	dynein, light chain, roadblock-type 1
8,32	11,65	10,08	2,09E-07	0,0004	PVRL1	poliovirus receptor-related 1 (herpesvirus entry mediator C)
6,09	9,41	10,01	6,44E-10	1,38E-05	ABCA12	ATP binding cassette subfamily A member 12
5,46	8,59	8,77	2,66E-06	0,0012	TYRP1	tyrosinase-related protein 1
5,76	8,63	7,29	4,24E-07	0,0005	MAPRE3	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 3
5,58	8,35	6,81	1,88E-06	0,001	HCN2	hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated potassium channel 2
8,22	10,88	6,35	0,0007	0,0277	PLPPR2	phospholipid phosphatase related 2
8,33	10,95	6,13	2,08E-08	0,0002	CMTM3	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 3
10,67	13,26	6,03	0,0018	0,0505	MFAP4	microfibrillar associated protein 4
8,06	10,63	5,96	9,12E-08	0,0004	ATG4D	autophagy related 4D, cysteine peptidase
8,39	10,92	5,79	0,0028	0,0641	MEIS3	Meis homeobox 3
5,76	8,22	5,48	7,87E-07	0,0007	SERPINI1	serpin peptidase inhibitor, clade I (neuroserpin), member 1
7,51	9,9	5,22	0,0052	0,0916	PIK3R2; IFI30	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 2beta; interferon, gamma-inducible protein 30
10	12,31	4,97	7,48E-06	0,0023	LIX1L	limb and CNS expressed 1 like
7,15	9,45	4,94	1,04E-05	0,0027	ZNF385A	zinc finger protein 385A
6,55	8,85	4,9	6,70E-06	0,0022	ADRBK1	adrenergic, beta, receptor kinase 1
9,86	12,12	4,8	0,0091	0,1263	SLITRK6	SLIT and NTRK-like family, member 6
5,54	7,78	4,71	0,0052	0,0911	PREX1	phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchange factor 1
8,17	10,39	4,65	1,33E-07	0,0004	TRAF7	TNF receptor-associated factor 7, E3 ubiquitin protein ligase
6,84	9,06	4,64	0,0013	0,0414	LIMK1	LIM domain kinase 1
6,36	8,56	4,6	4,96E-08	0,0003	MED19	mediator complex subunit 19
7,34	9,52	4,53	1,64E-07	0,0004	PIPSK1C	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, gamma
10,5	12,67	4,51	1,65E-07	0,0004	MFSD6	major facilitator superfamily domain containing 6
7,22	9,33	4,34	0,0001	0,0099	KLC2	kinesin light chain 2
7,7	9,82	4,33	2,33E-07	0,0004	MDM2	MDM2 proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase
7,37	9,47	4,3	2,04E-05	0,0041	CLU; MIR6843	clusterin; microRNA 6843
6,98	9,07	4,24	1,06E-05	0,0027	WWP2	WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2
10,82	12,9	4,23	2,17E-07	0,0004	M6PR	mannose-6-phosphate receptor (cation dependent)
9,65	11,73	4,23	0,0003	0,016	DRAP1	DR1-associated protein 1 (negative cofactor 2 alpha)
6,32	8,4	4,22	0,0015	0,0452	RBPM52	RNA binding protein with multiple splicing 2
6,76	8,83	4,19	4,27E-07	0,0005	FAM102A	family with sequence similarity 102, member A
7,82	9,88	4,18	9,69E-06	0,0027	GNA11	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 11 (Gq class)
10,01	12,04	4,08	2,27E-06	0,0011	CDK16	cyclin-dependent kinase 16
8,84	10,83	3,97	5,41E-05	0,0065	WBP2	WW domain binding protein 2
5,66	7,66	3,97	0,0355	0,2665	DYRK1B	dual specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1B
9,24	11,21	3,92	4,61E-05	0,0061	ARHGAP1	Rho GTPase activating protein 1
6,88	8,84	3,89	0,0011	0,0363	CELF3	CUGBP, Elav-like family member 3
4,58	6,53	3,85	0,0104	0,1373	PIK3C2B	phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase, catalytic subunit type 2 beta
5,62	7,55	3,81	0,0009	0,0334	CHAC1	ChaC glutathione-specific gamma-glutamylcyclotransferase 1
7,63	9,55	3,78	1,01E-06	0,0007	HSDL1	hydroxysteroid dehydrogenase like 1
6,03	7,93	3,71	5,21E-05	0,0064	SLC17A5	solute carrier family 17 (acidic sugar transporter), member 5
8,04	9,92	3,67	0,0208	0,2014	L1CAM	L1 cell adhesion molecule
11,15	13,03	3,66	6,80E-05	0,0074	RNF4	ring finger protein 4
10,04	11,91	3,65	0,0001	0,0099	KCNQ2	potassium channel, voltage gated KQT-like subfamily Q, member 2
9,95	11,81	3,63	0,007	0,1086	CTDSP1	CTD small phosphatase like
10,8	12,65	3,62	2,96E-06	0,0013	PKP2	plakophilin 2
9,63	11,47	3,59	0,0005	0,0223	MLLT3	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 3
6,7	8,54	3,57	0,0024	0,0583	SFXN3	sideroflexin 3
5,07	6,9	3,56	0,0259	0,2263	DYRK1B	dual specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1B
7,5	9,33	3,54	3,28E-05	0,0053	ULK1	unc-51 like autophagy activating kinase 1
5,59	7,4	3,5	5,47E-05	0,0065	NKIRAS2	Memczak2013 ANTISENSE, coding, INTERNAL, UTR3 best transcript NM_001001349
5,93	7,73	3,48	0,0205	0,2	TPBGL	trophoblast glycoprotein-like
6,21	8	3,46	0,0052	0,0911	HR	hair growth associated
8,66	10,45	3,46	0,0335	0,2588	KDEL3	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 3
11,15	12,94	3,45	3,46E-05	0,0054	P6V0A1; MIR50	ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit a1; microRNA 5010
6,67	8,42	3,37	0,011	0,1421	DLG4	discs, large homolog 4 (Drosophila)
10,69	12,44	3,36	8,39E-07	0,0007	NFIC	nuclear factor I/C (CAAAT-binding transcription factor)
3,68	5,43	3,36	0,0393	0,2806	RASGRP1	RAS guanyl releasing protein 1 (calcium and DAG-regulated)
7,34	9,08	3,33	0,0024	0,0592	RNF11	ring finger protein 11
7,06	8,79	3,32	6,49E-06	0,0022	ADAMTS4	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 4
8,88	10,6	3,29	1,12E-06	0,0007	GP1BB; SEPT5	glycoprotein Ib (platelet), beta polypeptide; septin 5
8,37	10,09	3,29	0,001	0,0351	SLC29A4	solute carrier family 29 (equilibrative nucleoside transporter), member 4
5,51	7,22	3,27	2,35E-05	0,0044	ARNTL	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like
9,28	10,99	3,27	0,0004	0,0193	KIAA0930	KIAA0930
6,54	8,24	3,25	8,99E-07	0,0007	ZBTB7A	zinc finger and BTB domain containing 7A
7,94	9,64	3,24	5,80E-06	0,0021	STMN3	stathmin-like 3
5,73	7,42	3,24	1,99E-05	0,0041	FBRSL1	fibrosin-like 1
6,33	8,02	3,24	0,0038	0,0769	GNA2	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 2 polypeptide
6,09	7,78	3,23	0,0056	0,0949	CAMK2N1	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1
7,54	9,23	3,22	0,0007	0,0289	PLXND1	plexin D1
8,39	10,08	3,22	0,0045	0,0844	PNPLA6	patatin-like phospholipase domain containing 6
6,62	8,3	3,19	0,0001	0,0099	MRS2	MRS2 magnesium transporter
4,46	6,13	3,18	0,0357	0,2665	ACPP	acid phosphatase, prostate
7,74	9,39	3,15	3,03E-05	0,0051	FGD1	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 1
9,41	11,06	3,13	6,17E-07	0,0006	THRA	thyroid hormone receptor, alpha
13,13	14,78	3,13	8,24E-07	0,0007	ATP6VOC	ATPase, H+ transporting, lysosomal 16kDa, V0 subunit c
8,81	10,45	3,13	0,0008	0,0297	REXO1; MIR190	REX1, RNA exonuclease 1 homolog; microRNA 1909
9,25	10,89	3,12	0,0007	0,0277	NOL4L	nucleolar protein 4-like
3,32	4,95	3,11	0,0068	0,1064	FAM114A1	family with sequence similarity 114, member A1
9,23	10,86	3,1	1,05E-05	0,0027	ZC3H7B	zinc finger CCCH-type containing 7B
5,33	6,96	3,1	5,57E-05	0,0066	CHPF	chondroitin polymerizing factor
9,51	11,14	3,09	0,0012	0,0404	TPMT	thiopurine S-methyltransferase
5,32	6,94	3,07	0,0013	0,041	GNG3	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 3
6,68	8,3	3,07	0,0018	0,0498	ITGB5	integrin beta 5
9,99	11,61	3,06	0,002	0,0529	FKBP14	FK506 binding protein 14
7,75	9,36	3,06	0,0022	0,0565	FBR5	fibrosin
4,19	5,8	3,05	0,0243	0,218	TMEM130	transmembrane protein 130

11,15	12,76	3,04	0,0002	0,0128	STXBP1	syntaxin binding protein 1
5,8	7,4	3,03	0,0059	0,0983	MAPK8IP1	mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 1 (JNK-interacting protein JIP)
5,95	7,53	3	0,0016	0,0464	SLC16A2	solute carrier family 16, member 2 (thyroid hormone transporter)
9,34	10,92	2,98	4,21E-05	0,0058	ARL8A	ADP-ribosylation factor like GTPase 8A
6,47	8,04	2,98	6,52E-05	0,0072	USF2	upstream transcription factor 2, c-fos interacting
8,48	10,05	2,98	0,0096	0,1306	RAB8B	RAB8B, member RAS oncogene family
8,87	10,44	2,97	0,0047	0,0864	EHD2	EH domain containing 2
10,59	12,15	2,96	1,95E-06	0,001	CLPP	caseinolytic mitochondrial matrix peptidase proteolytic subunit
7,64	9,2	2,96	6,33E-05	0,0071	DDR1; MIR4640	discoidin domain receptor tyrosine kinase 1; microRNA 4640
4,12	5,68	2,96	0,0001	0,0098	FUCA1	fucosidase, alpha-L-1, tissue
6,57	8,14	2,96	0,001	0,0358	CCM2	cerebral cavernous malformation 2
5,69	7,25	2,96	0,0276	0,2343	ARRDC4	arrestin domain containing 4
10,3	11,86	2,95	9,75E-06	0,0027	SS18	synovial sarcoma translocation, chromosome 18
8,72	10,27	2,93	4,63E-05	0,0061	NECAP1	NECAP endocytosis associated 1
5,77	7,32	2,93	0,0005	0,0236	CISH	cytokine inducible SH2-containing protein
8,44	9,99	2,93	0,0012	0,039	PLEKHA3	pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide binding) member 3
7,96	9,51	2,93	0,0062	0,1011	C6orf136	chromosome 6 open reading frame 136
7,78	9,32	2,92	0,0036	0,075	FEV	FEV (ETS oncogene family)
11,34	12,88	2,91	0,0005	0,0224	ACBD5	acyl-CoA binding domain containing 5
8,78	10,33	2,91	0,0007	0,0297	CCDC92	coiled-coil domain containing 92
7,56	9,1	2,9	9,54E-06	0,0027	KDM6B	lysine (K)-specific demethylase 6B
7,72	9,25	2,89	5,91E-05	0,0068	ZNF358	zinc finger protein 358
8,87	10,39	2,88	0,0002	0,0123	NPRL3	NPR3-like, GATOR1 complex subunit
5,45	6,97	2,86	0,0002	0,015	SRR	serine racemase
4,46	5,98	2,85	0,0002	0,0149	MAP3K13	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 13 activador de MKK7-JNK
10,9	12,41	2,85	0,0005	0,023	EFR3A	EFR3 homolog A
10,22	11,72	2,84	3,95E-05	0,0056	BTBD2	BTB (POZ) domain containing 2
5,79	7,29	2,84	0,0014	0,0435	QPRT	quinolate phosphoribosyltransferase
7,96	9,47	2,84	0,0085	0,1206	TMEM63B	transmembrane protein 63B
6,44	7,94	2,83	0,0001	0,0099	MKNK2	MAP kinase interacting serine/threonine kinase 2
7,01	8,51	2,83	0,0089	0,1243	MERTK	MER proto-oncogene, tyrosine kinase
8,55	10,04	2,81	7,96E-06	0,0024	CDH18	cadherin 18, type 2
6,89	8,38	2,81	3,17E-05	0,0052	AP1S3	adaptor-related protein complex 1 sigma 3 subunit
8,1	9,59	2,8	1,59E-06	0,0009	PLAGL2	pleiomorphic adenoma gene-like 2
7,42	8,91	2,8	0,013	0,1556	FZD7	frizzled class receptor 7
7,84	9,32	2,79	9,55E-05	0,0094	FAT4	FAT atypical cadherin 4
3,4	4,88	2,78	0,0005	0,022	C9orf116	chromosome 9 open reading frame 116
10,34	11,81	2,77	6,98E-05	0,0075	TRIOBP; NOL12	TRIO and F-actin binding protein; nucleolar protein 12
7,42	8,89	2,77	0,0003	0,0187	MTIF3	mitochondrial translational initiation factor 3
8,88	10,35	2,77	0,0025	0,0597	SH3GL1	SH3-domain GRB2-like 1
9,58	11,05	2,76	0,0012	0,0404	ARID3A	AT rich interactive domain 3A (BRIGHT-like)
9,01	10,47	2,75	0,0002	0,0133	VEGFC	vascular endothelial growth factor C
11,21	12,67	2,74	8,50E-07	0,0007	DDA1	DET1 and DDB1 associated 1
10,67	12,12	2,73	3,10E-05	0,0052	GPI	glucose-6-phosphate isomerase
9,04	10,49	2,73	0,0373	0,2735	C20orf194	chromosome 20 open reading frame 194
3,06	4,5	2,72	0,0003	0,016	DTNA	dystrobrevin, alpha
11,67	13,11	2,72	0,0018	0,0498	PTRHD1	peptidyl-tRNA hydrolase domain containing 1
9,12	10,56	2,72	0,0053	0,0927	TRAPP6B	trafficking protein particle complex 6B
9,53	10,96	2,71	0,0243	0,218	DCX	doublecortin (substrate JNK)
9,09	10,53	2,7	0,0002	0,0149	R3HDM2	R3H domain containing 2
5,07	6,5	2,7	0,0005	0,0234	LMLN	leishmanolysin-like (metallopeptidase M8 family)
5,16	6,59	2,69	0,0001	0,0105	FURIN	furin (paired basic amino acid cleaving enzyme)
7,82	9,25	2,68	1,26E-05	0,0029	RAB3C	RAB3C, member RAS oncogene family
11,22	12,64	2,67	9,67E-07	0,0007	CHCHD10	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 10
7,3	8,72	2,67	5,22E-06	0,002	TLE1	transducin-like enhancer of split 1 (E(sp1) homolog, Drosophila)
11,77	13,18	2,66	4,61E-06	0,0018	NQO1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1
8,32	9,73	2,66	0,0001	0,0099	KCTD13	potassium channel tetramerization domain containing 13
5,27	6,68	2,66	0,0006	0,026	ZFAND2B	zinc finger, AN1-type domain 2B
8,87	10,28	2,66	0,0018	0,0506	CCDC92	coiled-coil domain containing 92
8,82	10,23	2,65	5,37E-06	0,002	CBX6	chromobox homolog 6
6,05	7,45	2,65	3,77E-05	0,0056	GGA1	golgi-associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 1
13,91	15,32	2,65	7,12E-05	0,0076	KCNH2	potassium channel, voltage gated eag related subfamily H, member 2
7,81	9,22	2,65	0,0006	0,0274	GLRX	glutaredoxin
4,75	6,16	2,65	0,005	0,0891	SEZ6L2	seizure related 6 homolog (mouse)-like 2
6,69	8,09	2,64	0,0009	0,034	MAPKAPK3	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3 (p38 substrate)
4,07	5,47	2,64	0,0042	0,0809	PLCXD1	phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing 1
7,97	9,36	2,63	9,41E-06	0,0027	HS6ST3	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 3
8,34	9,74	2,63	2,87E-05	0,005	TMEM8A	transmembrane protein 8A
5,88	7,28	2,63	0,0008	0,0297	SCAMP4; ADAT3	secretory carrier membrane protein 4; adenosine deaminase, tRNA-specific 3
9,15	10,54	2,61	2,07E-06	0,0011	CHODL	chondrolectin
6,13	7,51	2,61	0,0149	0,1681	ELAVL3	ELAV like neuron-specific RNA binding protein 3
4,23	5,61	2,61	0,0266	0,2302	TCP11L2	t-complex 11, testis-specific-like 2
4,15	5,53	2,6	0,0001	0,0099	MAP2K7	mitogen-activated protein kinase kinase 7 (MKK7)
10,43	11,8	2,6	0,0021	0,055	TESK1; MIR4667	testis-specific kinase 1; microRNA 4667
7,43	8,81	2,6	0,0081	0,1174	MBOAT1	membrane bound O-acyltransferase domain containing 1
6,19	7,56	2,58	1,15E-06	0,0007	ATP13A2	ATPase type 13A2
4,91	6,28	2,58	9,59E-05	0,0094	RG59	regulator of G-protein signaling 9
7,94	9,31	2,58	0,0359	0,2674	ANKRD52	ankyrin repeat domain 52
9,41	10,77	2,57	0,0136	0,1594	EMP3	epithelial membrane protein 3
6,3	7,66	2,56	5,13E-07	0,0006	ZNFX1	zinc finger, NFX1-type containing 1
11,26	12,61	2,56	4,18E-05	0,0058	CDC25B	cell division cycle 25B
11,4	12,75	2,55	7,46E-06	0,0023	GBF1	golgi brefeldin A resistant guanine nucleotide exchange factor 1
6,11	7,46	2,55	7,43E-05	0,0079	AP1S1	adaptor-related protein complex 1 sigma 1 subunit
10,17	11,52	2,55	0,0006	0,0258	SCN3B	sodium channel, voltage gated, type III beta subunit
7,71	9,05	2,54	0,0002	0,0152	PPP6R1	protein phosphatase 6, regulatory subunit 1
6,13	7,48	2,54	0,0004	0,0196	RAB3A	RAB3A, member RAS oncogene family
7,68	9,02	2,54	0,0065	0,1041	GPR137B	G protein-coupled receptor 137B
9,29	10,63	2,53	0,0012	0,0404	OXR1	oxidation resistance 1
6,04	7,37	2,51	0,0045	0,0834	PPARA	peroxisome proliferator-activated receptor alpha
8,86	10,19	2,51	0,0084	0,1198	ATP2B4	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 4
8,18	9,5	2,51	0,0111	0,1423	GSTM2	glutathione S-transferase mu 2 (muscle)

7,58	8,9	2,5	1,90E-06	0,001	CERCAM	cerebral endothelial cell adhesion molecule
8,28	9,6	2,5	1,62E-05	0,0036	DOT1L	DOT1-like histone H3K79 methyltransferase
11,43	12,75	2,5	1,66E-05	0,0036	GFPT1	glutamine–fructose-6-phosphate transaminase 1
7,04	8,36	2,5	0,0003	0,0189	C11orf71	chromosome 11 open reading frame 71
8	9,32	2,5	0,0017	0,0495	MAPK8IP3	mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3
9,02	10,33	2,5	0,0212	0,204	B3GALNT2	beta-1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase 2
8,85	10,17	2,5	0,039	0,2791	SKIL	SKI-like proto-oncogene
9,64	10,95	2,49	2,55E-05	0,0046	POLR3D	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide D, 44kDa
5,02	6,34	2,49	0,0001	0,0105	SLC22A5	solute carrier family 22 (organic cation/carnitine transporter), member 5
13,94	15,26	2,49	0,0001	0,011	NT5DC2	5-nucleotidase domain containing 2
9,08	10,4	2,49	0,0004	0,0204	AKT3	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3
7,79	9,1	2,49	0,001	0,0345	PCBP3	poly(rC) binding protein 3
7,54	8,85	2,49	0,0025	0,0606	FBXW5	F-box and WD repeat domain containing 5
5,18	6,5	2,49	0,007	0,1086	PLCXD1	phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing 1
4,88	6,19	2,48	0,0001	0,0099	HPGDS	hematopoietic prostaglandin D synthase
7,64	8,95	2,48	0,0003	0,0173	TBC1D20	TBC1 domain family, member 20
5,82	7,13	2,48	0,001	0,0346	SMPD1	sphingomyelin phosphodiesterase 1, acid lysosomal
11,28	12,58	2,47	0,0002	0,0138	BSCL2	Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2 (seipin)
9,23	10,54	2,47	0,001	0,0346	GDE1	glycerophosphodiester phosphodiesterase 1
8,76	10,07	2,47	0,0051	0,0906	CORO2A	coronin, actin binding protein, 2A
6,48	7,78	2,47	0,0055	0,0944	GLIS2	GLIS family zinc finger 2
7,36	8,67	2,47	0,0445	0,2976	PIAS3	protein inhibitor of activated STAT 3
4,05	5,34	2,46	0,0038	0,0769	CPEB3	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 3
9,55	10,85	2,46	0,0057	0,0968	CREB3L2	cAMP responsive element binding protein 3-like 2
5,78	7,08	2,46	0,0101	0,1348	RG513	regulator of G-protein signaling 13
6,88	8,17	2,45	0,0002	0,0128	CD200	CD200 molecule
5,22	6,51	2,44	0,0465	0,3035	MAOA	monoamine oxidase A
8,27	9,55	2,43	3,54E-05	0,0054	KIF3C	kinesin family member 3C
10,16	11,43	2,43	5,24E-05	0,0064	CENGL1	cyclin G1
8,63	9,91	2,43	0,0004	0,0214	VPS39	vacuolar protein sorting 39 homolog (S. cerevisiae)
8,6	9,88	2,43	0,0042	0,0815	LDOC1	leucine zipper, down-regulated in cancer 1
8,62	9,9	2,43	0,0045	0,0833	MEGF9	multiple EGF-like-domains 9
9,2	10,48	2,42	0,0003	0,0189	FZD1	frizzled class receptor 1
8,12	9,4	2,42	0,0007	0,0276	HMG20B	high mobility group 20B
8,6	9,88	2,42	0,0008	0,032	TXNIP	thioredoxin interacting protein
5,33	6,61	2,42	0,0051	0,0906	CLYBL	citrate lyase beta like
7,86	9,13	2,42	0,0277	0,2348	RBBP1	ribosome binding protein 1
8,67	9,94	2,41	0,0487	0,3087	GUCY1B3	guanylate cyclase 1, soluble, beta 3
10,49	11,76	2,4	0,0006	0,0258	LGALS3BP	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein
7,6	8,86	2,39	0,0012	0,0403	TAPBP	TAP binding protein (tapasin)
6,81	8,06	2,39	0,0105	0,1381	CASZ1	castor zinc finger 1
6,61	7,86	2,38	0,0039	0,0777	RABGAP1L	RAB GTPase activating protein 1-like
7,3	8,55	2,38	0,0181	0,1885	TRPM3	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 3
12,53	13,78	2,37	2,38E-05	0,0044	LARP1	La ribonucleoprotein domain family, member 1
5,92	7,17	2,37	0,0004	0,0191	SEPN1	selenoprotein N, 1
9,58	10,82	2,37	0,0034	0,0725	PRR14	proline rich 14
5,57	6,81	2,37	0,0463	0,3031	LRRC4B	leucine rich repeat containing 4B
3,55	4,79	2,36	0,0014	0,0435	C16orf72	Memczak2013 ANTISENSE, coding, INTERNAL, intronic best transcript NM_014117
7,28	8,51	2,35	2,55E-05	0,0046	NEU1	sialidase 1 (lysosomal sialidase)
12,64	13,88	2,35	3,59E-05	0,0054	CAPNS1	calpain, small subunit 1
6,09	7,32	2,35	0,0008	0,0306	PDP2	pyruvate dehydrogenase phosphatase catalytic subunit 2
6,61	7,84	2,35	0,0009	0,0334	LDLR	very low density lipoprotein receptor
10,36	11,59	2,35	0,0102	0,1357	CERK	ceramide kinase
8,16	9,39	2,34	0,008	0,1169	DCP1B	decapping mRNA 1B
7,18	8,4	2,32	2,03E-06	0,0011	CLIP1	CAP-GLY domain containing linker protein 1
10,92	12,13	2,32	0,0012	0,0398	NAGK	N-acetylglucosamine kinase
8,42	9,64	2,32	0,0214	0,2049	GRIA4	glutamate receptor, ionotropic, AMPA 4
3,78	4,99	2,32	0,0475	0,3051	LPAR6	lysophosphatidic acid receptor 6
11,75	12,96	2,31	1,40E-06	0,0009	PRELID3B; ATP5	PRELI domain containing 3B; ATP synthase, mitochondrial F1 complex, epsilon subunit
7,89	9,1	2,31	8,59E-05	0,0087	B3GALT1	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase 1
6,72	7,93	2,31	0,008	0,1169	BBS2	Bardet-Biedl syndrome 2
5,63	6,84	2,31	0,0304	0,2457	POLR3GL	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide G (32kd)-like
11,18	12,38	2,3	0,0002	0,0155	RMDN3	regulator of microtubule dynamics 3
6,97	8,18	2,3	0,0006	0,026	ABR	active BCR-related
12,09	13,29	2,3	0,0044	0,0824	STAU2	staufen double-stranded RNA binding protein 2
11,89	13,09	2,29	1,55E-05	0,0035	CDC42	cell division cycle 42
7,98	9,16	2,28	0,0058	0,0976	CRTC1	CREB regulated transcription coactivator 1
7,45	8,63	2,27	0,0001	0,0105	AKIRIN1	akirin 1
6,79	7,97	2,27	0,0043	0,0817	XYLT1	xylosyltransferase I
9,06	10,24	2,27	0,0341	0,2606	KPNA5	karyopherin alpha 5 (importin alpha 6)
7,69	8,86	2,26	0,0001	0,0115	ABHD17C	abhydrolase domain containing 17C
14,08	15,25	2,26	0,0004	0,0198	NETO2	neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 2
8,46	9,63	2,26	0,0013	0,0427	SNRNP27	small nuclear ribonucleoprotein, U4/U6.U5 27kDa subunit
4,7	5,88	2,26	0,0031	0,0682	ZBTB4	zinc finger and BTB domain containing 4
4,91	6,09	2,26	0,0049	0,0885	DNASE1	deoxyribonuclease I
8,43	9,61	2,26	0,0221	0,2076	MAP15	microtubule-associated protein 15
4,28	5,45	2,25	0,0037	0,0755	ADAM32	ADAM metallopeptidase domain 32
4,55	5,72	2,25	0,0041	0,0797	MMP15	matrix metallopeptidase 15 (membrane-inserted)
5,98	7,15	2,25	0,008	0,1168	RNF165	ring finger protein 165
6,16	7,33	2,25	0,0238	0,2166	PICK1	protein interacting with PRKCA 1
10,34	11,5	2,24	8,77E-06	0,0025	ACOT13	acyl-CoA thioesterase 13
7,86	9,02	2,24	2,72E-05	0,0049	DBP	D site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein
10,52	11,68	2,24	0,0003	0,0187	NEO1	neogenin 1
7,6	8,77	2,24	0,0007	0,0284	DAG1	dystroglycan 1 (dystrophin-associated glycoprotein 1)
4,41	5,57	2,24	0,0008	0,0317	ZSWIM4	zinc finger, SWIM-type containing 4
8,04	9,21	2,24	0,0174	0,1855	HTATIP2	HIV-1 Tat interactive protein 2
6,72	7,88	2,23	4,44E-05	0,006	GBA2	glucosidase, beta (bile acid) 2
11,03	12,19	2,23	8,34E-05	0,0086	LMBRD1	LMBR1 domain containing 1
8,59	9,75	2,23	0,0007	0,0297	RG510	regulator of G-protein signaling 10
5,31	6,47	2,23	0,001	0,0354	C7	complement component 7
4,66	5,82	2,23	0,0015	0,0456	TOX2	TOX high mobility group box family member 2

11,64	12,79	2,23	0,0105	0,1381	REEP5	receptor accessory protein 5
8,74	9,89	2,22	3,84E-05	0,0056	GLB1; TMPPPE	galactosidase beta 1; transmembrane protein with metallophosphoesterase domain
7,09	8,24	2,22	8,56E-05	0,0087	DUS1L	dihydrouridine synthase 1-like
13,23	14,38	2,22	9,37E-05	0,0093	FCHSD2	FCH and double SH3 domains 2
9,24	10,39	2,22	0,0006	0,0254	KMT2D	lysine (K)-specific methyltransferase 2D
9,26	10,41	2,22	0,0262	0,2281	ID3	inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein
11,21	12,36	2,21	1,11E-05	0,0027	LY6E	lymphocyte antigen 6 complex, locus E
9,78	10,93	2,21	7,94E-05	0,0082	USP42	ubiquitin specific peptidase 42
9,18	10,32	2,21	0,0067	0,1059	TMED4	transmembrane p24 trafficking protein 4
7,2	8,34	2,2	2,05E-05	0,0041	GPR180	G protein-coupled receptor 180
5,67	6,8	2,2	0,0005	0,0242	PODXL	podocalyxin-like
5,48	6,61	2,19	5,89E-05	0,0068	PTPRM	protein tyrosine phosphatase, receptor type, M
7,73	8,86	2,19	0,0001	0,0105	EHD1	EH domain containing 1
11,68	12,81	2,19	0,0002	0,0135	ELMOD2	ELMO/CED-12 domain containing 2
14,4	15,53	2,19	0,0012	0,039	PPP1CC	protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isozyme
5,22	6,35	2,19	0,0028	0,0641	SPRYD3	SPRY domain containing 3
7,79	8,92	2,19	0,0124	0,1515	CPT1A	carnitine palmitoyltransferase 1A (liver)
7,52	8,64	2,18	2,20E-05	0,0042	GLMP	glycosylated lysosomal membrane protein
10,69	11,82	2,18	0,0008	0,0319	ECI2	enoyl-CoA delta isomerase 2
9,55	10,68	2,18	0,0037	0,0758	PLD3	phospholipase D family, member 3
4,29	5,41	2,18	0,0089	0,1242	ULBP1	UL16 binding protein 1
3,63	4,75	2,18	0,0095	0,1294	VPS9D1	VPS9 domain containing 1
5,82	6,94	2,18	0,0311	0,2489	MAP6	microtubule associated protein 6
8	9,11	2,17	0,0026	0,0615	BCL7A	B-cell CLL/lymphoma 7A
9,22	10,33	2,17	0,0026	0,0619	CCDC53	coiled-coil domain containing 53
10,4	11,52	2,17	0,0125	0,1522	MIA3	melanoma inhibitory activity family, member 3
4,73	5,85	2,17	0,0254	0,2241	STAT2	signal transducer and activator of transcription 2
8,51	9,63	2,16	0,0001	0,0108	CNNJL	cyclin J-like
5,92	7,03	2,16	0,0006	0,0263	TP53TG3D	TP53 target 3D
6,87	7,98	2,16	0,0038	0,0764	BCAT2	branched chain amino-acid transaminase 2, mitochondrial
5,41	6,53	2,16	0,0075	0,1129	HCFC1R1	host cell factor C1 regulator 1 (XPO1 dependent)
7,16	8,27	2,16	0,0148	0,1678	MARCH8	membrane associated ring finger 8
7,86	8,97	2,16	0,0207	0,2011	TRIM69	tripartite motif containing 69
8,19	9,31	2,16	0,0242	0,2178	HOMEZ	homeobox and leucine zipper encoding
5,7	6,81	2,16	0,0262	0,2281	PGBD4	piggyBac transposable element derived 4
8,66	9,77	2,16	0,0363	0,2695	TMEM169	transmembrane protein 169
6,35	7,45	2,15	0,0004	0,0199	DPYSL5	dihydropyrimidinase-like 5
7,15	8,25	2,15	0,0185	0,1909	ARHGEF17	Rho guanine nucleotide exchange factor 17
7,41	8,51	2,15	0,0355	0,2665	WDR17	WD repeat domain 17
9,76	10,86	2,14	4,38E-05	0,0059	PAPD7	PAP associated domain containing 7
3,72	4,82	2,14	0,0001	0,0108	IGDCC3	immunoglobulin superfamily, DCC subclass, member 3
4,5	5,6	2,14	0,016	0,1759	SBK1	SH3 domain binding kinase 1
8,26	9,36	2,14	0,0256	0,2248	MARK4	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4
3,29	4,39	2,14	0,0273	0,2332	KBTBD3	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 3
5,78	6,87	2,13	3,60E-05	0,0054	PCGF5	polycomb group ring finger 5
10,89	11,98	2,12	0,0003	0,0165	DNAJB5	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 5
7,24	8,32	2,12	0,0007	0,0276	PP1P5K1	diphosphoinositol pentakisphosphate kinase 1
4,77	5,85	2,12	0,0015	0,0457	TNFAIP2	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2
3,18	4,26	2,12	0,0207	0,2011	GAS2L1	growth arrest-specific 2 like 1
10,13	11,21	2,11	0,0001	0,0102	AP3D1	adaptor-related protein complex 3, delta 1 subunit
7,03	8,11	2,11	0,0051	0,0906	PHF1	PHD finger protein 1
7,74	8,81	2,1	5,88E-05	0,0068	SS18L1	synovial sarcoma translocation gene on chromosome 18-like 1
10,16	11,23	2,1	0,0008	0,0307	SLC39A9	solute carrier family 39, member 9
7,9	8,96	2,1	0,0082	0,1188	DAP	death-associated protein
6,67	7,73	2,09	3,93E-05	0,0056	GIPC1	GIPC PDZ domain containing family, member 1
5,94	7	2,09	9,18E-05	0,0091	SLC36A1	solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter), member 1
10,99	12,06	2,09	0,0001	0,0108	APOA1BP	apolipoprotein A-I binding protein
10,5	11,56	2,09	0,0002	0,0132	NABP2	nucleic acid binding protein 2
7,66	8,72	2,09	0,0002	0,0149	PPARD	peroxisome proliferator-activated receptor delta
7,27	8,33	2,09	0,0017	0,0486	SNX16	sorting nexin 16
5,67	6,73	2,09	0,0045	0,0833	CDC169-SOHLH	CCDC169-SOHLH2 readthrough
8,93	9,99	2,08	3,21E-05	0,0053	KIAA0319L	KIAA0319-like
7,13	8,19	2,08	0,0004	0,0191	MFHAS1	malignant fibrous histiocytoma amplified sequence 1
10,66	11,72	2,08	0,0004	0,0209	DCTN6	dynactin 6
3,56	4,61	2,08	0,0009	0,0325	FAM212A	family with sequence similarity 212, member A
3,1	4,16	2,08	0,0019	0,051	IFI44L	interferon-induced protein 44-like
10,01	11,07	2,08	0,003	0,0665	GALNT14	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 14
11,57	12,63	2,08	0,0071	0,109	TPD52	tumor protein D52
8,78	9,83	2,08	0,013	0,1556	RHOBTB2	Rho-related BTB domain containing 2
6,9	7,96	2,08	0,0135	0,1592	GRAMD1A	GRAM domain containing 1A
9,44	10,5	2,08	0,0436	0,2949	PLXNA1	plexin A1
6,14	7,19	2,07	0,0003	0,0166	NUDT19	nudix hydrolase 19
11,17	12,21	2,07	0,0013	0,0427	SEC23A	Sec23 homolog A, COPII coat complex component
7,7	8,75	2,07	0,0048	0,0875	PITRM1	pitrylsin metalloproteinase 1
8,11	9,16	2,07	0,0235	0,2148	MAST4	microtubule associated serine/threonine kinase family member 4
10,13	11,17	2,06	5,18E-05	0,0063	UQCR10	ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit X
7,17	8,21	2,06	0,0001	0,0108	TPRG1L	tumor protein p63 regulated 1-like
8,14	9,19	2,06	0,0003	0,0189	CUL7	cullin 7
10,53	11,57	2,06	0,0005	0,0225	NUCB2	nucleobindin 2
11,34	12,39	2,06	0,0035	0,0739	RALGAPB	Ral GTPase activating protein, beta subunit (non-catalytic)
9,27	10,31	2,06	0,0216	0,2058	CALHM2	calcium homeostasis modulator 2
11,51	12,55	2,05	0,0003	0,016	G6PD	glucose-6-phosphate dehydrogenase
5,2	6,23	2,05	0,0003	0,0172	UBASH3B	ubiquitin associated and SH3 domain containing B
8,8	9,83	2,05	0,0019	0,0512	VGLL4	vestigial-like family member 4
10,05	11,09	2,05	0,0144	0,1655	YIF1A	Yip1 interacting factor homolog A (S. cerevisiae)
7,87	8,91	2,05	0,0169	0,1818	SIDT2	SID1 transmembrane family, member 2
12,93	13,97	2,05	0,0241	0,2175	SLC7A5	solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, L system), member 5
8,56	9,59	2,04	5,11E-05	0,0063	THTPA	thiamine triphosphatase
8,78	9,81	2,04	0,0003	0,016	CCDC88C	coiled-coil domain containing 88C
5,92	6,94	2,04	0,0006	0,0263	FOXP4; MIR4641	forkhead box P4; microRNA 4641
8,68	9,71	2,04	0,0014	0,0441	KEAP1	kelch-like ECH-associated protein 1

7,74	8,76	2,04	0,0259	0,2262	NLK	nemo-like kinase
12,61	13,63	2,03	2,80E-05	0,0049	EMSY	EMSY BRCA2-interacting transcriptional repressor
11,59	12,61	2,03	3,71E-05	0,0056	EIF4E2	eukaryotic translation initiation factor 4E family member 2
10,86	11,88	2,03	7,70E-05	0,0081	RGL1	ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1
8,66	9,67	2,03	0,0004	0,0204	C6orf203	chromosome 6 open reading frame 203
7,98	9	2,03	0,0004	0,0213	GSTM4	glutathione S-transferase mu 4
9,19	10,22	2,03	0,0009	0,0331	FZD6	frizzled class receptor 6
7,7	8,72	2,03	0,0016	0,0465	RNF149	ring finger protein 149
9,96	10,98	2,03	0,0037	0,0758	WDR41	WD repeat domain 41
11,37	12,39	2,02	2,38E-05	0,0044	GBA3	Jeck2013 ANTISENSE, coding, INTERNAL, intronic best transcript NM_020973
9,16	10,17	2,02	0,0001	0,0098	LIN28B	lin-28 homolog B (C. elegans)
10,39	11,4	2,02	0,0001	0,011	WIPI2	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 2
9,41	10,42	2,02	0,0002	0,0142	TMUB1	transmembrane and ubiquitin-like domain containing 1
7,2	8,21	2,02	0,0004	0,0193	CLPTM1	cleft lip and palate associated transmembrane protein 1
11,62	12,63	2,02	0,0005	0,022	CDC42SE1	CDC42 small effector 1
5,77	6,78	2,02	0,0014	0,0442	TLL1	tubulin tyrosine ligase-like family member 1
11,82	12,83	2,02	0,0223	0,2093	FTO	fat mass and obesity associated
11,65	12,65	2,01	7,93E-05	0,0082	RHOQ	ras homolog family member Q
9,22	10,23	2,01	0,0002	0,0128	SSU72	SSU72 homolog, RNA polymerase II CTD phosphatase
12,62	13,63	2,01	0,001	0,0347	TMEM138	transmembrane protein 138
11,27	12,27	2,01	0,0012	0,0404	ZFAND3	zinc finger, AN1-type domain 3
6,08	7,09	2,01	0,0016	0,046	TMEM164	transmembrane protein 164
6,24	7,25	2,01	0,0016	0,0465	LRP4	LDL receptor related protein 4
9,55	10,56	2,01	0,0019	0,0511	LRP5	LDL receptor related protein 5
9,08	10,08	2,01	0,004	0,0783	MYEOV2	myeloma overexpressed 2
6,99	7,99	2,01	0,0068	0,1061	CC2D1A	coiled-coil and C2 domain containing 1A
10,02	11,03	2,01	0,0071	0,109	GRAMD1B	GRAM domain containing 1B
8,38	9,39	2,01	0,0115	0,1451	PLEKHB1	pleckstrin homology domain containing, family B (evectins) member 1
7,97	8,98	2,01	0,0241	0,2175	MTSS1L	metastasis suppressor 1-like
4,85	5,85	2	0,0009	0,0322	CNTN4	contactin 4
10,78	11,79	2	0,0016	0,0474	ARV1	ARV1 homolog, fatty acid homeostasis modulator
9,59	10,59	2	0,0024	0,0588	TSPAN31	tetraspanin 31
10,59	11,59	2	0,0043	0,0822	MSANTD4	Myb/SANT-like DNA-binding domain containing 4 with coiled-coils

Down-regulated genes SK-N-BE(2) cells

shNSC (log2)	shERK5_1 (log2)	Fold Change	P-val	FDR P-val	Gene Symbol	Description
11,39	7,29	-17,22	1,82E-05	0,0039	B4GALT6	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 6
12,25	9,18	-8,4	3,08E-06	0,0013	CDK6	cyclin-dependent kinase 6
13,64	10,98	-6,31	0,0063	0,1027	GREM1	gremlin 1, DAN family BMP antagonist
11,63	9,12	-5,72	0,0145	0,1655	SYNPO2	synaptopodin 2
10,44	7,95	-5,61	0,0009	0,0325	SEMA3A	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3A
6,45	4	-5,49	2,60E-08	0,0002	NGG10	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 10
9,8	7,35	-5,46	0,0003	0,0162	FKBP1A; MIR6869	FK506 binding protein 1A; microRNA 6869
13,77	11,35	-5,35	0,006	0,0996	GREM1	gremlin 1, DAN family BMP antagonist [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2001]
13,44	11,02	-5,35	0,0129	0,1552	FAF2	Fas associated factor family member 2
9,62	7,21	-5,34	0,003	0,0661	GPM6B	glycoprotein M6B
11,42	9,03	-5,21	2,28E-06	0,0011	IMPAD1	inositol monophosphatase domain containing 1
9,88	7,5	-5,18	2,37E-07	0,0004	DNAJC25-GNG10	DNAJC25-GNG10 readthrough
11,52	9,17	-5,08	4,58E-07	0,0005	GLUD1	glutamate dehydrogenase 1
10,19	7,88	-4,96	0,0011	0,0363	FBXO21	F-box protein 21
11,25	8,98	-4,82	0,0029	0,0657	SLC39A14	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 14
10,78	8,57	-4,61	0,0441	0,2968	FUNDC2	FUN14 domain containing 2
11,08	8,89	-4,58	4,82E-05	0,0062	MINPP1	multiple inositol-polyphosphate phosphatase 1
14,85	12,65	-4,57	0,0085	0,121	GLO1	glyoxalase I
10,75	8,58	-4,51	6,59E-06	0,0022	MAT2B	methionine adenosyltransferase II, beta
6,07	3,9	-4,51	7,68E-06	0,0024	TM2D3	TM2 domain containing 3
14,3	12,12	-4,51	0,0055	0,0945	GREM1	gremlin 1, DAN family BMP antagonist [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2001]
11,09	8,92	-4,48	0,0357	0,2665	JAK1	Janus kinase 1
11,94	9,79	-4,43	0,0057	0,0965	TGFBI	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa
11,03	8,89	-4,42	0,0014	0,0427	SYT14	synaptotagmin XIV
9,32	7,2	-4,35	0,0091	0,1258	QDPR	quinoid dihydropteridine reductase
12,23	10,13	-4,27	0,0081	0,1175	RHNO1	RAD9-HUS1-RAD1 interacting nuclear orphan 1
8,65	6,57	-4,25	0,0025	0,0606	HIST1H3A	histone cluster 1, H3a
13,41	11,33	-4,22	4,64E-06	0,0018	TMEM30A	transmembrane protein 30A
9,02	6,99	-4,1	0,0036	0,0745	LPAR1	Jeck2013 ALT_ACCEPTOR, ALT_DONOR, coding, intronic best transcript NM_057159
7,65	5,63	-4,08	6,76E-06	0,0022	CAMKV	CaM kinase-like vesicle-associated
9,63	7,6	-4,07	3,50E-06	0,0015	SDC4	syndecan 4
10,62	8,61	-4,04	0,0006	0,0254	HIST1H1D	histone cluster 1, H1d
12,31	10,3	-4,02	0,0444	0,2976	RAB21	RAB21, member RAS oncogene family
11,3	9,3	-4,01	0,028	0,2363	TSN	translin
7,27	5,28	-3,99	0,0006	0,0265	ANKRD1	ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)
11,04	9,05	-3,97	3,96E-06	0,0016	FGF14; FGF14-IT1	fibroblast growth factor 14; FGF14 intronic transcript 1
13,39	11,4	-3,97	0,0431	0,294	TMX1	thioredoxin-related transmembrane protein 1
9,73	7,75	-3,96	4,41E-07	0,0005	SLCGA15	solute carrier family 6 (neutral amino acid transporter), member 15
11,78	9,8	-3,95	0,0002	0,0121	OAT	ornithine aminotransferase
12,29	10,32	-3,91	0,0024	0,0588	HMGCS1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1 (soluble)
6,98	5,02	-3,9	4,88E-06	0,0019	KCNQ5	Jeck2013 ALT_ACCEPTOR, ALT_DONOR, coding, intronic best transcript NM_001160133
12,79	10,83	-3,89	2,90E-05	0,0005	SOLE	squalene epoxidase
10,17	8,21	-3,87	1,67E-05	0,0036	SLC7A2	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2
10,5	8,55	-3,87	0,001	0,0358	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
7,35	5,41	-3,83	0,0032	0,0688	CASP7	caspase 7
10,55	8,62	-3,82	4,52E-07	0,0005	KLHL15	kelch-like family member 15
10,96	9,03	-3,8	1,00E-05	0,0027	PROSER1	proline and serine rich 1
13,21	11,3	-3,77	0,0243	0,218	SERINC3	serine incorporator 3
9,13	7,23	-3,72	0,0001	0,0099	SYNPO	synaptopodin
11,17	9,28	-3,7	6,09E-07	0,0006	GPAT4	glycerol-3-phosphate acyltransferase 4
10,4	8,52	-3,7	0,0006	0,0251	LONRF2	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 2
11,72	9,84	-3,69	0,0004	0,0196	FAM8A1	family with sequence similarity 8, member A1
8,74	6,85	-3,69	0,0015	0,0448	NOL6	nucleolar protein 6 (RNA-associated)
12,39	10,51	-3,68	1,57E-05	0,0036	NCOA4	nuclear receptor coactivator 4
10,44	8,57	-3,67	1,93E-06	0,001	TMED8	transmembrane p24 trafficking protein family member 8
11,2	9,32	-3,66	0,0006	0,0254	PHF10	PHD finger protein 10
9,95	8,08	-3,66	0,0175	0,1861	LGMM	legumain
8,75	6,88	-3,64	1,17E-05	0,0028	EXT1; humera	Jeck2013 ALT_ACCEPTOR, INTERNAL, intronic best transcript NM_000127;
7,06	5,2	-3,63	5,34E-05	0,0064	RBMS1	Jeck2013 ALT_ACCEPTOR, ALT_DONOR, coding, intronic best transcript NM_016836
7,86	6,01	-3,61	0,0019	0,0521	TAF4B	TAF4B RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 105kDa
7,3	5,46	-3,59	0,0003	0,0171	MURC	muscle-related coiled-coil protein
7,78	5,94	-3,57	0,0029	0,0656	MAML3	Memczak2013 ALT_ACCEPTOR, ALT_DONOR, coding, intronic best transcript NM_018717
11,71	9,88	-3,55	3,73E-05	0,0056	CDC6	cell division cycle 6
13,14	11,32	-3,55	0,0241	0,2178	RSPRY1	ring finger and SPRY domain containing 1
13,93	12,11	-3,55	0,0454	0,3001	MAP3K1	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1, E3 ubiquitin protein ligase
8	6,19	-3,51	0,0001	0,0114	CCKAR	cholecystokinin A receptor
12,51	10,72	-3,48	2,79E-05	0,0049	OTUD4	OTU deubiquitinase 4
7,34	5,55	-3,47	1,97E-05	0,0041	MYRF	myelin regulatory factor
9,27	7,49	-3,43	0,0337	0,2595	NRP2	neuropilin 2
14	12,23	-3,41	0,0171	0,1834	IER3	immediate early response 3
11,94	10,21	-3,34	8,64E-05	0,0087	OSBPL3	oxysterol binding protein-like 3
13,33	11,6	-3,3	5,22E-07	0,0006	ARL5B	ADP-ribosylation factor like GTPase 5B
7,45	5,74	-3,26	0,0006	0,0263	LMNTD1	lamin tail domain containing 1
10,26	8,55	-3,26	0,0468	0,3042	OSTM1	osteopetrosis associated transmembrane protein 1
8,47	6,77	-3,25	1,11E-05	0,0027	RAD1	RAD1 checkpoint DNA exonuclease
7,17	5,47	-3,25	0,0001	0,0108	TTC28	Jeck2013 ALT_ACCEPTOR, ALT_DONOR, coding, intronic best transcript NM_001145418
8,32	6,62	-3,24	2,67E-05	0,0048	ABCB10	ATP binding cassette subfamily B member 10
10,1	8,4	-3,24	0,0006	0,0267	LSM6	LSM6 homolog, U6 small nuclear RNA and mRNA degradation associated
13,33	11,64	-3,22	0,0041	0,0805	8	mitogen-activated protein kinase 6 /ERK3)
9,58	7,89	-3,21	0,0021	0,0542	TGOLN2	trans-golgi network protein 2
6,31	4,63	-3,21	0,0035	0,0732	GYG2	glycogenin 2
12,34	10,67	-3,2	0,0008	0,032	MMGT1	membrane magnesium transporter 1
7,34	5,66	-3,2	0,0037	0,0755	RPL39L	ribosomal protein L39-like
10,35	8,68	-3,19	0,0001	0,011	DCHS1	dachsous cadherin-related 1
8,67	7	-3,19	0,0061	0,0999	UNG	uracil DNA glycosylase
12,23	10,57	-3,16	5,15E-05	0,0063	VMA21	VMA21 vacuolar H+-ATPase homolog (S. cerevisiae)
7,96	6,31	-3,16	0,005	0,0894	HTR2B	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B, G protein-coupled
12,11	10,45	-3,15	2,77E-05	0,0049	MRE11A	MRE11 homolog A, double strand break repair nuclease
13,8	12,14	-3,15	0,0344	0,2615	ISL1	ISL LIM homeobox 1
9,03	7,38	-3,14	0,0001	0,0105	RWDD4	RWD domain containing 4
13,89	12,24	-3,13	0,0403	0,2844	HIST1H3I	histone cluster 1, H3i
5,58	3,94	-3,12	3,24E-05	0,0053	SPATA5	Transcript identified by AceView, Entrez Gene ID(s) 166378
11,37	9,73	-3,12	0,0001	0,0098	RAB11FIP2	RAB11 family interacting protein 2 (class I)
10,85	9,22	-3,11	0,012	0,1487	KCNQ5	potassium channel, voltage gated KQT-like subfamily Q, member 5
11,49	9,85	-3,11	0,0155	0,1729	PTPN1	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1
13	11,37	-3,1	5,83E-07	0,0006	RAB5C	RAB5C, member RAS oncogene family

7,68	6,05	-3,09	0,0004	0,0204	GLI2	Jeck2013 ALT_ACCEPTOR, ALT_DONOR, coding, intronic best transcript NM_005270
12,12	10,49	-3,09	0,0108	0,1402	FAM72C	family with sequence similarity 72, member C
14,22	12,59	-3,08	3,00E-05	0,0051	GNPNAT1	glucosamine-phosphate N-acetyltransferase 1
6,89	5,28	-3,06	6,77E-06	0,0022	COPS7A	COP9 signalosome subunit 7A
10,27	8,66	-3,06	5,47E-05	0,0065	HIST1H1C	histone cluster 1, H1c
12,27	10,66	-3,06	0,0013	0,041	SCRN1	secernin 1
15,91	14,31	-3,03	0,0166	0,1801	TCF4	transcription factor 4
6,64	5,04	-3,02	0,0001	0,0105	SPIN4	spindlin family, member 4
12,21	10,61	-3,02	0,0265	0,2296	TERF2IP	telomeric repeat binding factor 2, interacting protein
9,77	8,19	-3	4,39E-05	0,0059	CALCOCO2	calcium binding and coiled-coil domain 2
10,84	9,25	-3	0,0002	0,0134	NEFL	neurofilament, light polypeptide
7,29	5,71	-3	0,0018	0,0495	ZNF483	zinc finger protein 483
9,37	7,79	-3	0,0079	0,1161	CCNE2	cyclin E2
10,68	9,11	-2,97	0,0051	0,0909	ATP1B3	ATPase, Na+/K+ transporting, beta 3 polypeptide
11,61	10,06	-2,95	0,001	0,0351	UHMK1	U2AF homology motif (UHM) kinase 1
10,39	8,84	-2,94	8,80E-05	0,0088	DNAJC19	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 19
8,23	6,67	-2,94	0,0117	0,1466	HSD17B7	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7
13,98	12,44	-2,91	0,0006	0,026	CNN3	calponin 3, acidic
14,94	13,41	-2,9	0,0041	0,0805	BZW1	basic leucine zipper and W2 domains 1
9,44	7,91	-2,88	3,85E-05	0,0056	CHAF1B	chromatin assembly factor 1, subunit B (p60)
11,52	9,99	-2,88	0,0001	0,0101	STXBP5	syntaxin binding protein 5 (tomosyn)
11,06	9,55	-2,86	1,06E-05	0,0027	SLC35F5	solute carrier family 35, member F5
10,86	9,35	-2,86	0,0078	0,1159	ZFAND1	zinc finger, AN1-type domain 1
8,66	7,17	-2,82	0,0004	0,0218	ARHGAP11B	Rho GTPase activating protein 11B
10,73	9,23	-2,82	0,0071	0,1087	ADAMT59	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 9
12,61	11,12	-2,81	1,02E-05	0,0027	PANK3	pantothenate kinase 3
8,38	6,89	-2,81	3,45E-05	0,0054	MTX3	metaxin 3
9,72	8,24	-2,81	0,0271	0,2328	UTP15	UTP15, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog (S. cerevisiae)
11,3	9,82	-2,8	5,71E-06	0,0021	C5orf24	chromosome 5 open reading frame 24
7,72	6,25	-2,78	1,18E-05	0,0028	ZNF536	
7,89	6,42	-2,77	0,0099	0,133	BLOC1S5	biogenesis of lysosomal organelles complex-1, subunit 5, muted
7,11	5,65	-2,76	0,0062	0,1016	SLC25A43	solute carrier family 25, member 43
7,79	6,33	-2,75	9,85E-06	0,0027	RNF152	ring finger protein 152
14,43	12,97	-2,74	2,66E-06	0,0012	EIF4EBP2	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 2
8,51	7,06	-2,74	0,0006	0,026	XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis, E3 ubiquitin protein ligase
10,12	8,67	-2,73	0,0059	0,0984	CDCA7	cell division cycle associated 7
9,04	7,6	-2,73	0,0425	0,2918	TMEM19	transmembrane protein 19
9,54	8,1	-2,72	1,18E-05	0,0028	MEAF6	MYST/Esa1-associated factor 6
9,47	8,02	-2,72	6,81E-05	0,0074	TUB	tubby bipartite transcription factor
7,73	6,29	-2,72	0,0016	0,0466	RBMS1	Memczak2013 ALT_ACCEPTOR, ALT_DONOR, coding, intronic best transcript NM_016836
10,47	9,04	-2,71	5,28E-06	0,002	ATP7A	ATPase, Cu++ transporting, alpha polypeptide
8,43	7	-2,7	7,66E-07	0,0007	LZTF1	leucine zipper transcription factor like 1
7,86	6,43	-2,7	0,0023	0,0578	HIST1H4L	histone cluster 1, H4l
10,51	9,09	-2,69	0,0004	0,0204	ZNF330	zinc finger protein 330
8,65	7,23	-2,68	0,0011	0,0366	FHL3	four and a half LIM domains 3
11,3	9,87	-2,68	0,0076	0,1139	FAM72D	family with sequence similarity 72, member D
8,92	7,5	-2,67	0,0014	0,0437	ISL1	Transcript identified by AceView, Entrez Gene ID(s) 3670
11,49	10,07	-2,67	0,0016	0,0465	ZNF664	zinc finger protein 664
9,54	8,12	-2,67	0,0029	0,0657	CLPTM1L	CLPTM1-like
7,7	6,28	-2,67	0,0088	0,1233	CMTM4	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 4
8,42	7	-2,67	0,0113	0,1443	SLC38A11	solute carrier family 38, member 11
9,67	8,26	-2,66	0,0002	0,0138	TOR1AIP2	torsin A interacting protein 2
10,03	8,62	-2,66	0,022	0,2074	CDC7	cell division cycle 7
7,76	6,36	-2,65	0,0051	0,0909	HDAC9	Jeck2013 ALT_ACCEPTOR, ALT_DONOR, coding, INTERNAL, intronic best transcript NM_178423
10,41	9,01	-2,64	1,26E-06	0,0008	MTAP	methylthioadenosine phosphorylase
9,39	8	-2,62	0,0006	0,0259	GPR137C	G protein-coupled receptor 137C
17,13	15,74	-2,62	0,0023	0,0576	MYCN	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog
11,69	10,31	-2,61	0,0083	0,1198	FAM72B	family with sequence similarity 72, member B
7,66	6,28	-2,59	9,85E-05	0,0096	HIST1H4A	histone cluster 1, H4a
9,36	7,99	-2,59	0,0007	0,0297	ENC1	ectodermal-neural cortex 1 (with BTB domain)
7,87	6,5	-2,59	0,0084	0,1198	ZNF268	zinc finger protein 268
11,17	9,8	-2,58	6,43E-06	0,0022	ARAF	A-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
12,01	10,65	-2,57	4,69E-05	0,0061	AMOTL1	angiominin like 1
11,52	10,16	-2,57	0,0004	0,0208	JAZF1	JAZF zinc finger 1
14,8	13,44	-2,57	0,0014	0,0438	NRAS	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
9,24	7,88	-2,56	3,67E-06	0,0015	XRN1	5-3 exoribonuclease 1
7,13	5,77	-2,56	0,0002	0,0128	SLC43A1	solute carrier family 43 (amino acid system L transporter), member 1
5,15	3,8	-2,55	0,0006	0,0257	NDUFAF6	NADH dehydrogenase (ubiquinone) complex I, assembly factor 6
12,65	11,3	-2,55	0,003	0,0671	RFC3	replication factor C subunit 3
11,59	10,24	-2,55	0,0049	0,0885	GTF3C2	general transcription factor IIIC subunit 2
7,8	6,45	-2,54	2,40E-05	0,0044	COL6A3	collagen, type VI, alpha 3
8,2	6,86	-2,53	0,0002	0,0149	FAM217B	family with sequence similarity 217, member B
6,72	5,38	-2,53	0,0003	0,0189	GLUD2	glutamate dehydrogenase 2
6,19	4,85	-2,53	0,0047	0,0863	FAM63B	family with sequence similarity 63, member B
11,19	9,86	-2,52	0,0001	0,0098	C12orf75	chromosome 12 open reading frame 75
8,05	6,72	-2,52	0,0007	0,028	DRAM1	DNA-damage regulated autophagy modulator 1
10,4	9,06	-2,52	0,0043	0,0817	QTRTD1	queuine tRNA-ribosyltransferase domain containing 1
10,58	9,25	-2,52	0,0427	0,2931	FILIP1L	filamin A interacting protein 1-like
11,91	10,58	-2,51	0,0079	0,1167	FAM72A	family with sequence similarity 72, member A
9,63	8,31	-2,51	0,0127	0,1532	CUL4A	Memczak2013 ALT_ACCEPTOR, ALT_DONOR, coding, INTERNAL, NM_001008895
11,26	9,94	-2,5	8,51E-05	0,0087	RBBP4	retinoblastoma binding protein 4
5,99	4,67	-2,5	0,0048	0,0871	ST3GAL2	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 2
8,58	7,26	-2,5	0,0448	0,2986	E2F8	E2F transcription factor 8
7,28	5,97	-2,49	0,0004	0,0209	CTBP2	Transcript identified by AceView, Entrez Gene ID(s) 1488
16,14	14,82	-2,49	0,0239	0,2166	MSMO1	methylsterol monoxygenase 1
10,41	9,09	-2,48	2,04E-05	0,0041	BIN1	bridging integrator 1
6,81	5,5	-2,48	0,0006	0,0272	HS3ST3A1	Jeck2013 ALT_ACCEPTOR, ALT_DONOR, coding, intronic best transcript NM_006042
10,48	9,17	-2,48	0,0021	0,0542	ITPR1L1	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor interacting protein-like 1
10,08	8,77	-2,48	0,0061	0,1003	HIST1H3G	histone cluster 1, H3g
10,82	9,51	-2,47	0,003	0,0663	HIST1H4I	histone cluster 1, H4i
5,89	4,58	-2,47	0,0054	0,0938	PTPRB	protein tyrosine phosphatase, receptor type, B
6,26	4,97	-2,45	6,07E-05	0,0069	GOLGA8K; ULK4P1	golgin A8 family, member K; ULK4 pseudogene 1
11,01	9,71	-2,45	7,44E-05	0,0079	FAM102B	family with sequence similarity 102, member B
11,63	10,34	-2,45	0,0048	0,0875	ARF6	ADP-ribosylation factor 6
5,95	4,66	-2,45	0,0106	0,1392	BACH2	BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2
8,19	6,89	-2,45	0,013	0,1556	ZDBF2	zinc finger, DBF-type containing 2
9,78	8,5	-2,44	0,0002	0,0142	KCNH8	potassium channel, voltage gated eag related subfamily H, member 8
6,83	5,54	-2,44	0,0059	0,0981	ZNF620	zinc finger protein 620
12,32	11,03	-2,44	0,0193	0,1942	SEMA3C	sema domain, immunoglobulin domain, short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C
11,55	10,28	-2,43	0,005	0,0891	GRPEL1	GrpE-like 1, mitochondrial (E. coli)

9,43	8,15	-2,43	0,0191	0,1936	GGA2	golgi-associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 2
11,2	9,92	-2,42	0,0046	0,0853	ERLIN1	ER lipid raft associated 1
11,23	9,96	-2,4	0,0021	0,0545	EDNRA	endothelin receptor type A
13,82	12,56	-2,4	0,0152	0,1708	NAA50	N(alpha)-acetyltransferase 50, NatE catalytic subunit
7,49	6,23	-2,4	0,0376	0,2748	PHACTR1	phosphatase and actin regulator 1
12,21	10,95	-2,39	3,93E-05	0,0056	CBX1	chromobox homolog 1
10,46	9,2	-2,39	0,0002	0,015	SENP5	SUMO1/sentrin specific peptidase 5
6,5	5,25	-2,39	0,0003	0,016	AK4	adenylate kinase 4
8,11	6,85	-2,39	0,0079	0,1161	FAM122B	family with sequence similarity 122B
13,31	12,05	-2,39	0,0381	0,2767	SMYD3	SET and MYND domain containing 3
9,5	8,26	-2,38	3,92E-05	0,0056	N4BP2	NEDD4 binding protein 2
11,44	10,19	-2,38	4,53E-05	0,006	TET1	tet methylcytosine dioxygenase 1
6,9	5,64	-2,38	0,0003	0,016	VSTM4	V-set and transmembrane domain containing 4
13,16	11,91	-2,38	0,0023	0,0576	HIST1H2BG	histone cluster 1, H2bg
10,8	9,55	-2,37	0,0006	0,0274	HIST1H2AB	histone cluster 1, H2ab
7,76	6,51	-2,37	0,0065	0,1045	HIST1H2BL	histone cluster 1, H2bl
9,99	8,74	-2,37	0,0099	0,1335	TSPYL5	TSPY-like 5
11,55	10,3	-2,37	0,0218	0,2063	PIGW	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class W
12,22	10,98	-2,36	3,48E-05	0,0054	ATP11C	ATPase, class VI, type 11C
12,9	11,66	-2,36	0,0001	0,01	CREB5	cAMP responsive element binding protein 5
6,25	5,01	-2,36	0,0002	0,0149	KCTD12	potassium channel tetramerization domain containing 12
8,43	7,18	-2,36	0,0005	0,0248	FMN1	formin 1
7,62	6,38	-2,36	0,0019	0,052	TMEM204	transmembrane protein 204
9,79	8,55	-2,36	0,0024	0,0585	HIST1H2BI	histone cluster 1, H2bi
12,61	11,37	-2,36	0,0027	0,0621	BLOC1S6	biogenesis of lysosomal organelles complex-1, subunit 6, pallidin
10,09	8,85	-2,36	0,0493	0,3103	RRP1B	ribosomal RNA processing 1B
11,29	10,05	-2,35	2,52E-06	0,0012	RPS6KA3	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3
15,16	13,93	-2,35	0,0003	0,0189	HNRNPF	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F
7,06	5,83	-2,35	0,0004	0,0208	CHST11	Transcript Identified by AceView, Entrez Gene ID(s) 50515
10,6	9,36	-2,35	0,0009	0,0331	AAGAB	alpha- and gamma-adaptin binding protein
12,82	11,59	-2,35	0,0356	0,2665	NEMP1	nuclear envelope integral membrane protein 1
12,2	10,97	-2,35	0,046	0,3026	AFF1	AF4/FMR2 family, member 1
10,04	8,81	-2,34	0,0211	0,2032	CCNDBP1	cyclin D-type binding-protein 1
16,16	14,93	-2,34	0,0469	0,3042	MLLT11	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 11
11,38	10,16	-2,33	0,0002	0,0153	MGME1	mitochondrial genome maintenance exonuclease 1
13,19	11,97	-2,33	0,0006	0,025	JAM3	junctional adhesion molecule 3
14,57	13,35	-2,33	0,0009	0,0331	SMAD5	SMAD family member 5
8,16	6,95	-2,32	0,0002	0,0137	ZNF718	zinc finger protein 718
6,67	5,45	-2,32	0,0012	0,0391	EDN3	endothelin 3
6,85	5,63	-2,32	0,0013	0,0427	ZNF26	zinc finger protein 26
11,58	10,37	-2,32	0,0027	0,0621	NRP1	neuropilin 1
15,65	14,43	-2,32	0,0226	0,2111	EML4	echinoderm microtubule associated protein like 4
9,05	7,84	-2,32	0,0273	0,2332	GINS4	GINS complex subunit 4 (Slid5 homolog)
12,08	10,87	-2,31	2,13E-05	0,0042	DCAF16	DDB1 and CUL4 associated factor 16
11,62	10,41	-2,31	0,0042	0,0815	ITGAV	integrin alpha V
7,6	6,4	-2,31	0,019	0,1928	ROR1-AS1	ROR1 antisense RNA 1
7,49	6,28	-2,3	0,0002	0,0133	EDEM1	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1
7,74	6,54	-2,3	0,0016	0,047	PPM1E	Transcript Identified by AceView, Entrez Gene ID(s) 22843
14,78	13,57	-2,3	0,0041	0,0803	SCD	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)
8,55	7,35	-2,29	0,0065	0,1045	FNTB	farnesyltransferase, CAAX box, beta
11,25	10,06	-2,29	0,0091	0,1264	FYTD1	forty-two-three domain containing 1
7,44	6,25	-2,29	0,0182	0,1886	CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4
8,43	7,24	-2,29	0,0368	0,2719	SULT1C4	sulfotransferase family 1C member 4
6,67	5,48	-2,28	0,0002	0,0137	CTSF	cathepsin F
11,45	10,26	-2,28	0,0461	0,3028	CDC37; MIR1181	cell division cycle 37; microRNA 1181
12,91	11,73	-2,27	0,0003	0,0181	SEMA3A	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3A
13,12	11,93	-2,27	0,0018	0,0506	HIST1H2BH	histone cluster 1, H2bh
9,93	8,75	-2,27	0,0026	0,0617	DZIP1	DAZ interacting zinc finger protein 1
15,21	14,03	-2,27	0,0099	0,1335	DKK1	dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1
12,96	11,78	-2,27	0,021	0,2027	DTL	denticleless E3 ubiquitin protein ligase homolog (Drosophila)
7,08	5,9	-2,26	4,20E-05	0,0058	THBS1	thrombospondin 1
9,06	7,89	-2,26	0,0033	0,0701	NAP1L1	Memczak2013 ALT_ACCEPTOR, ALT_DONOR, coding, intronic best transcript NM_139207
7,17	5,99	-2,26	0,0204	0,1999	ZNF410	zinc finger protein 410
7,27	6,09	-2,26	0,0224	0,2093	HEG1	heart development protein with EGF-like domains 1
7,88	6,7	-2,26	0,0315	0,2505	SLC26A2	solute carrier family 26 (anion exchanger), member 2
9,49	8,32	-2,25	6,62E-06	0,0022	RCL1	RNA terminal phosphate cyclase-like 1
10,33	9,16	-2,25	0,0044	0,0824	SNX25	sorting nexin 25
7,3	6,12	-2,25	0,0125	0,1519	ASAP1	Memczak2013 ALT_ACCEPTOR, ALT_DONOR, coding, INTERNAL, NM_018482
11,92	10,75	-2,24	2,07E-05	0,0041	PM20D2	peptidase M20 domain containing 2
13,63	12,46	-2,24	0,0013	0,0426	ERGIC1	endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment 1
6,63	5,47	-2,23	4,54E-05	0,006	PLPP4	phospholipid phosphatase 4
9,44	8,28	-2,23	0,0002	0,0152	DNAJC12	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 12
9,19	8,04	-2,23	0,0002	0,0156	SUSD5	sushi domain containing 5
10,78	9,62	-2,23	0,0004	0,0204	PTAR1	protein prenyltransferase alpha subunit repeat containing 1
9,89	8,73	-2,23	0,0004	0,0207	RNF144A	ring finger protein 144A
8,12	6,97	-2,23	0,0005	0,0242	ZNF587B	zinc finger protein 587B
10,09	8,93	-2,23	0,0016	0,0473	TBC1D15	TBC1 domain family, member 15
11,35	10,19	-2,23	0,0022	0,0566	SCFD2	sec1 family domain containing 2
8,06	6,91	-2,23	0,0063	0,1025	CPD	carboxypeptidase D
5,56	4,4	-2,23	0,0123	0,1513	HNRNPK	Zhang2013 ALT_ACCEPTOR, ALT_DONOR, coding, INTERNAL, intronic, NM_002140
11,22	10,07	-2,23	0,0461	0,3028	HIST2H3A; HIST2H3C	histone cluster 2, H3a; histone cluster 2, H3c
10,99	9,84	-2,22	0,0009	0,0338	WNK1	WNK lysine deficient protein kinase 1
6,52	5,37	-2,22	0,0012	0,0393	SSPN	sarcospan
11,98	10,83	-2,21	1,55E-05	0,0035	DIEXF	digestive organ expansion factor homolog (zebrafish)
11,18	10,04	-2,21	1,78E-05	0,0038	CD46	CD46 molecule, complement regulatory protein
12,35	11,2	-2,21	9,18E-05	0,0091	GOLT1B	golgi transport 1B
9,15	8,01	-2,21	0,0002	0,0132	DCAF4	DDB1 and CUL4 associated factor 4
5,24	4,1	-2,21	0,0002	0,0152	CHRFAM7A	CHRNA7 (cholinergic receptor, nicotinic, a7 exons 5-10) and FAM7A fusion
10,2	9,05	-2,21	0,0032	0,0688	DDX11	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box helicase 11
12,34	11,2	-2,2	8,18E-06	0,0024	MAN1A2	mannosidase, alpha, class 1A, member 2
9,21	8,08	-2,2	1,02E-05	0,0027	MTMR6	myotubularin related protein 6
13,52	12,39	-2,2	0,0158	0,1752	SLC6A8	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 8
12,51	11,37	-2,2	0,0159	0,1758	MAK16	MAK16 homolog
4,63	3,5	-2,19	4,71E-05	0,0061	CDKAL1	Jeck2013 ALT_ACCEPTOR, ALT_DONOR, coding, intronic best transcript NM_017774
7,19	6,06	-2,19	6,04E-05	0,0069	TMEM241	transmembrane protein 241
6,41	5,28	-2,19	0,0026	0,0613	IKBIP	IKKB interacting protein
11,11	9,97	-2,19	0,0035	0,0737	ZAK; pk	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase MLT
12,61	11,48	-2,19	0,0039	0,0771	AGA	aspartylglucosaminidase
14,03	12,9	-2,19	0,0072	0,11	FDFT1	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1
8,58	7,45	-2,19	0,0189	0,1924	SLC43A3	solute carrier family 43, member 3

13,19	12,06	-2,19	0,0217	0,2058	TFAM	transcription factor A, mitochondrial
5,99	4,86	-2,18	0,0003	0,016	TAS2R3	taste receptor, type 2, member 3
9,9	8,78	-2,18	0,0005	0,0244	HIST1H4D	histone cluster 1, H4d
11,34	10,22	-2,17	5,60E-05	0,0066	POMK	protein-O-mannose kinase
6,97	5,85	-2,17	0,0001	0,0102	GAREM2	GRB2 associated regulator of MAPK1 2
15,02	13,9	-2,17	0,0009	0,0331	PTGER2	prostaglandin E receptor 2
13,54	12,43	-2,16	3,90E-05	0,0056	GAL	galanin/GMAP prepropeptide
10,71	9,6	-2,16	6,80E-05	0,0074	ZDHHC2	zinc finger, DHHC-type containing 2
7,6	6,49	-2,16	0,0003	0,0187	MOAP1	modulator of apoptosis 1
9,73	8,61	-2,16	0,0013	0,041	GNL3; SNORD19B	guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar); small nucleolar RNA, C/D box 19B
9,63	8,52	-2,16	0,0017	0,0486	FAM208A	family with sequence similarity 208, member A
7,87	6,76	-2,16	0,0032	0,0701	NEMP2	nuclear envelope integral membrane protein 2
12,96	11,85	-2,16	0,0051	0,0902	N4BP1	NEDD4 binding protein 1
8,69	7,58	-2,16	0,0248	0,2205	CCDC136	coiled-coil domain containing 136
9,28	8,17	-2,16	0,0401	0,2834	LDLR; MIR6886	low density lipoprotein receptor; microRNA 6886
7,79	6,69	-2,15	0,0009	0,0333	DUSP16	dual specificity phosphatase 16
7,13	6,02	-2,15	0,0018	0,0507	HBEGF	heparin-binding EGF-like growth factor
10,83	9,72	-2,15	0,0061	0,0999	LRRC8B	leucine rich repeat containing 8 family, member B
14,57	13,47	-2,15	0,0142	0,1646	FAM60A	family with sequence similarity 60, member A
7,92	6,82	-2,15	0,0185	0,1909	METTL1	methyltransferase like 1
11,28	10,18	-2,14	0,0002	0,0149	FAM111B	family with sequence similarity 111, member B
9,95	8,85	-2,14	0,0018	0,0495	BDP1	B double prime 1, subunit of RNA polymerase III transcription initiation factor IIIB
6,34	5,24	-2,14	0,0023	0,057	ASCL1	achaete-scute family bHLH transcription factor 1
8,62	7,53	-2,14	0,0122	0,1504	LRRC17	leucine rich repeat containing 17
7,21	6,12	-2,13	0,0004	0,0198	TMEM216	transmembrane protein 216
9,58	8,49	-2,13	0,0005	0,0248	MOB1B	MOB kinase activator 1B
10,5	9,41	-2,13	0,0009	0,0327	ZBTB10	zinc finger and BTB domain containing 10
8,06	6,97	-2,13	0,0016	0,0473	PRKCA	Jeck2013 ALT_ACCEPTOR, ALT_DONOR, coding, intronic best transcript NM_002737
5,99	4,9	-2,12	0,0001	0,0099	EXT1; spawla	Jeck2013 ALT_ACCEPTOR, ALT_DONOR, coding, intronic best transcript NM_000127
11,45	10,37	-2,12	0,0003	0,0163	HELLS	helicase, lymphoid-specific
8,9	7,81	-2,12	0,0003	0,019	CYB561A3	cytochrome b561 family, member A3
13,57	12,48	-2,12	0,0143	0,1653	CEP44	centrosomal protein 44kDa
9,85	8,77	-2,11	4,07E-05	0,0057	SLC4A7	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 7
12,17	11,09	-2,11	5,09E-05	0,0063	AURKA	aurora kinase A
5,79	4,72	-2,11	0,0005	0,022	C1orf198	chromosome 1 open reading frame 198
10,07	8,99	-2,11	0,0005	0,0237	EXOSC5	exosome component 5
12,08	11	-2,11	0,0008	0,0306	FOXJ3	forkhead box J3
11,92	10,85	-2,11	0,001	0,035	TMTC3	transmembrane and tetratricopeptide repeat containing 3
7,48	6,4	-2,11	0,0014	0,0437	ATPAF1	ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1
10,56	9,48	-2,11	0,0024	0,0582	CCDC102B	coiled-coil domain containing 102B
8,88	7,81	-2,11	0,0058	0,0969	TDG	thymine DNA glycosylase
11,9	10,82	-2,11	0,0412	0,2877	PARP1	poly(ADP-ribose) polymerase 1
6,47	5,4	-2,1	0,0005	0,0245	GPR75	G protein-coupled receptor 75
9,25	8,19	-2,1	0,0018	0,0495	NPM1	Zhang2013 ALT_ACCEPTOR, ALT_DONOR, coding, intronic best transcript NM_002520
9,31	8,24	-2,1	0,0215	0,205	BRCA1	BRCA1 associated RING domain 1
13,08	12,01	-2,1	0,0378	0,2755	FHL1	four and a half LIM domains 1
8,62	7,55	-2,1	0,0383	0,277	ZNF700	zinc finger protein 700
7,56	6,48	-2,1	0,0416	0,289	SEMA5A	sema domain, seven thrombospondin repeats (type 1 and type 1-like) (semaphorin) 5A
6,92	5,86	-2,09	0,0001	0,0099	PLEKHGA6	Transcript Identified by AceView, Entrez Gene ID(s) 22874
11,51	10,44	-2,09	0,0007	0,0291	LDLRAD3	low density lipoprotein receptor class A domain containing 3
5,25	4,19	-2,08	5,18E-05	0,0063	EVA1A	eva-1 homolog A (C. elegans)
9,51	8,45	-2,08	0,0018	0,0495	PPTC7	PPTC7 protein phosphatase homolog
6,73	5,67	-2,08	0,0129	0,1552	FAM27E3	family with sequence similarity 27, member E3
13,18	12,12	-2,08	0,0267	0,2309	PTPRK	protein tyrosine phosphatase, receptor type, K
11,23	10,17	-2,08	0,0303	0,2455	LMO4	LIM domain only 4
12,71	11,65	-2,08	0,034	0,2603	SPECC1L	sperm antigen with calponin homology and coiled-coil domains 1-like
6,63	5,58	-2,07	0,0004	0,0201	CD3EAP	CD3e molecule, epsilon associated protein
10,72	9,68	-2,06	7,78E-06	0,0024	ITPR1	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 1
12,01	10,97	-2,06	2,06E-05	0,0041	TMEM237	transmembrane protein 237
11,05	10,01	-2,06	5,16E-05	0,0063	MEF2A	myocyte enhancer factor 2A
8,49	7,45	-2,06	0,0012	0,0403	SCN3A	sodium channel, voltage gated, type III alpha subunit
7,68	6,64	-2,06	0,0074	0,1123	MSH5; MSH5-SAPCD1	mutS homolog 5; MSH5-SAPCD1 readthrough; suppressor APC domain containing 1
6,68	5,64	-2,06	0,0186	0,1914	CCDC3	coiled-coil domain containing 3
11,04	10,01	-2,05	0,0024	0,0582	WDR36	WD repeat domain 36
8,76	7,73	-2,05	0,0038	0,0764	LHFP2L	lipoma HMGIC fusion partner-like 2
9,51	8,48	-2,05	0,0305	0,2461	UBR7	ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 7 (putative)
9,57	8,54	-2,04	0,0002	0,0149	PLXNA4	plexin A4
10,58	9,55	-2,04	0,0007	0,0282	SOC35	suppressor of cytokine signaling 5
7,26	6,23	-2,04	0,0012	0,0393	TPM2	tropomyosin 2 (beta)
10,74	9,72	-2,04	0,0038	0,077	PLAT	plasminogen activator, tissue
11,87	10,85	-2,03	0,0002	0,0129	RIF1	replication timing regulatory factor 1
12,81	11,79	-2,03	0,0016	0,047	FBXO8	F-box protein 8
6	4,98	-2,03	0,0019	0,0512	RPL7A	ribosomal protein L7a
4,89	3,87	-2,03	0,0021	0,0545	PHACTR2	Jeck2013 ALT_ACCEPTOR, ALT_DONOR, coding, intronic best transcript NM_001100164
8,63	7,6	-2,03	0,0052	0,0913	CHURC1-FNTB	CHURC1-FNTB readthrough
6,07	5,05	-2,03	0,023	0,2122	QSOX2	quiescin Q6 sulfhydryl oxidase 2
9,64	8,62	-2,03	0,0286	0,238	MRPS10	mitochondrial ribosomal protein S10
11,2	10,18	-2,03	0,0434	0,2943	ACAT2	acetyl-CoA acetyltransferase 2
8,1	7,09	-2,02	0,0002	0,0152	DPCD	deleted in primary ciliary dyskinesia homolog (mouse)
14,16	13,14	-2,02	0,0004	0,0214	LUZP6; MTPN	leucine zipper protein 6; myotrophin
13,59	12,57	-2,02	0,0011	0,0363	NOLC1	nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1
11,05	10,03	-2,02	0,0017	0,0485	SCPEP1	serine carboxypeptidase 1
9,57	8,56	-2,02	0,0039	0,0777	IER2	immediate early response 2
7,4	6,39	-2,02	0,0108	0,1402	RPL5	Memczak2013 ALT_ACCEPTOR, ALT_DONOR, coding, INTERNAL, NM_000969
5,26	4,26	-2,01	0,0001	0,0105	TAS2R5	taste receptor, type 2, member 5
6,13	5,12	-2,01	0,0003	0,0176	APLNR	apelin receptor
8,77	7,77	-2,01	0,0005	0,0226	BMS1P20; IGLV1-51/52	BMS1 ribosome biogenesis factor pseudogene 20; immunoglobulin lambda variable 1-51
11,14	10,13	-2,01	0,0027	0,0627	C7orf49	chromosome 7 open reading frame 49
7,88	6,88	-2,01	0,0271	0,2332	KLHL2	kelch-like family member 2
11,43	10,43	-2,01	0,0445	0,2976	CENPO	centromere protein O
9,84	8,84	-2	0,0002	0,0142	ICE1	interactor of little elongation complex ELL subunit 1

Upregulated genes CHLA-90 cells

shNSC (log2)	shERKS_1 (log2)	Fold Change	P-val	FDR P-val	Gene Symbol	Description
7,75	11,69	15,39	1,55E-10	9,51E-08	PVRL1	poliovirus receptor-related 1 (herpesvirus entry mediator C)
7,38	10,93	11,77	1,15E-10	7,71E-08	MAPRE3	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 3
5,75	8,85	8,55	3,06E-08	3,42E-06	FBRS1	fibrosin-like 1
10,98	13,98	7,99	9,07E-10	2,99E-07	DYNLRB1	dynein, light chain, roadblock-type 1
8,82	11,82	7,97	1,74E-09	4,60E-07	PLPPR2	phospholipid phosphatase related 2
6,78	9,65	7,27	2,26E-05	0,0005	ADRBK1	adrenergic, beta, receptor kinase 1
3,98	6,76	6,88	4,12E-05	0,0008	DTNA	Transcript Identified by AceView, Entrez Gene ID(s) 1837
5,65	8,37	6,6	8,38E-10	2,81E-07	EPB41L4A	erythrocyte membrane protein band 4.1 like 4A
7,5	10,09	6,01	2,16E-10	1,06E-07	SEMA3A	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3A
8,17	10,75	5,96	5,90E-09	1,10E-06	SFXN3	sideroflexin 3
7,38	9,92	5,78	9,74E-09	1,57E-06	HCN2	hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated potassium channel 2
7,39	9,84	5,47	7,41E-06	0,0002	PIK3R2; IFI30	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 2 (beta); interferon, gamma-inducible protein 30
5,58	7,99	5,33	6,49E-07	3,41E-05	BHLHE40	basic helix-loop-helix family, member e40
9,51	11,92	5,31	1,97E-09	5,10E-07	FKBP14	FK506 binding protein 14
8,03	10,42	5,23	9,93E-10	3,18E-07	ATG4D	autophagy related 4D, cysteine peptidase
6,79	9,18	5,23	2,21E-08	2,78E-06	MAP3K13	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 13
3,94	6,23	4,92	7,96E-06	0,0002	SHC4	SHC (Src homology 2 domain containing) family, member 4
11,77	14,05	4,85	1,12E-09	3,33E-07	M6PR	mannose-6-phosphate receptor (cation dependent)
7,54	9,81	4,8	6,47E-06	0,0002	CCDC181	coiled-coil domain containing 181
9,16	11,41	4,73	4,58E-07	2,63E-05	PBX2	pre-B-cell leukemia homeobox 2
7,29	9,51	4,65	6,29E-08	5,94E-06	DOT1L	DOT1-like histone H3K79 methyltransferase
4,84	7,06	4,65	6,37E-07	3,36E-05	PIK3C2B	phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase, catalytic subunit type 2 beta
11,8	13,99	4,59	7,48E-09	1,32E-06	CELF2	CUGBP, Elav-like family member 2
9,32	11,5	4,55	9,97E-08	8,22E-06	LIMK1	LIM domain kinase 1
10,49	12,67	4,53	1,71E-08	2,29E-06	DTNA	dystrobrevin, alpha
6,54	8,72	4,52	9,40E-07	4,57E-05	MED19	mediator complex subunit 19
8,6	10,76	4,49	9,03E-09	1,47E-06	WWP2	WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2
6,04	8,2	4,46	1,71E-08	2,29E-06	ARRDC4	arrestin domain containing 4
9,39	11,53	4,43	1,15E-08	1,71E-06	RNF182	ring finger protein 182
8,38	10,52	4,4	9,20E-08	7,77E-06	CMTM3	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 3
9,77	11,9	4,38	2,61E-07	1,68E-05	AKIRIN1	akirin 1
7,9	10,03	4,37	4,99E-06	0,0002	DLG4	discs, large homolog 4 (Drosophila)
9,48	11,6	4,36	8,40E-08	7,30E-06	KMT2D	lysine (K)-specific methyltransferase 2D
3,58	5,7	4,34	2,69E-07	1,70E-05	CFAP206	cilia and flagella associated protein 206
5,56	7,67	4,32	5,91E-07	3,20E-05	NF2	neurofibromin 2 (merlin)
8,36	10,47	4,31	1,97E-06	8,05E-05	DAP	death-associated protein
7,22	9,32	4,28	2,84E-07	1,79E-05	HTATIP2	HIV-1 Tat interactive protein 2
7,53	9,63	4,28	1,47E-06	6,48E-05	BLVRB	biliverdin reductase B
8,12	10,22	4,27	1,92E-08	2,51E-06	PIP5K1C	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, gamma
7,27	9,35	4,23	4,57E-07	2,63E-05	SLC17A5	solute carrier family 17 (acidic sugar transporter), member 5
5,02	7,1	4,22	7,93E-06	0,0002	PLEKHA2	pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 2
9,56	11,63	4,2	1,60E-08	2,22E-06	NECAP1	NECAP endocytosis associated 1
7,04	9,08	4,11	1,81E-06	7,53E-05	API51	adaptor-related protein complex 1 sigma 1 subunit
6,5	8,54	4,11	1,51E-05	0,0004	KIAA1324	KIAA1324
4,08	6,1	4,06	7,81E-09	1,34E-06	ANKRD34A	ankyrin repeat domain 34A
9,95	11,97	4,06	1,01E-07	8,29E-06	MEIS3	Meis homeobox 3
10,69	12,7	4,02	2,99E-09	6,98E-07	PTBP2	polypyrimidine tract binding protein 2
7,49	9,49	4	5,03E-09	9,73E-07	GPR85	G protein-coupled receptor 85
7,56	9,53	3,91	1,74E-07	1,25E-05	NUDT19	nudix hydrolase 19
8,1	10,06	3,88	5,55E-05	0,0011	MAP1A	microtubule associated protein 1A
11,26	13,21	3,85	2,63E-07	1,68E-05	CAP2	CAP, adenylate cyclase-associated protein, 2 (yeast)
5,21	7,14	3,82	2,67E-07	1,70E-05	CDS1	CDP-diaclyglycerol synthase 1
8,96	10,89	3,82	8,48E-07	4,23E-05	ZC3H7B	zinc finger CCCH-type containing 7B
10,29	12,19	3,72	1,07E-08	1,64E-06	SHTN1	shootin 1
9,55	11,44	3,71	1,46E-08	2,10E-06	PAK4	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 4
5,69	7,59	3,71	2,83E-06	0,0001	NLGN1	neuroligin 1
10,39	12,27	3,7	4,95E-08	4,98E-06	ARL8A	ADP-ribosylation factor like GTPase 8A
7,44	9,29	3,62	8,76E-06	0,0002	POLR3GL	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide G (32kD)-like
11,71	13,57	3,61	7,29E-08	6,48E-06	ELAVL3	ELAV like neuron-specific RNA binding protein 3
5,02	6,87	3,61	2,26E-06	8,95E-05	GPER1	G protein-coupled estrogen receptor 1
7,48	9,33	3,6	4,93E-08	4,98E-06	SLITRK1	SLIT and NTRK-like family, member 1
6,56	8,41	3,6	1,55E-07	1,19E-05	ANKRD45	ankyrin repeat domain 45
5,82	7,66	3,57	3,54E-08	3,78E-06	SLC16A2	solute carrier family 16, member 2 (thyroid hormone transporter)
7	8,84	3,57	6,25E-08	5,94E-06	SLC16A7	solute carrier family 16 (monocarboxylate transporter), member 7
10,48	12,31	3,55	8,93E-07	4,41E-05	PNPLA6	patatin-like phospholipase domain containing 6
7,38	9,2	3,53	6,00E-07	3,22E-05	SLC25A30	solute carrier family 25, member 30
8,91	10,73	3,52	2,02E-05	0,0005	KLC2	kinesin light chain 2
5,74	7,55	3,5	2,07E-08	2,67E-06	CYP1A1	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1
5,98	7,78	3,5	4,56E-07	2,63E-05	PPARG	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
7,26	9,06	3,48	8,76E-07	4,34E-05	CBX6	chromobox homolog 6
7,24	9,03	3,47	2,50E-07	1,64E-05	CDKL2	cyclin-dependent kinase-like 2 (CDC2-related kinase)
10,13	11,93	3,47	3,26E-05	0,0007	ATAD2A; MIR6	GATA zinc finger domain containing 2A; microRNA 640
6,98	8,76	3,44	1,31E-08	1,93E-06	GCA	granulocin, EF-hand calcium binding protein
9,47	11,25	3,43	5,92E-07	3,20E-05	TTBK1	tau tubulin kinase 1
11,14	12,92	3,42	4,23E-07	2,47E-05	CREB5	cAMP responsive element binding protein 5
11,88	13,64	3,4	1,44E-05	0,0004	GPI	glucose-6-phosphate isomerase
4,49	6,25	3,39	9,88E-08	8,18E-06	SAMD9L	sterile alpha motif domain containing 9-like
8,35	10,1	3,37	2,33E-08	2,91E-06	ZNF543	zinc finger protein 543
9,6	11,35	3,37	2,85E-08	3,24E-06	SKIL	SKI-like proto-oncogene
6,25	8	3,37	9,03E-07	4,44E-05	SNX15	sorting nexin 15
7,51	9,26	3,37	3,70E-06	0,0001	PLA2G12A	phospholipase A2, group XIIA
8,86	10,62	3,37	7,81E-06	0,0002	JNK-interacting	mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 1 (JNK-interacting protein JIP)
12,15	13,9	3,36	4,07E-07	2,39E-05	POM121	POM121 transmembrane nucleoporin
8,46	10,19	3,33	3,59E-07	2,18E-05	MFHAS1	malignant fibrous histiocytoma amplified sequence 1
9,4	11,13	3,33	0,0007	0,0071	EPN1	epsin 1
10,01	11,74	3,32	8,38E-08	7,30E-06	PTPN21	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 21

10,51	12,23	3,31	5,52E-08	5,46E-06	GABBR1	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 1
7,93	9,66	3,31	1,01E-06	4,85E-05	CHMP2B	charged multivesicular body protein 2B
6,04	7,76	3,3	5,92E-06	0,0002	ZDHHC23	zinc finger, DHHC-type containing 23
9,54	11,25	3,27	4,97E-06	0,0002	TAPBP	TAP binding protein (tapasin)
7,82	9,53	3,25	3,63E-07	2,19E-05	MRS2	MRS2 magnesium transporter
5,95	7,65	3,24	2,37E-08	2,94E-06	AP1S3	adaptor-related protein complex 1 sigma 3 subunit
10,2	11,9	3,24	4,96E-06	0,0002	ARL2BP	ADP-ribosylation factor like GTPase 2 binding protein
11,2	12,89	3,23	3,17E-08	3,51E-06	KATNAL1	katanin p60 subunit A-like 1
5,9	7,59	3,23	1,33E-06	6,06E-05	CPEB3	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 3
7,36	9,04	3,21	4,25E-06	0,0001	GBA2	glucosidase, beta (bile acid) 2
10,39	12,07	3,2	8,16E-07	4,10E-05	RNF11	ring finger protein 11
7,11	8,78	3,19	2,24E-07	1,51E-05	KBTBD8	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 8
10,39	12,06	3,18	1,75E-07	1,25E-05	MYCBP2	MYC binding protein 2, E3 ubiquitin protein ligase
9,19	10,86	3,17	5,43E-08	5,39E-06	TRERF1	transcriptional regulating factor 1
6,81	8,47	3,17	6,61E-08	6,09E-06	CORO2A	coronin, actin binding protein, 2A
7,96	9,63	3,17	7,09E-08	6,39E-06	GABPB2	GA binding protein transcription factor, beta subunit 2
4,16	5,83	3,17	7,67E-06	0,0002	TPK1	thiamin pyrophosphokinase 1
10,86	12,52	3,16	2,28E-06	9,01E-05	TPMT	thiopurine S-methyltransferase
9,97	11,63	3,16	7,46E-05	0,0013	NACC1	nucleus accumbens associated 1, BEN and BTB (POZ) domain containing
9,93	11,58	3,14	1,08E-06	5,12E-05	DRAP1	DR1-associated protein 1 (negative cofactor 2 alpha)
9,09	10,74	3,14	2,39E-06	9,29E-05	RRM2B	ribonucleotide reductase M2 B (TP53 inducible)
8,91	10,56	3,13	1,81E-07	1,28E-05	R3HDM1	Transcript Identified by AceView, Entrez Gene ID(s) 23518
9,67	11,31	3,13	3,20E-05	0,0007	ARPC1B	actin related protein 2/3 complex subunit 1B
3,88	5,53	3,13	0,0022	0,0177	C16orf72	Memczak2013 ANTISENSE, coding, INTERNAL, intronic best transcript NM_014117
9,3	10,95	3,12	2,42E-07	1,60E-05	STMN4	stathmin-like 4
5,76	7,39	3,11	7,12E-06	0,0002	DDX58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58
9,36	10,99	3,1	1,01E-07	8,29E-06	AHR	aryl hydrocarbon receptor
8,06	9,69	3,09	3,08E-06	0,0001	TNIK	TRAF2 and NCK interacting kinase
10,35	11,98	3,09	6,38E-06	0,0002	CMPK1	cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 1, cytosolic
10,03	11,65	3,08	1,40E-06	6,28E-05	C6orf136	chromosome 6 open reading frame 136
7,67	9,28	3,05	1,30E-06	5,97E-05	USF2	upstream transcription factor 2, c-fos interacting
10,33	11,94	3,05	9,88E-06	0,0003	ARID4A	AT rich interactive domain 4A (RBP1-like)
7,02	8,63	3,04	2,39E-06	9,31E-05	DNAJC28	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 28
8,48	10,08	3,04	0,0007	0,0073	TMEM41B	transmembrane protein 41B
6,35	7,95	3,03	1,96E-07	1,35E-05	INPP4A	inositol polyphosphate-4-phosphatase type I A
9,44	11,04	3,03	2,60E-07	1,68E-05	PPP6R1	protein phosphatase 6, regulatory subunit 1
5,27	6,87	3,03	1,15E-06	5,35E-05	CAMKMT	Memczak2013 ALT_ACCEPTOR, ALT_DONOR, coding, INTERNAL, intronic best transcript NM_024766
7,8	9,39	3,02	1,71E-07	1,24E-05	DPF1	D4, zinc and double PHD fingers family 1
9	10,59	3,02	1,87E-07	1,31E-05	TMEM87B	transmembrane protein 87B
8,75	10,34	3,02	9,43E-07	4,57E-05	SYT9	synaptotagmin IX
7,93	9,52	3,02	1,42E-06	6,35E-05	ARNTL2	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 2
9,85	11,44	3,02	3,75E-06	0,0001	ELOVL4	ELOVL fatty acid elongase 4
9,17	10,76	3,02	5,17E-05	0,001	MTMR7	myotubularin related protein 7
9,71	11,3	3,01	9,81E-08	8,17E-06	RAB8B	RAB8B, member RAS oncogene family
10,85	12,44	3,01	2,51E-07	1,64E-05	NOVA1	neuro-oncological ventral antigen 1
7,9	9,49	3,01	5,88E-06	0,0002	LMLN	leishmanolysin-like (metallopeptidase M8 family)
6,35	7,94	3	1,83E-06	7,60E-05	TPPP3	tubulin polymerization-promoting protein family member 3
9,28	10,86	2,99	2,17E-07	1,47E-05	C12orf49	chromosome 12 open reading frame 49
4,52	6,09	2,98	3,49E-07	2,14E-05	GAS2L1	growth arrest-specific 2 like 1
12,79	14,37	2,98	3,89E-07	2,32E-05	KLC1	kinesin light chain 1
8,94	10,51	2,97	4,29E-07	2,49E-05	KCNH4	potassium channel, voltage gated eag related subfamily H, member 4
7,69	9,26	2,97	6,29E-07	3,36E-05	ZBTB7A	zinc finger and BTB domain containing 7A
8,73	10,3	2,97	3,24E-06	0,0001	MAPK10	mitogen-activated protein kinase 10
8,31	9,88	2,97	9,78E-05	0,0017	GNA11	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 11 (Gq class)
7,68	9,24	2,96	2,50E-07	1,64E-05	GALM	galactose mutarotase (aldose 1-epimerase)
4,33	5,9	2,96	3,76E-07	2,25E-05	LONRF3	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 3
6,87	8,44	2,96	5,68E-06	0,0002	SH2B3	SH2B adaptor protein 3
10,84	12,41	2,96	2,89E-05	0,0006	POLR3D	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide D, 44kDa
9,22	10,79	2,96	9,67E-05	0,0016	TMEM184B	transmembrane protein 184B
9,05	10,61	2,95	5,48E-07	3,02E-05	KCNH7	potassium channel, voltage gated eag related subfamily H, member 7
7,94	9,5	2,94	3,04E-07	1,90E-05	GPR180	G protein-coupled receptor 180
5,61	7,16	2,94	0,0002	0,0026	NMRK1	nicotinamide riboside kinase 1
5,83	7,38	2,93	2,66E-05	0,0006	AGTRAP	angiotensin II receptor-associated protein
11,85	13,4	2,92	9,83E-08	8,17E-06	LIX1L	limb and CNS expressed 1 like
5,02	6,56	2,91	2,81E-05	0,0006	SFRP4	secreted frizzled-related protein 4
12,69	14,22	2,9	3,56E-07	2,17E-05	RHOQ	ras homolog family member Q
12,65	14,19	2,9	5,61E-07	3,06E-05	ATP6V0C	ATPase, H+ transporting, lysosomal 16kDa, V0 subunit c
5,51	7,04	2,9	6,61E-05	0,0012	WDR31	WD repeat domain 31
9,1	10,63	2,89	1,62E-07	1,22E-05	KIAA0895	KIAA0895
8,02	9,54	2,88	1,73E-06	7,30E-05	ZBTB7B	zinc finger and BTB domain containing 7B
7,89	9,42	2,88	2,31E-06	9,04E-05	IL13RA2	interleukin 13 receptor, alpha 2
8,79	10,31	2,88	0,0001	0,0019	ATP13A2	ATPase type 13A2
10,87	12,4	2,87	3,18E-06	0,0001	PLEKHA3	pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 3
4,73	6,25	2,87	2,00E-05	0,0005	ELF1	Memczak2013 ALT_ACCEPTOR, ALT_DONOR, coding, INTERNAL, intronic best transcript NM_172373
11,14	12,65	2,85	5,55E-07	3,05E-05	ARHGAP12	Rho GTPase activating protein 12
12,93	14,44	2,85	1,50E-05	0,0004	CELF3	CUGBP, Elav-like family member 3
5,8	7,3	2,84	0,001	0,0098	NBEAL1	neurobeachin like 1
8,79	10,28	2,82	5,66E-07	3,08E-05	BCAT2	branched chain amino-acid transaminase 2, mitochondrial
9,95	11,45	2,82	4,10E-06	0,0001	NGAP1; MIR50	synaptic Ras GTPase activating protein 1; microRNA 5004
9,08	10,57	2,81	1,44E-07	1,12E-05	MDM2	MDM2 proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase
13,72	15,21	2,81	5,40E-07	2,99E-05	STXBP1	syntaxin binding protein 1
7,53	9,03	2,81	0,0054	0,0349	MTMR11	myotubularin related protein 11
11,53	13,02	2,8	3,27E-07	2,03E-05	ZBTB38	zinc finger and BTB domain containing 38
9,85	11,34	2,8	9,96E-07	4,79E-05	PPFIBP1	PTPRF interacting protein, binding protein 1 (liprin beta 1)
4,75	6,24	2,8	1,13E-06	5,29E-05	SLC9A9	solute carrier family 9, subfamily A (NHE9, cation proton antiporter 9), member 9
5,48	6,97	2,8	6,15E-06	0,0002	PANK2	pantothenate kinase 2
7,58	9,05	2,78	4,58E-05	0,0009	PITRM1	pitrilysin metallopeptidase 1
5,03	6,51	2,78	0,0002	0,0026	CASP8	caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase
7,37	8,84	2,77	8,40E-05	0,0015	KDM6B	lysine (K)-specific demethylase 6B

10,6	12,07	2,76	1,17E-05	0,0003	C20orf194	chromosome 20 open reading frame 194
7,23	8,7	2,76	0,0003	0,0035	CELF2	Transcript Identified by AceView, Entrez Gene ID(s) 10659
7,01	8,47	2,76	0,0008	0,0085	PDP2	pyruvate dehydrogenase phosphatase catalytic subunit 2
8,15	9,61	2,75	1,65E-05	0,0004	STK38L	serine/threonine kinase 38 like
10,94	12,39	2,74	1,77E-07	1,26E-05	BTB20; MIR56	zinc finger and BTB domain containing 20; microRNA 568
7,81	9,26	2,74	4,04E-07	2,39E-05	NDST3	N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 3
13,03	14,49	2,74	2,06E-06	8,31E-05	KCNH2	potassium channel, voltage gated eag related subfamily H, member 2
9,95	11,41	2,74	3,59E-06	0,0001	TRAPPC6B	trafficking protein particle complex 6B
10,29	11,73	2,73	5,14E-05	0,001	ARID3A	AT rich interactive domain 3A (BRIGHT-like)
11,98	13,42	2,7	1,49E-06	6,53E-05	DDA1	DET1 and DDB1 associated 1
8,66	10,08	2,69	2,46E-06	9,49E-05	PI15	peptidase inhibitor 15
3,35	4,78	2,68	5,68E-06	0,0002	SLITRK3	SLIT and NTRK-like family, member 3
10,29	11,71	2,68	9,71E-06	0,0003	YES1	YES proto-oncogene 1, Src family tyrosine kinase
12,16	13,58	2,67	4,78E-07	2,71E-05	STRN	striatin, calmodulin binding protein
8,45	9,86	2,67	8,65E-05	0,0015	FBXW5	F-box and WD repeat domain containing 5
12,16	13,57	2,66	1,70E-06	7,21E-05	EMP3	epithelial membrane protein 3
10,07	11,48	2,66	2,56E-06	9,76E-05	MFSD13A	major facilitator superfamily domain containing 13A
7,93	9,34	2,66	1,88E-05	0,0005	FBXL19	F-box and leucine-rich repeat protein 19
5,16	6,57	2,66	7,32E-05	0,0013	C2orf15	chromosome 2 open reading frame 15
9,9	11,31	2,65	1,61E-06	6,92E-05	CXADR	coxsackie virus and adenovirus receptor
8,69	10,1	2,65	2,09E-06	8,37E-05	KLHL12	kelch-like family member 12
7,36	8,76	2,65	3,92E-06	0,0001	SMPD1	sphingomyelin phosphodiesterase 1, acid lysosomal
8,55	9,95	2,65	4,77E-06	0,0002	PPP1R9A	protein phosphatase 1, regulatory subunit 9A
12,52	13,92	2,64	6,31E-07	3,36E-05	IDS	iduronate 2-sulfatase
12,37	13,76	2,63	5,94E-07	3,20E-05	TRIM2	tripartite motif containing 2
9,48	10,88	2,63	8,57E-07	4,26E-05	ELF1	E74-like factor 1 (ets domain transcription factor)
12,31	13,7	2,63	2,84E-06	0,0001	SECISBP2L	SECIS binding protein 2-like
7	8,4	2,63	3,44E-05	0,0007	SBK1	SH3 domain binding kinase 1
5,44	6,83	2,63	0,0001	0,002	HIP1R	huntingtin interacting protein 1 related
6,84	8,23	2,63	0,001	0,0094	ACACB	acetyl-CoA carboxylase beta
4,09	5,48	2,62	3,72E-07	2,23E-05	KIAA0040	KIAA0040
9,62	11	2,62	6,81E-07	3,51E-05	RABGAP1L	RAB GTPase activating protein 1-like
9,23	10,62	2,62	4,76E-06	0,0002	LNPEP	leucyl/cystinyl aminopeptidase
5,86	7,25	2,62	0,0002	0,0024	ANKEF1	ankyrin repeat and EF-hand domain containing 1
9,34	10,73	2,61	1,90E-07	1,33E-05	RAB3IP	RAB3A interacting protein
11,25	12,64	2,61	7,98E-07	4,02E-05	PARP6	poly(ADP-ribose) polymerase family member 6
8,27	9,65	2,61	2,26E-06	8,95E-05	TIPARP	TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase
5,06	6,45	2,61	9,64E-05	0,0016	SEMA4G	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semapho
8,66	10,04	2,61	0,0002	0,0028	TRAF7	TNF receptor-associated factor 7, E3 ubiquitin protein ligase
4,24	5,62	2,61	0,0005	0,0054	PLD1	phospholipase D1, phosphatidylcholine-specific
3,6	4,98	2,61	0,0012	0,0114	NADSYN1	NAD synthetase 1
3,54	4,92	2,6	5,63E-06	0,0002	RASGRP1	RAS guanyl releasing protein 1 (calcium and DAG-regulated)
9,73	11,1	2,6	5,90E-06	0,0002	FRS2	fibroblast growth factor receptor substrate 2
10,68	12,05	2,59	7,06E-06	0,0002	FBR5	fibrosin
10,64	12,01	2,59	3,64E-05	0,0008	ZDHHC16	zinc finger, DHHC-type containing 16
7,11	8,48	2,59	5,53E-05	0,0011	PPP1R12B	protein phosphatase 1, regulatory subunit 12B
10,87	12,23	2,58	1,90E-07	1,33E-05	GDE1	glycerophosphodiester phosphodiesterase 1
6,83	8,2	2,58	1,10E-06	5,17E-05	PNPLA4	patatin-like phospholipase domain containing 4
9,91	11,28	2,58	3,70E-06	0,0001	GNG12	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 12
6,17	7,54	2,58	3,37E-05	0,0007	DTNBP1	dystrobrevin binding protein 1
7,98	9,35	2,58	4,94E-05	0,001	SH3BP1; PDXP	SH3-domain binding protein 1; pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) phosphatase
8,3	9,67	2,58	0,0147	0,0733	ARHGEF11	Rho guanine nucleotide exchange factor 11
8,48	9,84	2,57	7,21E-05	0,0013	FAM73A	family with sequence similarity 73, member A
4,18	5,54	2,56	5,51E-07	3,03E-05	LRP2BP	LRP2 binding protein
9,57	10,93	2,56	6,87E-06	0,0002	KCTD13	potassium channel tetramerization domain containing 13
10,26	11,61	2,56	7,32E-06	0,0002	TMEM63B	transmembrane protein 63B
7,35	8,7	2,56	0,0008	0,0079	CDK10	cyclin-dependent kinase 10
7,63	8,98	2,56	0,0011	0,0105	SMARCD3	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 3
6,34	7,69	2,55	1,16E-06	5,38E-05	FAH	fumarylacetoacetate hydrolase (fumarylacetoacetase)
7,65	9	2,55	3,34E-06	0,0001	RAB3A	RAB3A, member RAS oncogene family
6,7	8,05	2,55	4,63E-06	0,0002	NAP3A; NIPSN	nipsnap homolog 3A (C. elegans); nipsnap homolog 3B (C. elegans)
10,24	11,59	2,55	7,43E-05	0,0013	SLC35A3	solute carrier family 35 (UDP-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) transporter), member A3
7,58	8,93	2,55	0,0034	0,0243	LIMK1	Memczak2013 ANTISENSE, CDS, coding, INTERNAL best transcript NM_001204426
6,96	8,31	2,54	6,26E-07	3,35E-05	ENPP4	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 4 (putative)
5,04	6,38	2,54	0,0008	0,0079	NX29P2; SNX29	sorting nexin 29 pseudogene 2; sorting nexin 29 pseudogene 1
9,86	11,19	2,53	4,05E-07	2,39E-05	ANK2	ankyrin 2, neuronal
5,63	6,97	2,53	3,22E-06	0,0001	KIAA1107	KIAA1107
6,5	7,83	2,53	6,08E-06	0,0002	SOX5	SRY box 5
7,48	8,82	2,53	1,31E-05	0,0003	KCTD9	potassium channel tetramerization domain containing 9
10,98	12,32	2,53	1,64E-05	0,0004	CDK16	cyclin-dependent kinase 16
8	9,34	2,53	6,57E-05	0,0012	KIF16B	kinesin family member 16B
10,81	12,15	2,53	0,0003	0,0034	MXI1	MAX interactor 1, dimerization protein
10,86	12,19	2,52	6,34E-07	3,36E-05	NCOA3	nuclear receptor coactivator 3
10,44	11,78	2,52	1,24E-06	5,69E-05	PRKAR2B	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta
7,85	9,18	2,52	1,65E-06	7,06E-05	DC186; MIR21	coiled-coil domain containing 186; microRNA 2110
7,05	8,38	2,52	5,13E-06	0,0002	ZNF772	zinc finger protein 772
10,46	11,79	2,52	7,13E-06	0,0002	SPOPL	speckle-type POZ protein-like
10,4	11,74	2,52	1,27E-05	0,0003	VSNL1	visinin like 1
3,71	5,05	2,52	1,81E-05	0,0004	CSRNP1	cysteine-serine-rich nuclear protein 1
7,45	8,78	2,51	3,86E-06	0,0001	CERCAM	cerebral endothelial cell adhesion molecule
10,04	11,37	2,51	9,30E-06	0,0003	PIAS3	protein inhibitor of activated STAT 3
6,67	7,99	2,51	1,46E-05	0,0004	TECPR2	tectonin beta-propeller repeat containing 2
5,67	7	2,51	4,79E-05	0,001	MAML2	mastermind-like transcriptional coactivator 2
4,74	6,07	2,51	0,0003	0,0043	MAP2K7	mitogen-activated protein kinase kinase 7
10,41	11,73	2,5	7,27E-07	3,72E-05	AVL9	AVL9 homolog (S. cerevisiae)
6,27	7,59	2,5	4,44E-05	0,0009	PPIC	peptidylprolyl isomerase C (cyclophilin C)
4,35	5,67	2,5	0,0057	0,0364	GOLGA8R	golgin A8 family, member R
8,71	10,02	2,49	1,42E-06	6,33E-05	AHCYL2	adenosylhomocysteinase-like 2
5,87	7,18	2,49	1,94E-06	7,97E-05	TNKS1BP1	tankyrase 1 binding protein 1

8,13	9,45	2,49	1,32E-05	0,0003	FBXW4	F-box and WD repeat domain containing 4
12,36	13,67	2,49	1,97E-05	0,0005	KMT2C	lysine (K)-specific methyltransferase 2C
14,65	15,97	2,49	2,45E-05	0,0006	PPP1CC	protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isozyme
5,24	6,56	2,49	2,50E-05	0,0006	KCNA3	potassium channel, voltage gated shaker related subfamily A, member 3
4,73	6,04	2,49	0,0001	0,002	ALPK1	alpha kinase 1
12,8	14,11	2,48	6,77E-07	3,50E-05	GFPT1	glutamine--fructose-6-phosphate transaminase 1
8,85	10,16	2,48	1,68E-06	7,15E-05	RBMS2	RNA binding motif, single stranded interacting protein 2
12,65	13,97	2,48	1,92E-06	7,91E-05	POM121C	POM121 transmembrane nucleoporin C
8,25	9,55	2,48	2,51E-06	9,65E-05	UFL1	UFM1-specific ligase 1
10,86	12,17	2,48	6,75E-06	0,0002	CYBRD1	cytochrome b reductase 1
6,29	7,6	2,48	2,00E-05	0,0005	BICD2	bicaudal D homolog 2 (Drosophila)
6,8	8,1	2,47	2,73E-06	0,0001	NR6A1	nuclear receptor subfamily 6, group A, member 1
7,05	8,35	2,47	7,64E-05	0,0014	LCA5	Leber congenital amaurosis 5
10,91	12,21	2,46	1,34E-06	6,07E-05	RNF6	ring finger protein (C3H2C3 type) 6
6,69	7,99	2,46	0,0006	0,0061	PIK3CB	Salzman2013 ANNOTATED, CDS, coding, INTERNAL, OVCODE, OVEXON best transcript NM_006219
12,47	13,76	2,45	9,04E-07	4,44E-05	ASXL2	additional sex combs like transcriptional regulator 2
8,96	10,25	2,45	2,29E-06	9,02E-05	LAGE3	L antigen family, member 3
10,08	11,38	2,45	4,25E-06	0,0001	CNOT11	CCR4-NOT transcription complex subunit 11
9,81	11,1	2,45	5,81E-05	0,0011	SNRNP27	small nuclear ribonucleoprotein, U4/U6.U5 27kDa subunit
6,61	7,9	2,45	0,0002	0,0025	IKZF4	IKAROS family zinc finger 4
8,78	10,06	2,44	2,69E-06	0,0001	ZNF518A	zinc finger protein 518A
8,53	9,82	2,44	2,60E-05	0,0006	SMYD5	SMYD family member 5
7,35	8,64	2,44	5,38E-05	0,001	GPC2	glypican 2
8,22	9,5	2,44	7,25E-05	0,0013	PPP2R5A	protein phosphatase 2, regulatory subunit B, alpha
7,79	9,08	2,44	0,0001	0,002	BAD	BCL2-associated agonist of cell death
9,37	10,66	2,44	0,0001	0,0021	SLC2A11	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 11
5,73	7,02	2,44	0,0002	0,0031	PLEKHA7	pleckstrin homology domain containing, family A member 7
6,7	7,99	2,44	0,0005	0,0055	C1D17; MIR47	TBC1 domain family, member 17; microRNA 4750
5,33	6,61	2,43	2,65E-06	0,0001	C1orf54	chromosome 1 open reading frame 54
10,4	11,67	2,43	3,03E-06	0,0001	TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1
7,12	8,41	2,43	6,68E-06	0,0002	DUSP14	dual specificity phosphatase 14
7,2	8,48	2,43	1,20E-05	0,0003	B3GALNT2	beta-1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase 2
12,22	13,5	2,43	1,49E-05	0,0004	KLHDC3	kelch domain containing 3
9,62	10,9	2,43	0,0006	0,0061	MAN2A2	mannosidase, alpha, class 2A, member 2
10,96	12,23	2,42	2,15E-05	0,0005	TXNIP	thioredoxin interacting protein
9,96	11,23	2,42	2,15E-05	0,0005	DUSP3	dual specificity phosphatase 3
15,32	16,6	2,42	0,0002	0,0024	CAMK2N1	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1
8,07	9,34	2,41	0,0004	0,0043	CLIP2	CAP-GLY domain containing linker protein 2
8,89	10,15	2,4	2,98E-06	0,0001	FGD1	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 1
7,48	8,74	2,4	3,51E-06	0,0001	LNX2	ligand of numb-protein X 2
6,84	8,1	2,4	4,83E-06	0,0002	PHKA1	phosphorylase kinase, alpha 1 (muscle)
6,78	8,04	2,4	2,01E-05	0,0005	ARG2	arginase 2
7,3	8,56	2,4	3,31E-05	0,0007	CCDC169	coiled-coil domain containing 169
8,03	9,29	2,4	4,62E-05	0,0009	SH2D3C	SH2 domain containing 3C
8,53	9,79	2,4	0,0028	0,021	SRPK2	SRSF protein kinase 2
12,12	13,38	2,39	1,09E-06	5,12E-05	RC3H2	ring finger and CCHC-type domains 2
9,06	10,32	2,39	1,86E-05	0,0005	ATP6VOE2	ATPase, H+ transporting V0 subunit e2
9,61	10,86	2,38	4,54E-06	0,0001	BTRC	beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase
8,39	9,64	2,38	5,63E-06	0,0002	KLHL42	kelch-like family member 42
7,59	8,84	2,38	1,50E-05	0,0004	LIN28B	lin-28 homolog B (C. elegans)
7,49	8,74	2,38	1,92E-05	0,0005	SERP2	stress-associated endoplasmic reticulum protein family member 2
7,12	8,37	2,38	2,04E-05	0,0005	PARP9	poly(ADP-ribose) polymerase family member 9
7,83	9,08	2,38	4,20E-05	0,0009	MAST4	microtubule associated serine/threonine kinase family member 4
9,5	10,75	2,38	4,48E-05	0,0009	TRAPPC3	trafficking protein particle complex 3
5,29	6,54	2,38	0,0001	0,0023	ZNF658	zinc finger protein 658
5,57	6,82	2,38	0,0012	0,0112	SMIM10	small integral membrane protein 10
6,65	7,9	2,38	0,0013	0,0116	MAP4K2	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 2
11,3	12,55	2,37	1,97E-06	8,05E-05	NFAT5	nuclear factor of activated T-cells 5, tonicity-responsive
9,94	11,18	2,37	3,57E-06	0,0001	PRMT2	protein arginine methyltransferase 2
11,32	12,57	2,37	3,91E-06	0,0001	TRIM44	tripartite motif containing 44
10,05	11,3	2,37	6,14E-06	0,0002	ICA1L	islet cell autoantigen 1 like
9,49	10,73	2,37	1,30E-05	0,0003	ARFIP1	ADP-ribosylation factor interacting protein 1
7,35	8,59	2,37	9,88E-05	0,0017	IRF9	interferon regulatory factor 9
6,55	7,8	2,37	0,0002	0,0025	CARHSP1	Jeck2013 ANTISENSE, CDS, coding, INTERNAL, OVCODE, OVEXON best transcript NM_001042476
11,35	12,6	2,37	0,0003	0,0038	STC1	stanniocalcin 1
6,52	7,76	2,37	0,0004	0,0044	NPRL3	NPR3-like, GATOR1 complex subunit
4,99	6,23	2,37	0,0005	0,0056	TEC	tec protein tyrosine kinase
10,03	11,27	2,36	1,12E-05	0,0003	ARHGAP5	Rho GTPase activating protein 5
4,85	6,09	2,36	0,0158	0,0769	NAV3	neuron navigator 3
10,17	11,4	2,35	2,72E-06	0,0001	C7orf25	chromosome 7 open reading frame 25
8,78	10,02	2,35	4,86E-06	0,0002	PDXDC2P	pyridoxal-dependent decarboxylase domain containing 2, pseudogene
6,52	7,75	2,35	2,51E-05	0,0006	IL10RB	interleukin 10 receptor, beta
11,39	12,62	2,35	2,60E-05	0,0006	FAM168B	family with sequence similarity 168, member B
10,46	11,69	2,35	5,50E-05	0,0011	CERK	ceramide kinase
5,27	6,5	2,35	0,0001	0,0017	TMEM25	transmembrane protein 25
6,86	8,09	2,34	1,81E-06	7,53E-05	TTC9	tetratricopeptide repeat domain 9
10,15	11,37	2,34	3,81E-06	0,0001	ZNF106	zinc finger protein 106
8,36	9,59	2,34	1,12E-05	0,0003	PIK3CB	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit beta
11,54	12,77	2,34	2,23E-05	0,0005	CLU; MIR6843	clusterin; microRNA 6843
3,54	4,77	2,34	0,0002	0,0027	FEZ1	fasciculation and elongation protein zeta 1
7,78	9,01	2,34	0,0003	0,0038	LMO7	LIM domain 7
8,32	9,55	2,34	0,0026	0,0203	SCAMP5	secretory carrier membrane protein 5
6,89	8,11	2,33	8,14E-06	0,0002	STAT2	signal transducer and activator of transcription 2
7,33	8,55	2,33	2,11E-05	0,0005	TBCCD1	TBCC domain containing 1
7,45	8,68	2,33	7,69E-05	0,0014	ACP6	acid phosphatase 6, lysophosphatidic
10,76	11,98	2,33	8,55E-05	0,0015	TFPT	TCF3 (E2A) fusion partner (in childhood Leukemia)
8,37	9,59	2,33	0,0001	0,0022	ZNF76	zinc finger protein 76
7,27	8,49	2,33	0,0004	0,0048	MDFIC	MyoD family inhibitor domain containing
8,68	9,89	2,32	3,00E-06	0,0001	WDR17	WD repeat domain 17

9,5	10,72	2,32	3,85E-06	0,0001	NF808; RPL39P	zinc finger protein 808; ribosomal protein L39 pseudogene 34
7,2	8,42	2,32	4,12E-05	0,0008	GSS	glutathione synthetase
6,27	7,48	2,32	0,0001	0,0022	BRSK1	BR serine/threonine kinase 1
4,48	5,69	2,32	0,0002	0,0027	LYST	lysosomal trafficking regulator
8,6	9,81	2,32	0,0002	0,0032	CRTC1	CREB regulated transcription coactivator 1
10,3	11,52	2,32	0,0007	0,0071	UBAP1	ubiquitin associated protein 1
6,78	7,98	2,31	2,95E-05	0,0007	CIB2	calcium and integrin binding family member 2
5,56	6,77	2,31	0,0001	0,0017	ZNF781	zinc finger protein 781
9,49	10,7	2,31	0,0003	0,0042	REEP2	receptor accessory protein 2
6,63	7,84	2,31	0,0009	0,0091	ZNF514	zinc finger protein 514
5,06	6,27	2,31	0,0017	0,0144	CCSER1	coiled-coil serine rich protein 1
10,62	11,83	2,31	0,0071	0,0428	WBP2	WW domain binding protein 2
9,72	10,92	2,3	3,55E-06	0,0001	CREM	cAMP responsive element modulator
5,8	7	2,3	2,14E-05	0,0005	HOOK2	hook microtubule-tethering protein 2
9,37	10,57	2,3	4,20E-05	0,0009	PTGR1	prostaglandin reductase 1
5,61	6,81	2,3	0,0004	0,0045	SERPIN1	serpin peptidase inhibitor, clade I (neuroserpin), member 1
5,43	6,62	2,29	6,22E-05	0,0012	NXF2B; NXF2	nuclear RNA export factor 2B; nuclear RNA export factor 2
10,56	11,76	2,29	9,24E-05	0,0016	C12orf75	chromosome 12 open reading frame 75
5,59	6,78	2,29	0,0006	0,0066	LRFN3	leucine rich repeat and fibronectin type III domain containing 3
6,39	7,58	2,29	0,0013	0,0115	POTEM; POTE	POTE ankyrin domain family, member M; POTE ankyrin domain family, member G
7,98	9,17	2,28	1,42E-05	0,0004	MMACHC	methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblC type, with homocystinuria
6,01	7,19	2,28	3,34E-05	0,0007	RRBP1	ribosome binding protein 1
8,34	9,53	2,28	3,88E-05	0,0008	OGFRL1	opioid growth factor receptor-like 1
7,46	8,64	2,28	8,34E-05	0,0015	CLCN4	chloride channel, voltage-sensitive 4
5,62	6,81	2,28	0,0002	0,0029	BHLHE41	basic helix-loop-helix family, member e41
7,35	8,54	2,28	0,003	0,0224	PPFIA1	protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein (liprin), alpha 1
4,97	6,15	2,28	0,0494	0,1738	RBPMS2	RNA binding protein with multiple splicing 2
6,15	7,34	2,27	2,72E-06	0,0001	ANGEL1	angel homolog 1 (Drosophila)
10,42	11,61	2,27	6,19E-06	0,0002	RASAL2	RAS protein activator like 2
9,06	10,25	2,27	7,83E-06	0,0002	EXO1; MIR190	REX1, RNA exonuclease 1 homolog; microRNA 1909
7,51	8,69	2,27	3,38E-05	0,0007	GYPE	glycophorin E (MNS blood group)
8,75	9,93	2,27	4,78E-05	0,0009	DUSP16	dual specificity phosphatase 16
7,16	8,35	2,27	0,0001	0,0017	OR2B6	olfactory receptor, family 2, subfamily B, member 6
11,24	12,43	2,27	0,0002	0,0025	ZDHHC20	zinc finger, DHHC-type containing 20
5,2	6,39	2,27	0,0002	0,003	OR52N5	olfactory receptor, family 52, subfamily N, member 5
6,79	7,98	2,27	0,0003	0,0036	CDC169-SOHLH	CCDC169-SOHLH2 readthrough
11,21	12,39	2,26	2,01E-06	8,18E-05	PPP1R11	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 11
10,8	11,97	2,26	1,24E-05	0,0003	RNGTT	RNA guanylyltransferase and 5-phosphatase
10,76	11,93	2,26	2,12E-05	0,0005	RNF10	ring finger protein 10
5,31	6,48	2,26	0,0001	0,0018	ZNF133	zinc finger protein 133
4,87	6,05	2,26	0,0003	0,0038	LRRN2	leucine rich repeat neuronal 2
11,44	12,61	2,26	0,0008	0,0083	ARHGAP1	Rho GTPase activating protein 1
12,19	13,36	2,25	7,98E-06	0,0002	CREBBP	CREB binding protein
11,94	13,1	2,25	8,17E-06	0,0002	AFTPH	aftiphilin
6,71	7,88	2,25	3,10E-05	0,0007	RASSF2	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 2
13,81	14,98	2,25	7,57E-05	0,0014	SS18	synovial sarcoma translocation, chromosome 18
7,31	8,47	2,25	0,0001	0,002	CCDC144A	coiled-coil domain containing 144A
9,82	10,99	2,25	0,0002	0,0024	ZYX	zyxin
10,56	11,73	2,24	2,02E-06	8,21E-05	HSDL2	hydroxysteroid dehydrogenase like 2
10,53	11,69	2,24	4,98E-06	0,0002	KIAA0930	KIAA0930
11,5	12,66	2,24	8,29E-06	0,0002	NF1	neurofibromin 1
4,55	5,72	2,24	1,45E-05	0,0004	SIPA1	signal-induced proliferation-associated 1
9,89	11,06	2,24	0,0001	0,0021	MRPS24	mitochondrial ribosomal protein S24
11,29	12,46	2,24	0,0002	0,0028	TWF1	twinfilin actin binding protein 1
3,82	4,99	2,24	0,0018	0,0152	DCBLD1	discoidin, CUB and LCCL domain containing 1
13,17	14,33	2,24	0,0052	0,0338	NPIP3	nuclear pore complex interacting protein family, member B3
10,45	11,61	2,23	3,46E-06	0,0001	TMED4	transmembrane p24 trafficking protein 4
8,42	9,58	2,23	4,62E-06	0,0002	CNYL1; MIR477	cyclin Y like 1; microRNA 4775
4,29	5,45	2,23	7,92E-05	0,0014	PTK2	Transcript Identified by AceView, Entrez Gene ID(s) 5747
9,39	10,55	2,23	0,0003	0,0041	NEDD4L	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like, E3 ubiquitin protein ligase
9,41	10,57	2,23	0,0007	0,007	PDGFA	PDGFA associated protein 1
4,1	5,26	2,23	0,0042	0,0288	HDLBP	Transcript Identified by AceView, Entrez Gene ID(s) 3069
10,85	12	2,22	2,94E-05	0,0006	MSANTD3	Myb/SANT-like DNA-binding domain containing 3
11,17	12,32	2,22	7,02E-05	0,0013	GPATCH11	G-patch domain containing 11
7,43	8,58	2,22	0,0001	0,002	DUSP16	dual specificity phosphatase 16
6,48	7,63	2,22	0,0001	0,0023	YAP1	Yes-associated protein 1
7,98	9,13	2,22	0,0002	0,0024	NDEL1	nudE neurodevelopment protein 1-like 1
8,39	9,54	2,22	0,0002	0,0025	SSU72	SSU72 homolog, RNA polymerase II CTD phosphatase
5,85	7,01	2,22	0,0004	0,0044	CTSK	cathepsin K
3,47	4,62	2,22	0,0013	0,0121	TIGD4	tigger transposable element derived 4
9,92	11,07	2,21	5,33E-06	0,0002	UBR3	ubiquitin protein ligase E3 component n-recogin 3 (putative)
10,67	11,82	2,21	8,84E-06	0,0002	VEZF1	vascular endothelial zinc finger 1
10,49	11,63	2,21	8,99E-06	0,0003	KIAA1109	KIAA1109
7,21	8,36	2,21	1,92E-05	0,0005	ZNF337	zinc finger protein 337
7,82	8,97	2,21	1,93E-05	0,0005	ZNF484	zinc finger protein 484
11,47	12,61	2,21	5,59E-05	0,0011	PAFAH1B1	platelet-activating factor acetylhydrolase 1b, regulatory subunit 1 (45kDa)
10,88	12,03	2,21	0,0001	0,0021	AP3D1	adaptor-related protein complex 3, delta 1 subunit
8,76	9,9	2,21	0,0007	0,0077	NDUFAF1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) complex I, assembly factor 1
5,83	6,96	2,2	4,78E-06	0,0002	TTC39B	tetratricopeptide repeat domain 39B
9,72	10,85	2,2	2,17E-05	0,0005	PSD3	pleckstrin and Sec7 domain containing 3
8,03	9,17	2,2	0,0002	0,0031	FAM135A	family with sequence similarity 135, member A
3,84	4,98	2,2	0,0033	0,0238	PDGFC	platelet derived growth factor C
10,95	12,08	2,19	2,59E-06	9,82E-05	PATL1	protein associated with topoisomerase II homolog 1 (yeast)
12,14	13,27	2,19	7,15E-06	0,0002	STAU2	staufen double-stranded RNA binding protein 2
6,68	7,81	2,19	2,20E-05	0,0005	RPIA	ribose 5-phosphate isomerase A
6,4	7,53	2,19	3,52E-05	0,0007	SLC39A8	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 8
7,18	8,31	2,19	3,89E-05	0,0008	CHML	choroideremia-like (Rab escort protein 2)
8,91	10,04	2,19	8,16E-05	0,0014	SAV1	salvador family WW domain containing protein 1
6,25	7,38	2,19	0,0002	0,0024	ZNF883	zinc finger protein 883

ANEXOS – ANEXO 2

8,65	9,78	2,19	0,0002	0,0026	DNAL1	dynein, axonemal, light chain 1
5,4	6,54	2,19	0,0015	0,013	IA-RAB4B; RAB	RAB4B, member RAS oncogene family; MIA-RAB4B readthrough (NMD candidate); RAB4B-EGLN2 readthrough (NM
6,44	7,57	2,19	0,0016	0,0141	FAM161A	family with sequence similarity 161, member A
12,77	13,89	2,18	3,06E-06	0,0001	QSER1	glutamine and serine rich 1
9,69	10,82	2,18	7,99E-06	0,0002	DCP2	decapping mRNA 2
11,99	13,11	2,18	1,39E-05	0,0004	SCYL2	SCY1-like, kinase-like 2
10,56	11,68	2,18	3,53E-05	0,0008	SAMHD1	SAM domain and HD domain 1
12,91	14,03	2,18	0,0001	0,002	IBTK	inhibitor of Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase
6,98	8,11	2,18	0,0003	0,0037	ZNF613	zinc finger protein 613
10,15	11,27	2,18	0,0004	0,0044	DCAF5	DDB1 and CUL4 associated factor 5
5,55	6,68	2,18	0,0005	0,006	FUCA1	fucosidase, alpha-L- 1, tissue
10,54	11,66	2,17	4,59E-06	0,0002	HSDL1	hydroxysteroid dehydrogenase like 1
9,39	10,51	2,17	2,69E-05	0,0006	MTIF3	mitochondrial translational initiation factor 3
9,25	10,37	2,17	5,20E-05	0,001	RALB	v-ral simian leukemia viral oncogene homolog B
8,84	9,96	2,17	8,67E-05	0,0015	ANKRD52	ankyrin repeat domain 52
10,02	11,14	2,17	9,74E-05	0,0017	SMUG1	single-strand-selective monofunctional uracil-DNA glycosylase 1
11,7	12,82	2,17	0,0001	0,0018	ZNF460	zinc finger protein 460
6,64	7,76	2,17	0,0002	0,0025	KAT2B	K(lysine) acetyltransferase 2B
10,02	11,14	2,17	0,0006	0,0063	NF701; ZNF137	zinc finger protein 701; zinc finger protein 137, pseudogene
11,35	12,46	2,16	2,06E-06	8,31E-05	MPC2	mitochondrial pyruvate carrier 2
11,22	12,34	2,16	1,78E-05	0,0004	SPAST	spastin
7,26	8,37	2,16	2,24E-05	0,0005	SERTAD3	SERTA domain containing 3
6,82	7,93	2,16	2,49E-05	0,0006	STX8	syntaxin 8
9,54	10,65	2,16	2,58E-05	0,0006	KIF3C	kinesin family member 3C
9,85	10,96	2,16	4,60E-05	0,0009	HACD1	3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 1
5,82	6,93	2,16	0,0002	0,0026	ZC3H12C	zinc finger CCCH-type containing 12C
12,62	13,73	2,16	0,0003	0,0041	TIPRL	TOR signaling pathway regulator
5,86	6,97	2,16	0,0014	0,0126	NEDD4	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4, E3 ubiquitin protein ligase
5,38	6,49	2,16	0,0017	0,0148	TRPC3	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 3
6,34	7,44	2,16	0,0031	0,023	CMC1	C-x(9)-C motif containing 1
10,16	11,26	2,16	0,0035	0,0249	PCGF3	polycomb group ring finger 3
8,25	9,35	2,16	0,0043	0,0293	ROGDI	rogdi homolog
11,51	12,61	2,15	3,58E-05	0,0008	ARNA16; SNHG	SEC14-like lipid binding 1; small Cajal body-specific RNA 16; small nucleolar RNA host gene 20; microRNA 6516
9,01	10,11	2,15	4,07E-05	0,0008	SNX16	sorting nexin 16
8,12	9,22	2,15	0,0001	0,0019	RGMB	repulsive guidance molecule family member b
6,47	7,58	2,15	0,0009	0,0092	SDHAF4	succinate dehydrogenase complex assembly factor 4
7,92	9,02	2,15	0,0012	0,0109	UGCG	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase
7,1	8,2	2,15	0,0015	0,0131	TMEM164	transmembrane protein 164
4,17	5,27	2,15	0,0194	0,0887	07566.10; GAT	Transcript Identified by AceView, Entrez Gene ID(s) 57798; novel transcript, antisense to ERVW-1 and PEX1
11,24	12,34	2,14	4,39E-06	0,0001	CDK8	cyclin-dependent kinase 8
10,42	11,51	2,14	1,24E-05	0,0003	CSRNP3	cysteine-serine-rich nuclear protein 3
7,59	8,69	2,14	1,28E-05	0,0003	CCDC122	coiled-coil domain containing 122
9,4	10,5	2,14	2,34E-05	0,0005	CCM2	cerebral cavernous malformation 2
7,92	9,01	2,14	4,88E-05	0,001	CCDC167	coiled-coil domain containing 167
3,82	4,91	2,14	5,71E-05	0,0011	CCDC175	coiled-coil domain containing 175
10,16	11,25	2,14	0,0001	0,0017	RELI3B; ATP5	PRELI domain containing 3B; ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, epsilon subunit
8,9	10	2,14	0,0002	0,0027	NDUFA13	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 13
10,29	11,39	2,14	0,0006	0,0068	RAD51B	Jeck2013 ALT_ACCEPTOR, ALT_DONOR, coding, INTERNAL, intronic best transcript NM_133509
13,24	14,34	2,14	0,0028	0,0212	NPIP85	nuclear pore complex interacting protein family, member B5
9,27	10,36	2,13	6,42E-06	0,0002	COG7	component of oligomeric golgi complex 7
5,42	6,51	2,13	6,59E-06	0,0002	INADL	InAd-like (Drosophila)
9,55	10,65	2,13	2,30E-05	0,0005	RCOR1	REST corepressor 1
9,18	10,27	2,13	2,84E-05	0,0006	TLK1	tousled-like kinase 1
10,49	11,58	2,13	3,17E-05	0,0007	ITSN2	intersectin 2
5,6	6,68	2,13	9,61E-05	0,0016	TP53INP2	tumor protein p53 inducible nuclear protein 2
7,37	8,46	2,13	0,0001	0,002	MEGF9	multiple EGF-like-domains 9
5,84	6,93	2,13	0,0001	0,002	PRLR	prolactin receptor
9,47	10,56	2,13	0,0001	0,0022	GALNT7	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 7
5,8	6,89	2,13	0,0002	0,0025	PARD6A	par-6 family cell polarity regulator alpha
12,94	14,04	2,13	0,0002	0,0025	PSMF1	proteasome inhibitor subunit 1
5,23	6,32	2,13	0,0002	0,0031	ELF4	E74-like factor 4 (ets domain transcription factor)
3,87	4,96	2,13	0,0002	0,0032	PRRT3	proline-rich transmembrane protein 3
6,65	7,74	2,13	0,0027	0,0205	ACVR2B	activin A receptor type IIB
13,19	14,28	2,13	0,0077	0,0453	NPIP84	nuclear pore complex interacting protein family, member B4
6,5	7,59	2,12	2,28E-05	0,0005	FAM78B	family with sequence similarity 78, member B
7,38	8,46	2,12	7,74E-05	0,0014	ZBT88B	zinc finger and BTB domain containing 88
8,93	10,02	2,12	7,87E-05	0,0014	GLE1	GLE1 RNA export mediator
9,01	10,1	2,12	0,0001	0,0017	PIGY; PYURF	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class Y; PIGY upstream reading frame
11,07	12,16	2,12	0,0001	0,0021	R3HDM2	R3H domain containing 2
12,01	13,1	2,12	0,0001	0,0022	LARP1	La ribonucleoprotein domain family, member 1
12,81	13,9	2,12	0,0003	0,0043	IDH3A	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha
3,9	4,99	2,12	0,0026	0,0199	CTPS2	Transcript Identified by AceView, Entrez Gene ID(s) 56474
7,2	8,28	2,12	0,0143	0,0716	LRP5	LDL receptor related protein 5
9,81	10,88	2,11	7,12E-06	0,0002	ACOT13	acyl-CoA thioesterase 13
13,85	14,93	2,11	5,64E-05	0,0011	TMEM14B	transmembrane protein 14B
7,9	8,98	2,11	7,35E-05	0,0013	YOD1	YOD1 deubiquitinase
3,77	4,85	2,11	0,0002	0,0027	MID2	midline 2
7,24	8,32	2,11	0,0004	0,0045	PLCD4	phospholipase C, delta 4
7,84	8,92	2,11	0,0006	0,0063	TYW3	tRNA-yW synthesizing protein 3 homolog (S. cerevisiae)
5,98	7,06	2,11	0,0011	0,0103	JAK2	Janus kinase 2
7,5	8,57	2,11	0,0012	0,0115	ZC3H6	zinc finger CCCH-type containing 6
7,76	8,84	2,11	0,0048	0,032	KCTD21	potassium channel tetramerization domain containing 21
6,07	7,15	2,1	2,13E-05	0,0005	FAM102A	family with sequence similarity 102, member A
10,33	11,4	2,1	2,73E-05	0,0006	MLLT3	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 3
6,34	7,41	2,1	0,0001	0,0017	TSGA10	testis specific 10
9,64	10,71	2,1	0,0001	0,002	KPNA5	karyopherin alpha 5 (importin alpha 6)
3,83	4,91	2,1	0,0001	0,0021	668; AC00506	uncharacterized LOC101927668; Transcript Identified by AceView, Entrez Gene ID(s) 346389; novel transcript, sense
8,97	10,04	2,1	0,0002	0,003	WDFY1	WD repeat and FYVE domain containing 1
5,6	6,67	2,1	0,0003	0,0043	CCDC191	coiled-coil domain containing 191

9,14	10,21	2,1	0,0004	0,005	EPB41L1	erythrocyte membrane protein band 4.1-like 1
7,91	8,98	2,1	0,0009	0,0089	MLXIP	MLX interacting protein
5,3	6,37	2,1	0,0137	0,0696	LTBP4	latent transforming growth factor beta binding protein 4
11,23	12,29	2,09	7,82E-06	0,0002	ZNF611	zinc finger protein 611
10,26	11,32	2,09	1,04E-05	0,0003	PAPD7	PAP associated domain containing 7
5,76	6,82	2,09	1,53E-05	0,0004	INPP5E	inositol polyphosphate-5-phosphatase E
9,35	10,41	2,09	1,73E-05	0,0004	FAM198B	family with sequence similarity 198, member B
8,23	9,29	2,09	2,32E-05	0,0005	GOLGA1	golgin A1
7,64	8,71	2,09	0,0001	0,0017	FAM234B	family with sequence similarity 234, member B
6,99	8,06	2,09	0,0001	0,002	ANKDD1A	ankyrin repeat and death domain containing 1A
8,12	9,18	2,09	0,0002	0,0029	EVIS	ecotropic viral integration site 5
6,96	8,02	2,09	0,0002	0,0032	TMEM8A	transmembrane protein 8A
6,68	7,74	2,09	0,0006	0,0061	PROS1	protein S (alpha)
4,69	5,76	2,09	0,0017	0,0143	ANKRD52	Zhang2013 ALT_ACCEPTOR, ALT_DONOR, coding, INTERNAL, intronic best transcript NM_173595
7,45	8,52	2,09	0,0028	0,0213	DYRK1B	dual specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1B
11,72	12,78	2,08	7,93E-06	0,0002	SLK	STE20-like kinase
6,35	7,41	2,08	7,61E-05	0,0014	TRIM32	tripartite motif containing 32
5,21	6,27	2,08	0,0001	0,0021	DNASE1	deoxyribonuclease I
9,99	11,05	2,08	0,0002	0,0027	CCDC124	coiled-coil domain containing 124
10,3	11,36	2,08	0,0003	0,0035	VPS39	vacuolar protein sorting 39 homolog (S. cerevisiae)
4,78	5,84	2,08	0,0003	0,0043	FAM46A	family with sequence similarity 46, member A
3,53	4,59	2,08	0,0005	0,0055	KIRREL3	Jeck2013 ALT_ACCEPTOR, ALT_DONOR, coding, INTERNAL, intronic best transcript NM_032531
8,99	10,05	2,08	0,0007	0,0072	HSF1	heat shock transcription factor 1
8,31	9,36	2,08	0,0008	0,0085	ING2	inhibitor of growth family member 2
5,9	6,96	2,08	0,001	0,0097	FGD4	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 4
8,58	9,64	2,08	0,0023	0,0184	STK4	serine/threonine kinase 4
5,84	6,89	2,08	0,0032	0,0233	SDSL	serine dehydratase-like
3,85	4,91	2,08	0,0048	0,0318	C9orf116	chromosome 9 open reading frame 116
8,75	9,8	2,07	7,94E-06	0,0002	SYNGR2	synaptogyrin 2
9,94	10,99	2,07	1,40E-05	0,0004	SLF2	SMC5-SMC6 complex localization factor 2
5,06	6,1	2,07	7,36E-05	0,0013	PRKCD	protein kinase C, delta
6,86	7,91	2,07	0,0001	0,0019	CRY1	cryptochrome circadian clock 1
9,26	10,31	2,07	0,0003	0,0038	ADM5; CPT1C	adrenomedullin 5 (putative); carnitine palmitoyltransferase 1C
4,92	5,97	2,07	0,0017	0,0143	ZNF404	zinc finger protein 404
4,38	5,43	2,07	0,0026	0,0203	ZNF630	zinc finger protein 630
9,21	10,26	2,07	0,0046	0,0312	ERF	Ets2 repressor factor
5,13	6,18	2,07	0,0492	0,1734	RAB39B	Transcript Identified by AceView, Entrez Gene ID(s) 116442
9,96	11,01	2,06	5,42E-06	0,0002	PRRC2B	proline-rich coiled-coil 2B
7	8,04	2,06	8,13E-06	0,0002	PHF8	PHD finger protein 8
9,84	10,88	2,06	1,42E-05	0,0004	INO80D	INO80 complex subunit D
9,55	10,59	2,06	2,33E-05	0,0005	DMXL1	Dmx-like 1
12,41	13,45	2,06	4,00E-05	0,0008	RALGAPB	Ral GTPase activating protein, beta subunit (non-catalytic)
11,89	12,94	2,06	4,77E-05	0,0009	DNM1	dynamamin 1
10,15	11,19	2,06	0,0001	0,002	TNFAIP1	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1 (endothelial)
8,28	9,32	2,06	0,0009	0,0087	HOMER1	homer scaffolding protein 1
5,88	6,92	2,06	0,0012	0,0115	UVSSA	UV stimulated scaffold protein A
9,11	10,15	2,06	0,0066	0,0406	CHID1	chitinase domain containing 1
4,76	5,8	2,06	0,0128	0,0659	MRGBP	MRG/MORF4L binding protein
10,09	11,13	2,05	2,15E-05	0,0005	6-CRHR1; RP11	Homo sapiens MGC57346-CRHR1 readthrough (MGC57346-CRHR1), transcript variant 5, mRNA.; Homo sapiens MG
3,28	4,31	2,05	3,58E-05	0,0008	PSTPIP2	proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 2
10,17	11,21	2,05	4,00E-05	0,0008	WDR77	WD repeat domain 77
7,59	8,62	2,05	0,0002	0,0024	UGT8	UDP glycosyltransferase 8
9,1	10,14	2,05	0,0002	0,0025	ZBTB37	zinc finger and BTB domain containing 37
5,06	6,09	2,05	0,0002	0,0032	MON1B	MON1 secretory trafficking family member B
11,35	12,39	2,05	0,0003	0,0038	BPNT1	3(2), 5-bisphosphate nucleotidase 1
8,36	9,39	2,05	0,0003	0,0041	TMEM38B	transmembrane protein 38B
10,14	11,18	2,05	0,0004	0,0045	RUND3A	RUN domain containing 3A
4,53	5,56	2,05	0,0006	0,0064	MAFK	v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog K
10,45	11,48	2,05	0,0015	0,0134	LSM14B	LSM family member 14B
9,16	10,19	2,05	0,002	0,0168	SIRT2	sirtuin 2
8,2	9,23	2,05	0,0074	0,0441	CPLX2	complexin 2
5,56	6,59	2,04	5,72E-05	0,0011	KRBA2	KRAB-A domain containing 2
6,48	7,5	2,04	7,93E-05	0,0014	IFT57	intraflagellar transport 57
6,06	7,09	2,04	0,0001	0,0023	MVP; PAGR1	major vault protein; PAXIP1 associated glutamate-rich protein 1
4,51	5,54	2,04	0,0002	0,003	ARHGDI1B	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta
5,97	7	2,04	0,0003	0,0041	ZNF888	zinc finger protein 888
8,9	9,93	2,04	0,0004	0,0046	CCDC7	coiled-coil domain containing 7
3,83	4,86	2,04	0,0004	0,0048	BBS4	Memczak2013 ALT_ACCEPTOR, ALT_DONOR, coding, INTERNAL, intronic best transcript NM_033028
6,71	7,73	2,04	0,0007	0,0071	LRRC4C	leucine rich repeat containing 4C
10,1	11,12	2,04	0,001	0,0096	LMO3	LIM domain only 3 (rhombotin-like 2)
4,69	5,72	2,04	0,0023	0,0181	ADGRB2	adhesion G protein-coupled receptor B2
8,98	10,01	2,04	0,0031	0,0228	BCL7B	B-cell CLL/lymphoma 7B
8,13	9,16	2,04	0,01	0,0549	URGCP	Salzman2013 ANNOTATED, coding, OVEXON, UTR5 best transcript NM_001077664
7,42	8,44	2,03	1,21E-05	0,0003	RING1	ring finger protein 1
13,55	14,57	2,03	2,12E-05	0,0005	BTBD1	BTB (POZ) domain containing 1
9,15	10,17	2,03	2,24E-05	0,0005	KIF3A	kinesin family member 3A
11,15	12,18	2,03	4,06E-05	0,0008	PDHX	pyruvate dehydrogenase complex, component X
12,68	13,7	2,03	5,66E-05	0,0011	GNAI1	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 1
8,88	9,9	2,03	6,77E-05	0,0012	SSX2IP	synovial sarcoma, X breakpoint 2 interacting protein
7,8	8,82	2,03	7,60E-05	0,0014	ATG4A	autophagy related 4A, cysteine peptidase
7,29	8,31	2,03	7,96E-05	0,0014	TRMT10B	tRNA methyltransferase 10B
7,56	8,57	2,03	0,0002	0,0027	GNL1	guanine nucleotide binding protein-like 1
6,64	7,66	2,03	0,0002	0,0029	ZNF329	zinc finger protein 329
11,48	12,5	2,03	0,0002	0,0029	TTYH3	tweety family member 3
8,9	9,92	2,03	0,0003	0,0042	TANK	TRAF family member-associated NFKB activator
9,18	10,2	2,03	0,0004	0,0052	ZNF28	zinc finger protein 28
7,97	8,99	2,03	0,0005	0,0054	COMMD8	COMM domain containing 8
7,98	9	2,03	0,0016	0,0139	SGPP1	sphingosine-1-phosphate phosphatase 1
4,79	5,81	2,03	0,0031	0,023	SIRT7	sirtuin 7

7,74	8,76	2,03	0,0046	0,0307	OBFC1	oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold containing 1
3,06	4,08	2,03	0,01	0,0549	SST	somatostatin
12	13,01	2,02	1,15E-05	0,0003	RNF220	ring finger protein 220
4,65	5,67	2,02	1,38E-05	0,0004	CDK15	cyclin-dependent kinase 15
6,8	7,81	2,02	2,59E-05	0,0006	ELMOD3	ELMO/CED-12 domain containing 3
9,76	10,77	2,02	2,96E-05	0,0007	ZNF585A	zinc finger protein 585A
9,83	10,85	2,02	9,62E-05	0,0016	ANKS1A	ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 1A
8,27	9,28	2,02	0,0001	0,0019	ZNF773	zinc finger protein 773
7,83	8,84	2,02	0,0001	0,0023	DYRK3	dual specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 3
10,88	11,89	2,02	0,0002	0,0025	EFR3A	EFR3 homolog A
4,08	5,09	2,02	0,0002	0,0029	FGF12	fibroblast growth factor 12
10,74	11,75	2,02	0,0002	0,003	C18orf25	chromosome 18 open reading frame 25
8,68	9,7	2,02	0,0003	0,0035	ZNF420	zinc finger protein 420
6,74	7,75	2,02	0,0004	0,0048	NAAA	N-acylethanolamine acid amidase
4,85	5,86	2,02	0,0005	0,0053	SLC22A5	solute carrier family 22 (organic cation/carnitine transporter), member 5
7,72	8,73	2,02	0,0008	0,0084	BAHD1	bromo adjacent homology domain containing 1
6,33	7,34	2,02	0,0032	0,0235	F131215.3; XKR	Memczak2013 ALT_ACCEPTOR, ALT_DONOR, coding, INTERNAL, intronic best transcript NM_173683; novel transcri
5,31	6,32	2,02	0,0044	0,0302	ANKRD7	ankyrin repeat domain 7
9,44	10,45	2,01	1,41E-05	0,0004	EXO3	endo/exonuclease (5-3), endonuclease G-like
7,73	8,74	2,01	1,54E-05	0,0004	PKN1	protein kinase N1
4,71	5,73	2,01	3,65E-05	0,0008	DENND1B	DENN/MADD domain containing 1B
10,47	11,48	2,01	9,17E-05	0,0016	NDUFAB1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, alpha/beta subcomplex, 1, 8kDa
6,39	7,4	2,01	0,0001	0,0019	CIC	capicua transcriptional repressor
9,64	10,65	2,01	0,0001	0,0019	INPPL1	inositol polyphosphate phosphatase-like 1
9,39	10,4	2,01	0,0002	0,0025	MSANTD4	Myb/SANT-like DNA-binding domain containing 4 with coiled-coils
7,79	8,79	2,01	0,0002	0,0033	DYNC2L1	dynein, cytoplasmic 2, light intermediate chain 1
10,34	11,34	2,01	0,0006	0,0066	METTL4	methyltransferase like 4
8,56	9,57	2,01	0,0007	0,007	COASY	CoA synthase
6,82	7,83	2,01	0,0019	0,016	ATXN7L3	ataxin 7-like 3
4,71	5,71	2,01	0,0043	0,0294	TUBGCP6	tubulin, gamma complex associated protein 6
4,44	5,45	2,01	0,0057	0,0362	SHPK; TRPV1	sedoheptulokinase; transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1
4,78	5,79	2,01	0,0132	0,0673	ERICH2	glutamate rich 2
12,29	13,29	2	1,01E-05	0,0003	RIT1	Ras-like without CAAX 1
10,36	11,36	2	1,78E-05	0,0004	NDUFA12	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 12
8,6	9,6	2	9,41E-05	0,0016	SCN2A	sodium channel, voltage gated, type II alpha subunit
6,98	7,99	2	0,0001	0,002	ABRACL	ABRA C-terminal like
6,69	7,7	2	0,0003	0,0037	ARHGEF6	Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor 6
7,61	8,61	2	0,0019	0,0161	USP54	ubiquitin specific peptidase 54

Down-regulated genes CHLA-90 cells

shNSC (log2)	shERKS_1 (log2)	Fold Change	P-val	FDR P-val	Gene Symbol	Description
13,11	7,67	-43,47	3,30E-14	3,54E-10	GPR50	G protein-coupled receptor 50
13,65	8,33	-39,93	7,00E-13	1,36E-09	DBH	dopamine beta-hydroxylase (dopamine beta-monooxygenase)
13,07	7,76	-39,79	2,23E-13	5,97E-10	FKBP1A; MIR6869	FK506 binding protein 1A; microRNA 6869
14,29	9,03	-38,23	8,55E-14	4,34E-10	METTL7A	methyltransferase like 7A
11,02	5,86	-35,79	2,78E-14	3,54E-10	SYNPO2	synaptopodin 2
14,66	9,57	-33,87	1,01E-13	4,34E-10	RTN3	reticulon 3
11,17	6,21	-31,06	1,49E-13	4,84E-10	PRR16	proline rich 16
9,45	4,83	-24,64	1,58E-13	4,84E-10	ROR1-AS1	ROR1 antisense RNA 1
14,1	9,48	-24,54	5,82E-14	4,16E-10	TMEM97	transmembrane protein 97
11,33	6,83	-22,53	5,70E-13	1,36E-09	CPNE2	copine II
14,91	10,63	-19,51	5,39E-12	8,89E-09	LRRN3	leucine rich repeat neuronal 3
11,32	7,08	-18,86	2,17E-10	1,06E-07	DLX5	distal-less homeobox 5
13,71	9,57	-17,65	7,02E-10	2,51E-07	ASCL1	achaete-scute family bHLH transcription factor 1
14,25	10,3	-15,52	8,24E-12	1,18E-08	CHGA	chromogranin A
9,43	5,61	-14,19	1,02E-10	7,33E-08	CDC3	coiled-coil domain containing 3
10,36	6,6	-13,53	2,14E-10	1,06E-07	KIAA0101; CSNK1G1	KIAA0101; casein kinase 1, gamma 1
12,57	8,82	-13,46	6,54E-11	5,70E-08	TGFB1	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa
13,45	9,71	-13,43	6,46E-13	1,36E-09	SKP2	S-phase kinase-associated protein 2, E3 ubiquitin protein ligase
13,84	10,12	-13,14	2,71E-10	1,24E-07	SRM	spermidine synthase
10,29	6,58	-13,05	1,34E-10	8,42E-08	TMEM9B	TMEM9 domain family, member B
12,71	9,11	-12,13	1,65E-12	2,95E-09	TXNDC12; KTI12	thioredoxin domain containing 12 (endoplasmic reticulum); KTI12 chromatin associated homolog
12,9	9,39	-11,37	3,73E-11	4,44E-08	VSTM2A; VSTM2A-OT1	V-set and transmembrane domain containing 2A; VSTM2A overlapping transcript 1
9,38	5,89	-11,29	7,89E-10	2,72E-07	FHL2	four and a half LIM domains 2
12,09	8,63	-10,99	5,06E-11	5,10E-08	SREBF2	sterol regulatory element binding transcription factor 2
12,19	8,78	-10,65	2,80E-11	3,53E-08	MT1F	metallothionein 1F
10,58	7,18	-10,51	1,88E-10	1,03E-07	ISL1	ISL LIM homeobox 1
11,58	8,28	-9,82	1,60E-07	1,22E-05	HAND1	heart and neural crest derivatives expressed 1
9,65	6,36	-9,74	1,62E-09	4,39E-07	SYNPO	synaptopodin
12,52	9,26	-9,59	5,86E-12	8,98E-09	JAK1	Janus kinase 1
11,16	7,91	-9,48	6,88E-10	2,50E-07	CDH11	cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)
8,09	4,88	-9,24	4,37E-09	8,97E-07	EDNRA	endothelin receptor type A
9,79	6,64	-8,87	4,52E-11	4,84E-08	FUNDC2	FUN14 domain containing 2
9,21	6,07	-8,81	2,91E-10	1,29E-07	QDPR	quinoid dihydropteridine reductase
12,85	9,72	-8,77	7,19E-11	5,89E-08	LMO4	LIM domain only 4
11,48	8,42	-8,3	4,10E-09	8,72E-07	OSTM1	osteopetrosis associated transmembrane protein 1
10,99	7,95	-8,21	7,31E-10	2,57E-07	SLC35A5	solute carrier family 35, member A5
10,75	7,73	-8,09	2,68E-10	1,24E-07	DLK1	delta-like 1 homolog (Drosophila)
9,78	6,79	-7,98	2,46E-09	6,12E-07	IGFBP5	insulin like growth factor binding protein 5
14,5	11,5	-7,95	1,83E-10	1,03E-07	EIF4G2; SNORD97	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 2; small nucleolar RNA, C/D box 97
10,06	7,07	-7,93	2,48E-09	6,12E-07	TSKU	tskushi, small leucine rich proteoglycan
11,24	8,25	-7,89	5,23E-11	5,10E-08	PAQR8	progesterin and adipoQ receptor family member VIII
14,35	11,38	-7,85	1,73E-10	1,03E-07	BSG	basigin (Ok blood group)
13,23	10,26	-7,84	6,64E-11	5,70E-08	AK3	adenylate kinase 3
7,9	4,93	-7,84	3,23E-07	2,01E-05	GPC3	glypican 3
12,53	9,56	-7,81	1,01E-10	7,33E-08	RAB21	RAB21, member RAS oncogene family
10,73	7,78	-7,73	4,11E-09	8,72E-07	DKK1	dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1
12,34	9,4	-7,66	1,64E-11	2,19E-08	FAF2	Fas associated factor family member 2
12,26	9,33	-7,62	2,94E-10	1,29E-07	LINGO4	leucine rich repeat and Ig domain containing 4
9,87	6,98	-7,4	4,23E-11	4,77E-08	MOSPD1	motile sperm domain containing 1
10,51	7,64	-7,33	3,25E-10	1,37E-07	CADPS	Ca++-dependent secretion activator
8,38	5,51	-7,33	4,14E-08	4,37E-06	FOXRED2	FAD-dependent oxidoreductase domain containing 2
8,54	5,69	-7,22	1,02E-08	1,61E-06	ALKBH5	alkB homolog 5, RNA demethylase
6,14	3,3	-7,16	1,29E-10	8,38E-08	DGKK	diacylglycerol kinase, kappa
14,05	11,21	-7,14	5,62E-11	5,24E-08	ARHGDI1A	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha
12,69	9,86	-7,12	7,42E-11	5,89E-08	TMX1	thioredoxin-related transmembrane protein 1
11,19	8,38	-7	1,77E-08	2,35E-06	COX20	COX20 cytochrome c oxidase assembly factor
9,95	7,15	-6,98	1,01E-08	1,61E-06	LGMN	legumain
11,4	8,61	-6,9	3,84E-10	1,55E-07	ITGA8	integrin alpha 8
11,32	8,54	-6,88	4,92E-09	9,68E-07	CRH	corticotropin releasing hormone
10,32	7,54	-6,88	4,19E-08	4,40E-06	JUP	junction plakoglobin
15,15	12,37	-6,87	7,87E-09	1,34E-06	TPGS2	tubulin polyglutamylase complex subunit 2
10,83	8,08	-6,71	3,24E-10	1,37E-07	LYN	LYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase
10,7	7,96	-6,69	2,01E-09	5,14E-07	GFRA2	GDNF family receptor alpha 2
11,96	9,23	-6,64	2,41E-07	1,60E-05	ENG	endoglin
12,47	9,74	-6,63	1,05E-08	1,64E-06	MAGED1	MAGE family member D1
13,12	10,39	-6,62	2,10E-10	1,06E-07	CASP2	caspase 2
9,35	6,64	-6,57	2,96E-07	1,85E-05	AHNAK	AHNAK nucleoprotein
14,99	12,28	-6,55	1,06E-10	7,33E-08	SAE1	SUMO1 activating enzyme subunit 1
12,11	9,41	-6,5	1,03E-06	4,90E-05	FAM222A	family with sequence similarity 222, member A
11,83	9,15	-6,38	2,52E-10	1,20E-07	PHF10	PHD finger protein 10
12,83	10,16	-6,37	1,06E-10	7,33E-08	MTHFD1	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1, methylenetetrahydrofolate cyclohydrol
9,95	7,28	-6,37	1,42E-09	4,02E-07	PTPRR	protein tyrosine phosphatase, receptor type, R
11,27	8,61	-6,31	1,40E-09	4,00E-07	MT1E	metallothionein 1E
10,84	8,2	-6,26	2,82E-09	6,65E-07	PIGA	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class A
12,13	9,49	-6,25	1,81E-10	1,03E-07	TSPAN5	tetraspanin 5
11,62	8,98	-6,23	3,31E-10	1,37E-07	CCNB1IP1; SNORD126	cyclin B1 interacting protein 1, E3 ubiquitin protein ligase; small nucleolar RNA, C/D box 126
14,42	11,8	-6,13	1,99E-10	1,06E-07	CCNA2	cyclin A2
9,74	7,13	-6,1	4,67E-10	1,86E-07	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
7,84	5,24	-6,03	5,03E-09	9,73E-07	KCTD12	potassium channel tetramerization domain containing 12
11,68	9,09	-6,01	2,81E-08	3,23E-06	TMED8	transmembrane p24 trafficking protein family member 8
8,97	6,39	-5,99	2,34E-06	9,15E-05	HS3ST5	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 5
10,27	7,69	-5,98	6,09E-07	3,27E-05	TGOLN2	trans-golgi network protein 2
10,59	8,02	-5,95	1,34E-09	3,91E-07	DNAJC4	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 4
13,61	11,06	-5,85	1,07E-09	3,27E-07	PP1L1	peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 1
8,28	5,75	-5,8	5,64E-10	2,12E-07	CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4
12,86	10,33	-5,77	1,10E-08	1,67E-06	CDIPT	CDP-diacylglycerol-inositol 3-phosphatidylinositol transferase
10,45	7,92	-5,77	6,49E-08	6,03E-06	BGN	biglycan
6,33	3,82	-5,7	1,09E-08	1,65E-06	PELI2	pellino E3 ubiquitin protein ligase family member 2
7,06	4,55	-5,68	7,98E-10	2,72E-07	TFPI2	tissue factor pathway inhibitor 2
8,53	6,03	-5,67	5,50E-09	1,04E-06	GPM6B	glycoprotein M6B
10,44	7,95	-5,62	3,69E-06	0,0001	SNAI2	snail family zinc finger 2
11,25	8,79	-5,53	1,79E-09	4,69E-07	IQCJ; IQCJ-SCHIP1	IQ motif containing J; schwannomin interacting protein 1; IQCJ-SCHIP1 readthrough
9,44	6,98	-5,52	3,13E-08	3,48E-06	SEN3	SUMO1/sentrin/SMT3 specific peptidase 3
7,31	4,84	-5,52	1,70E-07	1,24E-05	PDZD2	PDZ domain containing 2
13,95	11,5	-5,47	4,93E-10	1,89E-07	ALCAM	activated leukocyte cell adhesion molecule
13,02	10,57	-5,46	4,78E-10	1,87E-07	ADAMTS9	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 9

12,36	9,92	-5,42	1,35E-09	3,91E-07	TEX261	testis expressed 261
10,18	7,76	-5,34	7,86E-09	1,34E-06	BIRC5	baculoviral IAP repeat containing 5
13,94	11,53	-5,33	4,66E-09	9,25E-07	RACGAP1	Rac GTPase activating protein 1
10,91	8,5	-5,32	8,13E-09	1,36E-06	KHDRBS3	KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 3
12,43	10,05	-5,22	1,47E-08	2,10E-06	NT5C2	5-nucleotidase, cytosolic II
9,34	6,96	-5,21	8,05E-09	1,36E-06	POPDC2	popeye domain containing 2
10,7	8,33	-5,17	7,56E-09	1,32E-06	ST8SIA2	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminidase alpha-2,8-sialyltransferase 2
11,64	9,27	-5,17	3,01E-08	3,38E-06	THBS1	thrombospondin 1
10,94	8,57	-5,17	5,65E-08	5,56E-06	ADCYAP1R1	adenylate cyclase activating polypeptide 1 (pituitary) receptor type I
9,72	7,35	-5,16	6,31E-10	2,34E-07	UTRN	utrophin
8,59	6,23	-5,13	4,46E-09	9,02E-07	SNAI1	snail family zinc finger 1
7,49	5,13	-5,13	1,66E-08	2,26E-06	GNG10	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 10
9,56	7,21	-5,09	3,73E-09	8,33E-07	ZNF704	zinc finger protein 704
13,71	11,36	-5,09	4,21E-09	8,85E-07	RAB1B	RAB1B, member RAS oncogene family
10,1	7,76	-5,06	1,53E-09	4,25E-07	KCNQ5	potassium channel, voltage gated KQT-like subfamily Q, member 5
9,19	6,85	-5,06	2,85E-08	3,24E-06	INSIG1	insulin induced gene 1
11,05	8,71	-5,04	2,63E-08	3,09E-06	RORB	RAR-related orphan receptor B
10,07	7,74	-5,03	1,06E-09	3,27E-07	NT5E	5-nucleotidase, ecto (CD73)
14,36	12,05	-4,97	1,47E-08	2,10E-06	RPL18A	ribosomal protein L18a
10,52	8,21	-4,97	7,23E-08	6,48E-06	FGF14; FGF14-IT1	fibroblast growth factor 14; FGF14 intronic transcript 1
9,6	7,29	-4,95	2,71E-08	3,16E-06	ATG9A	autophagy related 9A
11,04	8,73	-4,94	4,33E-08	4,51E-06	LAMP5	lysosomal-associated membrane protein family, member 5
14,72	12,44	-4,86	5,11E-09	9,78E-07	PTBP1; MIR4745	polypyrimidine tract binding protein 1; microRNA 4745
11,9	9,62	-4,84	1,60E-08	2,22E-06	USH2A	Usher syndrome 2A (autosomal recessive, mild)
11,76	9,49	-4,82	7,51E-09	1,32E-06	GLUD1	glutamate dehydrogenase 1
10	7,74	-4,81	1,66E-07	1,23E-05	FNDC5	fibronectin type III domain containing 5
13,04	10,78	-4,79	2,76E-09	6,65E-07	ELMO1	engulfment and cell motility 1
12,59	10,32	-4,79	3,29E-09	7,50E-07	MAN1A1	mannosidase, alpha, class 1A, member 1
11,98	9,73	-4,75	3,77E-09	8,33E-07	IMPAD1	inositol monophosphatase domain containing 1
10,12	7,87	-4,75	1,76E-07	1,26E-05	COMMD4	COMM domain containing 4
13,03	10,79	-4,73	2,49E-09	6,12E-07	ZDHHC3	zinc finger, DHHC-type containing 3
8,4	6,15	-4,73	2,40E-08	2,96E-06	DDIAS	DNA damage-induced apoptosis suppressor
11,71	9,47	-4,73	3,36E-07	2,07E-05	MRPL47	mitochondrial ribosomal protein L47
14,79	12,56	-4,71	1,05E-09	3,27E-07	AKR1C1	aldo-keto reductase family 1, member C1
11,89	9,66	-4,71	6,73E-09	1,23E-06	CDK6	cyclin-dependent kinase 6
10,6	8,37	-4,7	3,66E-09	8,26E-07	UBE2E3	ubiquitin-conjugating enzyme E2E 3
13,16	10,93	-4,68	1,09E-09	3,30E-07	TERF2IP	telomeric repeat binding factor 2, interacting protein
11,81	9,59	-4,67	3,60E-08	3,83E-06	HMGCS1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1 (soluble)
13,18	10,98	-4,61	2,51E-09	6,12E-07	DCX	doublecortin
7,41	5,21	-4,6	1,65E-07	1,22E-05	TMEM5	transmembrane protein 5
8,73	6,53	-4,6	7,45E-06	0,0002	HS6ST1	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1
11,52	9,33	-4,58	1,61E-09	4,39E-07	GABRB3	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 3
11,25	9,05	-4,58	6,99E-08	6,33E-06	PHF19	PHD finger protein 19
9,33	7,14	-4,57	6,95E-07	3,58E-05	DCHS1	dachsous cadherin-related 1
8,79	6,61	-4,54	0,0002	0,003	NKX3-1	NK3 homeobox 1
11,1	8,93	-4,49	1,80E-08	2,37E-06	ZDHHC3	zinc finger, DHHC-type containing 3
12,72	10,56	-4,47	9,62E-10	3,13E-07	SNRPA1	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A
9,82	7,66	-4,47	9,53E-08	8,01E-06	DNAJC25-GNG10	DNAJC25-GNG10 readthrough
14,18	12,04	-4,41	1,71E-09	4,59E-07	SYT1	synaptotagmin I
10,9	8,78	-4,35	5,57E-09	1,05E-06	WRB	tryptophan rich basic protein
7,98	5,86	-4,35	3,51E-08	3,77E-06	MT1H	metallothionein 1H
11,49	9,38	-4,33	2,63E-08	3,09E-06	PHOX2A	paired-like homeobox 2a
11,58	9,47	-4,32	2,44E-07	1,61E-05	LITAF	lipopolysaccharide-induced TNF factor
12,9	10,8	-4,28	2,09E-07	1,43E-05	ZDHHC3	zinc finger, DHHC-type containing 3
13,64	11,55	-4,27	6,45E-08	6,02E-06	MT1L	metallothionein 1L (gene/pseudogene)
9,39	7,3	-4,27	2,93E-07	1,84E-05	NHEJ1	nonhomologous end-joining factor 1
8,16	6,08	-4,24	1,54E-06	6,73E-05	TAF4B	TAF4b RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 105kDa
9,74	7,66	-4,23	4,50E-08	4,64E-06	N4BP2	NEDD4 binding protein 2
12,14	10,06	-4,22	3,84E-09	8,41E-07	PTPN1	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1
10,9	8,83	-4,21	2,82E-08	3,23E-06	INSM2	insulinoma-associated 2
12,09	10,02	-4,21	4,23E-08	4,42E-06	ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta
8,1	6,02	-4,2	2,61E-07	1,68E-05	LCP1	lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)
13,8	11,73	-4,2	5,57E-06	0,0002	HIST1H3I	histone cluster 1, H3i
10,08	8,01	-4,19	1,04E-08	1,64E-06	MDH1	malate dehydrogenase 1
11,57	9,51	-4,18	3,20E-09	7,37E-07	GPN1	GPN-loop GTPase 1
11,81	9,76	-4,16	7,45E-09	1,32E-06	CCDC80; LINC01279	coiled-coil domain containing 80; long intergenic non-protein coding RNA 1279
11,71	9,65	-4,16	2,19E-08	2,76E-06	EML5	echinoderm microtubule associated protein like 5
13,59	11,54	-4,15	2,14E-08	2,73E-06	FBXO8	F-box protein 8
8,73	6,68	-4,15	1,44E-07	1,12E-05	P2RY6	pyrimidnergic receptor P2Y, G-protein coupled, 6
8,53	6,48	-4,14	8,93E-09	1,46E-06	VSTM4	V-set and transmembrane domain containing 4
6,2	4,15	-4,13	3,36E-08	3,66E-06	GREM1	gremlin 1, DAN family BMP antagonist [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2001]
12,62	10,59	-4,1	8,56E-08	7,40E-06	RSPRY1	ring finger and SPRY domain containing 1
9,1	7,06	-4,1	1,08E-06	5,10E-05	DUSP10	dual specificity phosphatase 10
8,5	6,47	-4,08	1,23E-07	9,73E-06	ITGA6	integrin alpha 6
10,56	8,53	-4,07	1,61E-07	1,22E-05	CPXM1	carboxypeptidase X (M14 family), member 1
11,97	9,95	-4,06	2,81E-09	6,65E-07	SYN2	synapsin II
9,96	7,94	-4,05	1,56E-08	2,20E-06	COMMD7	COMM domain containing 7
9,89	7,88	-4,05	6,56E-07	3,44E-05	SLC48A1	solute carrier family 48 (heme transporter), member 1
12,28	10,27	-4,03	1,61E-08	2,22E-06	RHNO1	RAD9-HUS1-RAD1 interacting nuclear orphan 1
13,86	11,85	-4,03	9,18E-08	7,77E-06	TMEM123	transmembrane protein 123
12,06	10,05	-4,02	1,22E-06	5,64E-05	FLNA	filamin A, alpha
6,06	4,05	-4,02	6,08E-05	0,0011	BAALC	brain and acute leukemia, cytoplasmic
10,04	8,03	-4,01	3,50E-08	3,77E-06	SLC39A14	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 14
13,92	11,92	-4	8,33E-09	1,39E-06	TRAPPC1	trafficking protein particle complex 1
7,11	5,11	-3,99	3,98E-09	8,62E-07	GAL	galanin/GMAP prepropeptide
11,5	9,51	-3,99	1,32E-08	1,93E-06	CHRNB4	cholinergic receptor, nicotinic beta 4
11,23	9,24	-3,97	2,59E-08	3,08E-06	ZNF423	zinc finger protein 423
13,18	11,19	-3,97	2,30E-05	0,0005	CD9	CD9 molecule
8,47	6,48	-3,96	3,20E-08	3,52E-06	SLC44A2	solute carrier family 44 (choline transporter), member 2
9,49	7,5	-3,96	8,14E-08	7,15E-06	TMEM19	transmembrane protein 19
11,26	9,28	-3,95	4,04E-07	2,39E-05	CALD1	caldesmon 1
10,82	8,84	-3,93	2,60E-08	3,08E-06	API5	apoptosis inhibitor 5
9	7,02	-3,93	6,96E-08	6,33E-06	DNER	delta/notch like EGF repeat containing
13,45	11,48	-3,92	1,14E-08	1,70E-06	MT1A	metallothionein 1A
12,29	10,32	-3,92	1,31E-08	1,93E-06	CDH18	cadherin 18, type 2
9,22	7,26	-3,91	7,50E-07	3,81E-05	AEBP1; MIR4649	AE binding protein 1; microRNA 4649
7,74	5,77	-3,9	4,64E-09	9,25E-07	CADM2	cell adhesion molecule 2
9,69	7,73	-3,9	6,08E-08	5,84E-06	DSC2	desmocollin 2
12,11	10,15	-3,89	4,38E-09	8,97E-07	FAM208A	family with sequence similarity 208, member A
11,37	9,41	-3,89	1,63E-08	2,24E-06	KPNA4	karyopherin alpha 4 (importin alpha 3)

14,07	12,11	-3,88	2,58E-08	3,08E-06	TMEM176B	transmembrane protein 176B
13,1	11,14	-3,87	1,50E-08	2,14E-06	MAP3K1	mitogen-activated protein kinase kinase 1, E3 ubiquitin protein ligase
16,23	14,28	-3,87	1,67E-08	2,26E-06	MSMO1	methylsterol monooxygenase 1
11,7	9,74	-3,87	2,48E-08	3,02E-06	LGR5	leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5
6,43	4,48	-3,87	1,68E-06	7,15E-05	CNTNAP4	contactin associated protein-like 4
9,56	7,62	-3,84	1,91E-07	1,33E-05	ALK	anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase
9,07	7,13	-3,84	5,84E-07	3,17E-05	ITGA11	integrin alpha 11
15,36	13,43	-3,83	8,23E-08	7,21E-06	SLC6A2	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 2
9,28	7,34	-3,83	1,65E-07	1,22E-05	CTSV	cathepsin V
6,9	4,97	-3,8	1,11E-05	0,0003	BAP1	BRCA1 associated protein 1
10,03	8,11	-3,78	6,41E-06	0,0002	SDC3	syndecan 3
12,39	10,48	-3,76	4,05E-07	2,39E-05	ZDHHC7	zinc finger, DHHC-type containing 7
8,11	6,21	-3,75	3,43E-08	3,72E-06	TENM4	teneurin transmembrane protein 4
13,27	11,36	-3,74	6,66E-09	1,23E-06	CDC42EP3	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3
13,6	11,69	-3,74	1,06E-08	1,64E-06	DTL	denticleless E3 ubiquitin protein ligase homolog (Drosophila)
10,76	8,85	-3,74	1,70E-07	1,24E-05	CXorf40A	chromosome X open reading frame 40A
12,6	10,7	-3,73	8,92E-09	1,46E-06	MT1G	metallothionein 1G
10,24	8,34	-3,73	1,70E-07	1,24E-05	SLC8A3	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 3
11,78	9,88	-3,73	1,57E-06	6,83E-05	SOX4	SRY box 4
9,7	7,81	-3,7	8,82E-08	7,56E-06	SPSB4	splA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 4
12,71	10,82	-3,69	2,16E-08	2,74E-06	FAM65A	family with sequence similarity 65, member A
11,05	9,17	-3,69	1,58E-06	6,84E-05	ETS2	v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2
10,09	8,21	-3,68	0,0001	0,0018	ACTG2	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric
13,63	11,76	-3,67	4,39E-09	8,97E-07	FOXM1	forkhead box M1
8,79	6,92	-3,67	7,67E-08	6,77E-06	MYCN	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog
9,45	7,58	-3,66	2,02E-06	8,21E-05	MRPL49	mitochondrial ribosomal protein L49
9,6	7,72	-3,66	2,74E-05	0,0006	PLXNA2	plexin A2
14,13	12,27	-3,65	7,06E-09	1,28E-06	MT2A	metallothionein 2A
10,73	8,87	-3,64	1,59E-06	6,85E-05	AKR1C2	aldo-keto reductase family 1, member C2
11,56	9,7	-3,63	7,59E-09	1,32E-06	PP1L3	peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 3
7,12	5,26	-3,63	6,37E-07	3,36E-05	BRINP2	bone morphogenetic protein/retinoic acid inducible neural-specific 2
10,68	8,83	-3,62	4,43E-08	4,59E-06	PVRL3	poliovirus receptor-related 3
11,28	9,43	-3,62	4,67E-08	4,74E-06	TFAP2B	transcription factor AP-2 beta (activating enhancer binding protein 2 beta)
10,67	8,83	-3,59	1,63E-07	1,22E-05	TMEM14A	transmembrane protein 14A
7,55	5,71	-3,58	2,40E-07	1,60E-05	HTR2B	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B, G protein-coupled
9,57	7,73	-3,58	1,37E-06	6,14E-05	C6orf120	chromosome 6 open reading frame 120
12,28	10,44	-3,57	2,04E-08	2,66E-06	DDC	dopa decarboxylase
11,11	9,28	-3,55	1,64E-07	1,22E-05	DHCR24	24-dehydrocholesterol reductase
7,51	5,68	-3,55	5,01E-07	2,80E-05	SPRY1	sprouty RTK signaling antagonist 1
10,86	9,03	-3,55	1,88E-06	7,77E-05	PHOX2B	paired-like homeobox 2b
6,05	4,22	-3,54	5,49E-06	0,0002	ARHGAP22	Rho GTPase activating protein 22
8,43	6,61	-3,53	5,81E-08	5,67E-06	SULF2	sulfatase 2
15,25	13,43	-3,53	9,82E-07	4,75E-05	RGS4	regulator of G-protein signaling 4
14,95	13,13	-3,52	0,0009	0,0087	HIST1H1E	histone cluster 1, H1e
10,51	8,7	-3,51	6,65E-08	6,09E-06	DES12	desumoylating isopeptidase 2
8,7	6,89	-3,5	1,03E-05	0,0003	CXCL12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12
8,5	6,7	-3,48	1,01E-06	4,82E-05	IGFBP7	insulin like growth factor binding protein 7
8,2	6,4	-3,48	4,73E-06	0,0002	FILIP1L	filamin A interacting protein 1-like
10,4	8,61	-3,47	2,46E-08	3,02E-06	TMEM183A	transmembrane protein 183A
11,18	9,39	-3,46	3,64E-07	2,19E-05	GPAT4	glycerol-3-phosphate acyltransferase 4
6,41	4,61	-3,46	0,0003	0,0042	GAB2	GRB2-associated binding protein 2
12,05	10,27	-3,45	5,29E-08	5,28E-06	PLEKHA6	pleckstrin homology domain containing, family A member 6
11,54	9,75	-3,45	1,63E-07	1,22E-05	WNK1	WNK lysine deficient protein kinase 1
8,91	7,13	-3,45	1,78E-07	1,26E-05	UTP15	UTP15, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog (S. cerevisiae)
12,62	10,84	-3,45	4,23E-07	2,47E-05	FAM8A1	family with sequence similarity 8, member A1
15,58	13,8	-3,44	1,06E-08	1,64E-06	CHRNA3	cholinergic receptor, nicotinic alpha 3
11,87	10,09	-3,43	5,12E-08	5,13E-06	MARCH11	membrane associated ring finger 11
9,9	8,13	-3,42	2,69E-07	1,70E-05	CXorf40B	chromosome X open reading frame 40B
7,38	5,61	-3,41	2,56E-07	1,67E-05	LAYN	layilin
13,33	11,57	-3,41	3,02E-06	0,0001	PARVA	parvin, alpha
8,92	7,15	-3,4	2,26E-07	1,52E-05	KCNH1	potassium channel, voltage gated eag related subfamily H, member 1
7,85	6,09	-3,4	1,75E-06	7,33E-05	CYB5E1	cytochrome b5E1
9,23	7,47	-3,4	5,68E-06	0,0002	VOPP1	vesicular, overexpressed in cancer, pro-survival protein 1
11,19	9,43	-3,39	2,12E-08	2,72E-06	XPO4	exportin 4
11,13	9,38	-3,39	2,81E-08	3,23E-06	ZNF608	zinc finger protein 608
15,7	13,93	-3,39	5,73E-08	5,61E-06	ELAVL4	ELAV like neuron-specific RNA binding protein 4
9,82	8,06	-3,39	4,63E-07	2,65E-05	SLC18A1	solute carrier family 18 (vesicular monoamine transporter), member 1
12,62	10,86	-3,39	2,47E-06	9,51E-05	GMFB	glia maturation factor, beta
11,87	10,11	-3,39	4,12E-06	0,0001	CDC37; MIR1181	cell division cycle 37; microRNA 1181
11,92	10,17	-3,37	2,98E-08	3,37E-06	VWA9	von Willebrand factor A domain containing 9
10,58	8,83	-3,37	8,59E-08	7,40E-06	RRP1B	ribosomal RNA processing 1B
12,52	10,77	-3,37	4,81E-07	2,72E-05	NLGN4X	neuroligin 4, X-linked
15,24	13,5	-3,36	2,60E-08	3,08E-06	KLF7	Kruppel-like factor 7 (ubiquitous)
10,76	9,01	-3,36	1,58E-07	1,21E-05	CNTN1	contactin 1
9,77	8,03	-3,35	8,80E-06	0,0002	EML6	echinoderm microtubule associated protein like 6
10,27	8,53	-3,34	2,49E-08	3,02E-06	LRR8D	leucine rich repeat containing 8 family, member D
11,3	9,56	-3,34	9,05E-08	7,70E-06	SIKE1	suppressor of IKBKE 1
7,23	5,49	-3,34	5,70E-06	0,0002	HIST1H4L	histone cluster 1, H4L
15,82	14,09	-3,33	1,77E-08	2,35E-06	TCF4	transcription factor 4
13,72	11,98	-3,33	3,34E-08	3,65E-06	ESRRG	estrogen-related receptor gamma
9,97	8,24	-3,31	1,35E-07	1,06E-05	BIN1	bridging integrator 1
10,13	8,41	-3,31	1,35E-06	6,10E-05	GTSE1	G-2 and S-phase expressed 1
8,75	7,02	-3,3	6,03E-08	5,83E-06	HSD17B10	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 10
9,66	7,93	-3,3	2,58E-07	1,67E-05	SRPRB	signal recognition particle receptor, B subunit
8,11	6,39	-3,3	2,46E-06	9,49E-05	APBB1	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1 (Fe65)
6,06	4,34	-3,3	5,50E-06	0,0002	RUNX1T1	runt-related transcription factor 1; translocated to, 1 (cyclin D-related)
6,92	5,2	-3,3	1,95E-05	0,0005	TMEM229A	transmembrane protein 229A
10,23	8,51	-3,3	2,55E-05	0,0006	RNF187	ring finger protein 187
6,06	4,34	-3,3	0,0002	0,0031	C1orf105	chromosome 1 open reading frame 105
12,04	10,32	-3,29	8,51E-07	4,24E-05	B4GALT2	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 2
9,68	7,97	-3,28	1,21E-07	9,61E-06	ZDHHC3	zinc finger, DHHC-type containing 3
7,4	5,69	-3,28	2,77E-05	0,0006	ISLR2	immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat 2
11,89	10,18	-3,27	2,62E-07	1,68E-05	CSorf24	chromosome 5 open reading frame 24
12,96	11,26	-3,24	1,08E-07	8,69E-06	LAMB1	laminin, beta 1
13,65	11,96	-3,24	1,12E-07	8,97E-06	WSB2	WD repeat and SOCS box containing 2
14,05	12,35	-3,24	3,34E-07	2,07E-05	COPS8	COP9 signalosome subunit 8
9,1	7,41	-3,23	1,07E-07	8,66E-06	LHFPL2	lipoma HMGIC fusion partner-like 2
10,1	8,41	-3,23	6,41E-07	3,38E-05	NFIA	nuclear factor I/A
9,49	7,8	-3,23	1,06E-06	5,01E-05	ALDH7A1	aldehyde dehydrogenase 7 family, member A1
7,96	6,27	-3,23	0,0002	0,0024	CSNK1G2	casein kinase 1, gamma 2

9,9	8,21	-3,22	3,90E-06	0,0001	ID1	inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein
8,95	7,27	-3,21	1,19E-07	9,48E-06	B3GNT5	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 5
7,19	5,51	-3,21	3,30E-06	0,0001	GPR176	G protein-coupled receptor 176
10,5	8,83	-3,19	1,47E-07	1,14E-05	KCTD1	potassium channel tetramerization domain containing 1
11,66	9,99	-3,19	2,41E-06	9,35E-05	LPAR1	lysophosphatidic acid receptor 1
8,84	7,17	-3,19	1,37E-05	0,0004	FAM217B	family with sequence similarity 217, member B
12,27	10,6	-3,18	6,29E-08	5,94E-06	TXNRD1	thioredoxin reductase 1
11,28	9,61	-3,18	6,94E-08	6,33E-06	TWIST1	twist family bHLH transcription factor 1
11,22	9,55	-3,18	1,56E-07	1,19E-05	RBL2	retinoblastoma-like 2
7,86	6,19	-3,18	2,17E-07	1,47E-05	TP53INP1	tumor protein p53 inducible nuclear protein 1
11,43	9,76	-3,18	1,52E-06	6,65E-05	RBM18	RNA binding motif protein 18
9,28	7,61	-3,18	8,71E-06	0,0002	ZNF362	zinc finger protein 362
10,92	9,26	-3,17	2,86E-06	0,0001	MINPP1	multiple inositol-polyphosphate phosphatase 1
10,13	8,47	-3,16	4,54E-08	4,66E-06	MT1M	metallothionein 1M
12,2	10,54	-3,16	5,37E-07	2,98E-05	GLRX5	glutaredoxin 5
12,23	10,57	-3,15	7,25E-08	6,48E-06	ATL3	atlastin GTPase 3
7,62	5,96	-3,15	2,70E-07	1,70E-05	SLC10A3	solute carrier family 10, member 3
9,94	8,28	-3,15	1,36E-06	6,14E-05	ERAL1	Era-like 12S mitochondrial rRNA chaperone 1
11,05	9,4	-3,15	5,31E-06	0,0002	SLC35F5	solute carrier family 35, member F5
6,71	5,06	-3,14	2,76E-05	0,0006	TNFRSF19	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19
10,43	8,79	-3,13	3,07E-06	0,0001	SLCO3A1	solute carrier organic anion transporter family, member 3A1
8,76	7,11	-3,13	0,0014	0,0123	HIST1H3D; HIST1H2AD	histone cluster 1, H3d; histone cluster 1, H2ad
13,49	11,84	-3,12	1,96E-07	1,35E-05	NFATC3	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 3
7,37	5,73	-3,12	2,25E-07	1,51E-05	GLUD2	glutamate dehydrogenase 2
10,73	9,09	-3,12	3,91E-06	0,0001	CD46	CD46 molecule, complement regulatory protein
12,87	11,23	-3,11	1,94E-07	1,34E-05	CEP44	centrosomal protein 44kDa
9,65	8,02	-3,11	9,28E-07	4,53E-05	COX18	COX18 cytochrome c oxidase assembly factor
10,9	9,27	-3,11	4,24E-06	0,0001	MRPL40	mitochondrial ribosomal protein L40
10,83	9,2	-3,1	7,84E-07	3,96E-05	MAD2L2	MAD2 mitotic arrest deficient-like 2 (yeast)
8,86	7,23	-3,1	2,02E-05	0,0005	CDC25C	cell division cycle 25C
13,5	11,87	-3,08	6,34E-08	5,94E-06	XPOT	exportin, tRNA
11,96	10,34	-3,08	6,63E-08	6,09E-06	CHGB	chromogranin B
10,08	8,45	-3,08	3,04E-06	0,0001	FBN1	fibrillin 1
13,34	11,72	-3,07	1,45E-07	1,12E-05	MT1B; MT1CP	metallothionein 1B; metallothionein 1C, pseudogene
8,67	7,05	-3,07	1,44E-06	6,40E-05	SCGN	secretagogin, EF-hand calcium binding protein
14,84	13,22	-3,06	2,32E-07	1,55E-05	YTHDF3	YTH N(6)-methyladenosine RNA binding protein 3
7,96	6,34	-3,06	4,13E-06	0,0001	EMLS	Transcript Identified by AceView, Entrez Gene ID(s) 161436
10,19	8,58	-3,05	2,10E-07	1,43E-05	TMEM183B	transmembrane protein 183B
9,26	7,66	-3,05	1,30E-06	5,97E-05	MOAP1	modulator of apoptosis 1
9,52	7,91	-3,04	8,85E-08	7,56E-06	PCDH17	protocadherin 17
13,99	12,38	-3,04	1,72E-07	1,24E-05	CRKL	v-crk avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog-like
4,52	2,92	-3,04	9,17E-07	4,49E-05	AGTR1	angiotensin II receptor, type 1
9,52	7,92	-3,04	3,40E-05	0,0007	RAB31	RAB31, member RAS oncogene family
12,1	10,5	-3,03	4,63E-08	4,73E-06	DCN	decorin
8,09	6,48	-3,03	1,04E-07	8,39E-06	TIMELESS	timeless circadian clock
12,4	10,8	-3,03	5,60E-07	3,06E-05	GOLT1B	golgi transport 1B
10,25	8,65	-3,02	4,97E-06	0,0002	ATP1B3	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 3 polypeptide
14,56	12,97	-3,01	7,46E-08	6,62E-06	MAB21L1	mab-21-like 1 (C. elegans)
11,44	9,85	-3,01	3,55E-07	2,17E-05	LIMCH1	LIM and calponin homology domains 1
10,18	8,59	-3,01	4,45E-07	2,58E-05	NCBP2-AS2	NCBP2 antisense RNA 2 (head to head)
6,49	4,9	-3	4,62E-06	0,0002	AQP1	aquaporin 1 (Colton blood group)
6,21	4,62	-3	6,29E-06	0,0002	P2RX3	purinergic receptor P2X, ligand gated ion channel, 3
13,67	12,09	-2,99	1,37E-07	1,07E-05	UNC5C	unc-5 netrin receptor C
10,9	9,31	-2,99	2,18E-06	8,71E-05	ELOVL2	ELOVL fatty acid elongase 2
8,42	6,84	-2,99	2,33E-06	9,11E-05	JADE3	jade family PHD finger 3
11,05	9,47	-2,99	4,30E-06	0,0001	HIST1H2AB	histone cluster 1, H2ab
9,86	8,28	-2,98	6,03E-08	5,83E-06	KIF26B	kinesin family member 26B
6,55	4,98	-2,96	3,76E-06	0,0001	C7	complement component 7
12,33	10,77	-2,94	6,31E-08	5,94E-06	B4GALT5	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 5
14,72	13,17	-2,93	6,75E-07	3,50E-05	LPCAT2	lysophosphatidylcholine acyltransferase 2
11,19	9,64	-2,93	6,68E-06	0,0002	STAC	SH3 and cysteine rich domain
11,07	9,53	-2,91	3,70E-06	0,0001	CCNJ	cyclin J
7,54	6	-2,91	0,0005	0,0006	SSX4B	synovial sarcoma, X breakpoint 4B
9,34	7,8	-2,9	4,52E-07	2,61E-05	PGM1	phosphoglucomutase 1
7,73	6,19	-2,9	1,50E-06	6,57E-05	SLC29A3	solute carrier family 29 (equilibrative nucleoside transporter), member 3
6,2	4,67	-2,9	2,62E-06	9,91E-05	STS	steroid sulfatase (microsomal), isozyme S
9,6	8,06	-2,9	0,0002	0,0026	ANTXR2	anthrax toxin receptor 2
11,07	9,54	-2,89	1,67E-06	7,14E-05	NHSL2	NHS-like 2
13,31	11,78	-2,88	1,00E-06	4,81E-05	NDFIP1	Nedd4 family interacting protein 1
7,51	5,99	-2,87	1,59E-06	6,85E-05	PDGFRA	platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide
8,96	7,44	-2,87	2,22E-06	8,82E-05	ARID1B	AT rich interactive domain 1B (SWI1-like)
8,61	7,1	-2,86	1,03E-07	8,35E-06	ADAMTS19	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 19
12,18	10,66	-2,86	2,56E-06	9,76E-05	FKBP5	FK506 binding protein 5
9,81	8,3	-2,85	2,07E-06	8,33E-05	FANCC	Fanconi anemia complementation group C
11,84	10,33	-2,85	1,21E-05	0,0003	MCFD2	multiple coagulation factor deficiency 2
7,67	6,16	-2,85	1,91E-05	0,0005	TLX2	T-cell leukemia homeobox 2
9,04	7,53	-2,85	4,98E-05	0,001	AURKB	aurora kinase B
14,68	13,18	-2,84	6,10E-08	5,84E-06	NBEA	neurobeachin
11,07	9,56	-2,84	9,02E-07	4,44E-05	POPDC3	popeye domain containing 3
10,41	8,9	-2,84	2,95E-06	0,0001	CLMP	CXADR-like membrane protein
5,37	3,87	-2,84	1,23E-05	0,0003	KLLN	killin, p53-regulated DNA replication inhibitor
9,41	7,91	-2,83	1,48E-06	6,53E-05	TXNDC16	thioredoxin domain containing 16
10,12	8,62	-2,82	7,60E-07	3,85E-05	NKAIN1	Na ⁺ /K ⁺ transporting ATPase interacting 1
13,5	12	-2,81	9,41E-07	4,57E-05	DCTN5	dynactin 5 (p25)
9,3	7,81	-2,81	2,54E-06	9,72E-05	MORN4	MORN repeat containing 4
8,11	6,62	-2,81	2,81E-06	0,0001	ABCB10	ATP binding cassette subfamily B member 10
12,76	11,27	-2,8	7,54E-07	3,83E-05	IST1	increased sodium tolerance 1 homolog (yeast)
5,51	4,03	-2,8	8,81E-05	0,0015	RG58	regulator of G-protein signaling 8
9,7	8,22	-2,8	0,0001	0,0019	HIST1H3A	histone cluster 1, H3a
13,21	11,73	-2,79	1,12E-07	8,96E-06	BVES	blood vessel epicardial substance
11,03	9,55	-2,79	1,63E-07	1,22E-05	ERLIN1	ER lipid raft associated 1
8,53	7,05	-2,79	1,43E-05	0,0004	BDNF	brain-derived neurotrophic factor
7,63	6,16	-2,78	2,69E-07	1,70E-05	RCBTB2	regulator of chromosome condensation (RCC1) and BTB (POZ) domain containing protein 2
14,47	12,99	-2,78	3,05E-06	0,0001	SLC35B2; MIR4647	solute carrier family 35 (adenosine 3-phospho 5-phosphosulfate transporter), member B2; microRNA 464
8,31	6,84	-2,78	3,41E-06	0,0001	TSPAN14	tetraspanin 14
10,6	9,13	-2,78	4,20E-06	0,0001	LZTFL1	leucine zipper transcription factor like 1
8,06	6,59	-2,78	1,51E-05	0,0004	SEMA6C	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6C
7,25	5,77	-2,78	1,67E-05	0,0004	C14orf132	chromosome 14 open reading frame 132
10,77	9,3	-2,77	9,96E-07	4,79E-05	PDZRN3	PDZ domain containing ring finger 3
8,96	7,49	-2,77	1,69E-06	7,17E-05	GINS4	GINS complex subunit 4 (Sld5 homolog)

ANEXOS – ANEXO 2

7,66	6,19	-2,77	4,93E-06	0,0002	CLSTN2	calsyntenin 2
10,85	9,38	-2,77	4,97E-06	0,0002	PSMG3	proteasome (prosome, macropain) assembly chaperone 3
14,68	13,21	-2,77	0,0003	0,0036	SLC31A1	solute carrier family 31 (copper transporter), member 1
13,68	12,21	-2,76	1,03E-07	8,35E-06	SRSF4	serine/arginine-rich splicing factor 4
9,76	8,3	-2,76	8,76E-06	0,0002	RPS6KB2	ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 2
11,09	9,63	-2,76	6,35E-05	0,0012	DSC3	desmocollin 3
9,08	7,61	-2,76	0,0004	0,0051	LPCAT3	lysophosphatidylcholine acyltransferase 3
9,88	8,42	-2,75	1,65E-05	0,0004	VLDLR	very low density lipoprotein receptor
14,53	13,08	-2,74	3,57E-07	2,17E-05	SLIT3	slit guidance ligand 3
13,06	11,61	-2,74	1,44E-06	6,40E-05	BLOC156	biogenesis of lysosomal organelles complex-1, subunit 6, pallidin
11,36	9,9	-2,74	2,42E-06	9,38E-05	PDCD4; MIR4680	programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor); microRNA 4680
10,76	9,3	-2,74	7,76E-06	0,0002	HIPK3	homeodomain interacting protein kinase 3
13,39	11,94	-2,74	1,25E-05	0,0003	MT1X	metallothionein 1X
10,93	9,48	-2,74	5,66E-05	0,0011	ASAP1; ASAP1-IT2	ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 1; ASAP1 intronic transcript 2
11,1	9,66	-2,73	1,73E-07	1,25E-05	PRDM4	PR domain containing 4
10,48	9,04	-2,73	2,78E-06	0,0001	PLAT	plasminogen activator, tissue
10,44	8,99	-2,73	3,34E-06	0,0001	E2F8	E2F transcription factor 8
11,05	9,61	-2,73	6,73E-06	0,0002	CTDSP2	CTD small phosphatase 2
12,3	10,85	-2,73	1,40E-05	0,0004	IQGAP1	IQ motif containing GTPase activating protein 1
7,05	5,6	-2,73	0,0008	0,0079	PLEKHA6	Transcript Identified by AceView, Entrez Gene ID(s) 22874
15,71	14,26	-2,73	0,0015	0,0133	HIST1H2BM	histone cluster 1, H2bm
13,55	12,11	-2,72	8,39E-07	4,20E-05	ERGIC1	endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment 1
10,02	8,58	-2,72	6,16E-06	0,0002	TRMU	tRNA 5-methylaminomethyl-2-thiouridylate methyltransferase
10,18	8,74	-2,72	2,58E-05	0,0006	TCF20	transcription factor 20 (AR1)
10,18	8,74	-2,72	2,58E-05	0,0006	TCF20	transcription factor 20 (AR1)
13,02	11,58	-2,71	1,94E-07	1,34E-05	LONP2	lon peptidase 2, peroxisomal
12,71	11,27	-2,71	4,91E-07	2,77E-05	UBE2N	ubiquitin conjugating enzyme E2N
8,04	6,61	-2,71	3,20E-06	0,0001	MTURN	maturin, neural progenitor differentiation regulator homolog (Xenopus)
7,11	5,68	-2,7	3,78E-06	0,0001	C11orf96	chromosome 11 open reading frame 96
13,48	12,05	-2,69	2,14E-07	1,46E-05	FAM60A	family with sequence similarity 60, member A
11,03	9,6	-2,69	6,73E-07	3,50E-05	UGDH	UDP-glucose 6-dehydrogenase
8,88	7,45	-2,69	8,75E-06	0,0002	NTRK1	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1
11,38	9,95	-2,69	2,93E-05	0,0006	ITPR1	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 1
10,38	8,96	-2,68	4,92E-07	2,77E-05	CPD	carboxypeptidase D
5,93	4,5	-2,68	8,78E-06	0,0002	SCUBE1	signal peptide, CUB domain, EGF-like 1
12,62	11,21	-2,67	4,21E-07	2,47E-05	HBP1	HMG-box transcription factor 1
7,63	6,21	-2,67	1,74E-06	7,32E-05	EGFLAM	EGF-like, fibronectin type III and laminin G domains
5,74	4,32	-2,67	1,68E-05	0,0004	BMP6	bone morphogenetic protein 6
8,47	7,05	-2,67	1,69E-05	0,0004	TEX2	testis expressed 2
8,95	7,54	-2,66	4,69E-07	2,67E-05	KLF11	Kruppel-like factor 11
8,61	7,2	-2,66	1,10E-06	5,17E-05	TIAM1	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1
12,76	11,35	-2,66	1,25E-06	5,73E-05	FAM167A	family with sequence similarity 167, member A
8,9	7,48	-2,66	3,73E-06	0,0001	CCDC58	coiled-coil domain containing 58
5,85	4,44	-2,66	5,30E-05	0,001	KCNMA1	potassium channel, calcium activated large conductance subfamily M alpha, member 1
12,24	10,84	-2,65	1,45E-06	6,44E-05	C6orf48; SNORD52/48	chromosome 6 open reading frame 48; small nucleolar RNA, C/D box 52; small nucleolar RNA, C/D box 48
9,68	8,28	-2,65	3,39E-06	0,0001	IKZF5	IKAROS family zinc finger 5
11,15	9,74	-2,65	9,50E-06	0,0003	GLT8D1	glycosyltransferase 8 domain containing 1
9,57	8,17	-2,65	3,30E-05	0,0007	MFAP4	microfibrillar associated protein 4
11,14	9,73	-2,65	4,57E-05	0,0009	STRA6	stimulated by retinoic acid 6
7,52	6,12	-2,65	0,0002	0,0026	RAMP2	receptor (G protein-coupled) activity modifying protein 2
8,38	6,98	-2,64	9,55E-08	8,01E-06	RBFOX1	RNA binding protein, fox-1 homolog (C. elegans) 1
12,82	11,42	-2,64	3,37E-07	2,07E-05	DCAF16	DDI1 and CUL4 associated factor 16
10,33	8,93	-2,64	2,30E-06	9,04E-05	PLEKHA1	pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 1
12,61	11,21	-2,64	4,77E-06	0,0002	NRM	nurim (nuclear envelope membrane protein)
5,47	4,07	-2,64	5,49E-06	0,0002	ANGPT2	angiopoietin 2
12,49	11,09	-2,64	3,46E-05	0,0007	RALY	RALY heterogeneous nuclear ribonucleoprotein
10,77	9,37	-2,63	6,62E-07	3,46E-05	RFX5	regulatory factor X, 5 (influences HLA class II expression)
9,36	7,96	-2,63	1,66E-05	0,0004	DPP6	dipeptidyl-peptidase 6
12,66	11,27	-2,62	1,70E-07	1,24E-05	NCOA4	nuclear receptor coactivator 4
11,17	9,78	-2,62	5,42E-07	3,00E-05	ITGAV	integrin alpha V
9,88	8,49	-2,62	1,82E-06	7,56E-05	PHLDA1	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1
11,57	10,18	-2,62	2,94E-06	0,0001	AK5	adenylate kinase 5
10,71	9,33	-2,61	4,95E-07	2,78E-05	NAPB	N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein, beta
11,64	10,26	-2,61	6,50E-05	0,0012	HIST2H3A; HIST2H3C	histone cluster 2, H3a; histone cluster 2, H3c
12,23	10,85	-2,61	0,0003	0,0041	TBX2	T-box 2
11,5	10,11	-2,61	0,0043	0,0292	FAM134C	family with sequence similarity 134, member C
12,24	10,87	-2,6	1,16E-06	5,41E-05	CDC6	cell division cycle 6
9,37	7,99	-2,6	1,31E-06	5,97E-05	FBXL20	F-box and leucine-rich repeat protein 20
9,66	8,28	-2,6	4,09E-05	0,0008	SLC19A2	solute carrier family 19 (thiamine transporter), member 2
12,21	10,84	-2,59	1,58E-06	6,83E-05	NUP214	nucleoporin 214kDa
10,19	8,81	-2,59	1,78E-06	7,43E-05	SH3RF1	SH3 domain containing ring finger 1
7,57	6,19	-2,59	3,61E-06	0,0001	OPN3	opsin 3
10,69	9,33	-2,58	7,36E-07	3,75E-05	CPEB4	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4
12,97	11,6	-2,58	1,56E-06	6,79E-05	GNA13	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 13
7,16	5,79	-2,58	0,0002	0,0029	SSX4B; SSX4	synovial sarcoma, X breakpoint 4B; synovial sarcoma, X breakpoint 4
12,85	11,48	-2,58	0,0005	0,0332	FAU	Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV) ubiquitously expressed
9,72	8,36	-2,57	2,18E-06	8,71E-05	FARP2	FERM, ARH/RhoGEF and pleckstrin domain protein 2
9,02	7,65	-2,57	4,13E-06	0,0001	GPD2	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2
6,46	5,1	-2,57	0,0002	0,0023	SKIDA1	SKI/DACH domain containing 1
12,28	10,92	-2,56	7,01E-07	3,60E-05	CBX1	chromobox homolog 1
6,99	5,63	-2,56	2,03E-06	8,22E-05	XKRX	X-linked Kx blood group related, X-linked
11,05	9,69	-2,56	2,18E-06	8,71E-05	USP4	ubiquitin specific peptidase 4 (proto-oncogene)
7,54	6,18	-2,56	4,50E-06	0,0001	SYCP2	synaptonemal complex protein 2
8,22	6,87	-2,56	9,25E-06	0,0003	DNPEP	aspartyl aminopeptidase
8,54	7,18	-2,56	0,0001	0,0017	PITPNC1	phosphatidylinositol transfer protein, cytoplasmic 1
10,94	9,59	-2,55	8,47E-07	4,23E-05	NAV2	neuron navigator 2
6,76	5,41	-2,55	1,18E-05	0,0003	LRRC32	leucine rich repeat containing 32
7,89	6,54	-2,55	2,58E-05	0,0006	RASL11B	RAS-like, family 11, member B
6,15	4,81	-2,54	1,74E-06	7,31E-05	NTM	neurotrimin
13,77	12,43	-2,54	2,06E-06	8,31E-05	HIST1H2BD	histone cluster 1, H2bd
11,15	9,81	-2,54	4,03E-05	0,0008	GTF3C2	general transcription factor IIIc subunit 2
7,62	6,28	-2,54	0,0004	0,0043	MAGEA10	MAGE family member A10
10,09	8,75	-2,53	4,87E-06	0,0002	SIAH2	siah E3 ubiquitin protein ligase 2
12,97	11,63	-2,53	9,85E-06	0,0003	NEFM	neurofilament, medium polypeptide
7,52	6,18	-2,53	2,42E-05	0,0006	ZNF512B	zinc finger protein 512B
10,6	9,27	-2,52	1,71E-06	7,23E-05	EP300; MIR1281	E1A binding protein p300; microRNA 1281
11,5	10,17	-2,52	2,82E-06	0,0001	SLC25A32	solute carrier family 25 (mitochondrial folate carrier), member 32
10,94	9,6	-2,52	4,31E-06	0,0001	ACAT2	acetyl-CoA acetyltransferase 2
8,79	7,46	-2,52	4,42E-06	0,0001	PAN2; CNPY2	PAN2 poly(A) specific ribonuclease subunit; canopy FGF signaling regulator 2
11,42	10,09	-2,51	2,98E-06	0,0001	ZDHHC2	zinc finger, DHHC-type containing 2

12,16	10,83	-2,51	4,78E-06	0,0002	OAT	ornithine aminotransferase
6,16	4,84	-2,51	1,04E-05	0,0003	GREM1	gremlin 1, DAN family BMP antagonist [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2001]
5,47	4,15	-2,51	0,0004	0,0044	ST3GAL2	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 2
5,43	4,11	-2,51	0,0004	0,0051	SEMA5A	sema domain, seven thrombospondin repeats (type 1 and type 1-like), transmembrane domain (TM) and
14,12	12,8	-2,5	5,28E-06	0,0002	CHST11	carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 11
6,78	5,46	-2,5	0,0002	0,0029	TAGLN	transgelin
7,43	6,11	-2,49	2,21E-06	8,81E-05	CNN1	calponin 1, basic, smooth muscle
8,65	7,33	-2,49	2,57E-06	9,77E-05	PLPP4	phospholipid phosphatase 4
8,51	7,2	-2,49	4,52E-06	0,0001	BICC1	Bicc family RNA binding protein 1
10,24	8,92	-2,49	4,87E-06	0,0002	UROS	uroporphyrinogen III synthase
11,64	10,32	-2,49	6,94E-06	0,0002	PROSER1	proline and serine rich 1
12,45	11,14	-2,48	7,28E-07	3,72E-05	DARS2	aspartyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial
9,36	8,05	-2,48	3,76E-06	0,0001	IGFBPL1	insulin like growth factor binding protein-like 1
7,79	6,48	-2,48	7,94E-06	0,0002	SLC2A6	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 6 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11011
11,73	10,42	-2,48	8,18E-06	0,0002	CHRNA7	cholinergic receptor, nicotinic alpha 7
14,36	13,04	-2,48	4,50E-05	0,0009	UQCRC2	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II
10,79	9,48	-2,47	2,99E-06	0,0001	TCF20	transcription factor 20 (AR1)
10,79	9,48	-2,47	2,99E-06	0,0001	TCF20	transcription factor 20 (AR1)
7,87	6,56	-2,47	4,34E-06	0,0001	RPS6KA5	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 5
8,16	6,85	-2,47	1,03E-05	0,0003	COL6A6	collagen, type VI, alpha 6
11,56	10,26	-2,47	0,0001	0,002	HIST2H3A	histone cluster 2, H3a
12,05	10,75	-2,46	3,84E-07	2,30E-05	THSD7A	thrombospondin type 1 domain containing 7A
13,11	11,81	-2,46	6,62E-07	3,46E-05	CAMTA1	calmodulin binding transcription activator 1
10,25	8,95	-2,46	2,86E-06	0,0001	ELMO2	engulfment and cell motility 2
9,59	8,29	-2,46	3,92E-05	0,0008	MSH3	mutS homolog 3
9,45	8,15	-2,46	8,84E-05	0,0015	ZNF618	zinc finger protein 618
13,32	12,03	-2,45	9,60E-07	4,65E-05	RQCD1	RCD1 required for cell differentiation1 homolog (S. pombe)
8,58	7,28	-2,45	3,96E-06	0,0001	KLHL2	kelch-like family member 2
6,76	5,47	-2,45	4,23E-06	0,0001	TMEM86A	transmembrane protein 86A
6,29	5	-2,45	0,0001	0,0019	CHRM1	cholinergic receptor, muscarinic 1
6,39	5,1	-2,44	1,91E-06	7,87E-05	LRRC17	leucine rich repeat containing 17
8,11	6,83	-2,44	0,0001	0,002	NTNG1	netrin G1
12,84	11,55	-2,44	0,0001	0,0022	HIST1H2AG	histone cluster 1, H2ag
5,69	4,41	-2,44	0,0002	0,0031	CNKSr3	CNKSr family member 3
10,16	8,88	-2,43	4,69E-07	2,67E-05	ARRDC3	arrestin domain containing 3
9,05	7,77	-2,43	1,13E-06	5,29E-05	CDK5	cyclin-dependent kinase-like 5
13,28	12	-2,43	1,22E-06	5,64E-05	LEF1	lymphoid enhancer-binding factor 1
13,86	12,58	-2,43	2,91E-06	0,0001	RPS25	ribosomal protein S25
10,11	8,83	-2,43	4,93E-06	0,0002	KIF14	kinesin family member 14
9,42	8,14	-2,43	5,99E-05	0,0011	LDLR; MIR6886	low density lipoprotein receptor; microRNA 6886
10,41	9,13	-2,43	6,76E-05	0,0012	ZNF639	zinc finger protein 639
10,58	9,31	-2,42	5,34E-07	2,97E-05	RPS6KA2	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 2
9,32	8,04	-2,42	2,74E-06	0,0001	KCNJ8	potassium channel, inwardly rectifying subfamily J, member 8
9,45	8,18	-2,42	4,13E-06	0,0001	LSAMP	limbic system-associated membrane protein
8,16	6,89	-2,42	1,27E-05	0,0003	NMU	neuromedin U
8,11	6,83	-2,42	1,58E-05	0,0004	MED30	mediator complex subunit 30
7,53	6,25	-2,42	4,76E-05	0,0009	SLC2A6	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 6 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11011
7,48	6,2	-2,42	5,32E-05	0,001	KCTD15	potassium channel tetramerization domain containing 15
8,47	7,19	-2,42	0,0004	0,005	ETV4	ets variant 4
9,68	8,41	-2,42	0,0007	0,0075	AMOTL1	angiominin like 1
11,91	10,64	-2,41	4,99E-07	2,79E-05	PIP4K2A	phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase, type II, alpha
13,86	12,59	-2,41	8,39E-06	0,0002	SSRP1	structure specific recognition protein 1
7,36	6,09	-2,41	2,82E-05	0,0006	CEP85	centrosomal protein 85kDa
8,55	7,28	-2,41	0,0003	0,0043	XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis, E3 ubiquitin protein ligase
11,5	10,24	-2,4	1,40E-06	6,29E-05	PRKD3	protein kinase D3
9,94	8,67	-2,4	1,67E-06	7,14E-05	ZNRF2	zinc and ring finger 2, E3 ubiquitin protein ligase
12,87	11,61	-2,4	4,16E-06	0,0001	DERL1	derlin 1
8,47	7,21	-2,4	7,62E-06	0,0002	RFXAP	regulatory factor X-associated protein
7,8	6,53	-2,4	7,54E-05	0,0014	FKBP1A-SDCBP2	FKBP1A-SDCBP2 readthrough (NMD candidate)
8,84	7,58	-2,4	0,0009	0,009	SCD5	stearyl-CoA desaturase 5
11,3	10,04	-2,39	4,54E-06	0,0001	MPV17L2	MPV17 mitochondrial membrane protein-like 2
13,89	12,63	-2,39	5,40E-06	0,0002	NDUFA3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 3, 9kDa
8,97	7,71	-2,39	8,50E-06	0,0002	MAOA	monoamine oxidase A
6,8	5,54	-2,39	1,70E-05	0,0004	MYT1	myelin transcription factor 1
7,14	5,88	-2,39	2,81E-05	0,0006	GEM	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle
11,55	10,3	-2,39	0,0002	0,0032	ARAF	A-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
17,23	15,98	-2,38	6,73E-07	3,50E-05	RPL18A; SNORA68	ribosomal protein L18a; small nucleolar RNA, H/ACA box 68
7,96	6,71	-2,38	1,21E-05	0,0003	SYT17	synaptotagmin XVII
12,17	10,92	-2,38	3,39E-05	0,0007	ASNS	asparagine synthetase (glutamine-hydrolyzing)
9,42	8,17	-2,38	3,96E-05	0,0008	GPR155	G protein-coupled receptor 155
13,74	12,49	-2,38	5,67E-05	0,0011	PNRC1	proline-rich nuclear receptor coactivator 1
8,16	6,91	-2,38	0,0005	0,0052	PCYT1B	phosphate cytidylyltransferase 1, choline, beta
11,65	10,4	-2,37	3,41E-05	0,0007	SQLE	squalene epoxidase
13,34	12,09	-2,37	0,0001	0,0017	HIST1H2BG	histone cluster 1, H2bg
9,36	8,12	-2,37	0,0002	0,0031	MAT2B	methionine adenosyltransferase II, beta
10,85	9,61	-2,36	1,23E-06	5,66E-05	PLPPR4	phospholipid phosphatase related 4
12,44	11,21	-2,36	1,87E-06	7,72E-05	KPNA6	karyopherin alpha 6 (importin alpha 7)
11,76	10,52	-2,36	2,31E-06	9,04E-05	RCN1	reticulocalbin 1, EF-hand calcium binding domain
8,65	7,41	-2,36	8,58E-05	0,0015	DLX6	distal-less homeobox 6
9,98	8,73	-2,36	0,0004	0,0049	UCP2	uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)
10,22	8,98	-2,36	0,0045	0,0302	PFDN4	prefoldin subunit 4
15,34	14,1	-2,35	4,64E-06	0,0002	EML4	echinoderm microtubule associated protein like 4
10,15	8,92	-2,35	1,04E-05	0,0003	FAM105A	family with sequence similarity 105, member A
9,16	7,93	-2,35	4,45E-05	0,0009	MVK	mevalonate kinase
8,69	7,46	-2,35	5,14E-05	0,001	ZDHHC3	zinc finger, DHHC-type containing 3
8,09	6,86	-2,34	1,79E-06	7,48E-05	DBNDD1	dysbindin (dystrobrevin binding protein 1) domain containing 1
11,72	10,49	-2,34	3,43E-06	0,0001	PRKAB1	protein kinase, AMP-activated, beta 1 non-catalytic subunit
14,72	13,49	-2,34	5,80E-06	0,0002	FDFT1	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1
10,85	9,63	-2,34	0,0001	0,0017	CHAF1A	chromatin assembly factor 1, subunit A (p150)
8,24	7,02	-2,33	4,12E-06	0,0001	LRRC55	leucine rich repeat containing 55
5,15	3,93	-2,33	1,15E-05	0,0003	LHPP	phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase
8,39	7,17	-2,33	1,22E-05	0,0003	PDE7B	phosphodiesterase 7B
7,86	6,64	-2,33	3,45E-05	0,0007	DSCR4	Down syndrome critical region 4
9,94	8,73	-2,33	4,06E-05	0,0008	MMAB	methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblB type
12,56	11,34	-2,33	0,0001	0,002	TLE4	transducin-like enhancer of split 4
12,38	11,16	-2,33	0,0001	0,002	HIST2H2AB	histone cluster 2, H2ab
9,69	8,47	-2,33	0,0005	0,0055	TSHZ2	teashirt zinc finger homeobox 2
8,2	6,98	-2,32	1,50E-05	0,0004	CYB561A3	cytochrome b561 family, member A3
15,23	14,01	-2,32	1,66E-05	0,0004	RRM2	ribonucleotide reductase M2
10,18	8,96	-2,32	3,56E-05	0,0008	MIOS	missing oocyte, meiosis regulator, homolog (Drosophila)

7,56	6,35	-2,32	5,76E-05	0,0011	SLC7A14	solute carrier family 7, member 14
5,42	4,2	-2,32	0,0007	0,0076	ARHGEF3	Rho guanine nucleotide exchange factor 3
17,46	16,25	-2,31	1,47E-06	6,50E-05	MLLT11	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 11
11,07	9,86	-2,31	1,50E-05	0,0004	PQBP1	polyglutamine binding protein 1
9,65	8,44	-2,31	2,78E-05	0,0006	ARHGEF28	Rho guanine nucleotide exchange factor 28
7,93	6,72	-2,31	3,69E-05	0,0008	LIPA	lipase A, lysosomal acid, cholesterol esterase
10,53	9,33	-2,31	5,38E-05	0,001	DZIP1	DAZ interacting zinc finger protein 1
9,1	7,89	-2,31	6,09E-05	0,0011	CALCOCO2	calcium binding and coiled-coil domain 2
9,23	8,02	-2,31	0,0002	0,0027	RNF24	ring finger protein 24
10,76	9,56	-2,3	8,40E-06	0,0002	TCF20	transcription factor 20 (AR1)
10,76	9,56	-2,3	8,40E-06	0,0002	TCF20	transcription factor 20 (AR1)
6,73	5,53	-2,3	9,98E-05	0,0017	FBX08	Transcript Identified by AceView, Entrez Gene ID(s) 26269
9,19	7,99	-2,3	0,0003	0,0035	FAM210B	family with sequence similarity 210, member B
9,08	7,77	-2,3	0,0014	0,0123	PXMP4	peroxisomal membrane protein 4
11,97	10,88	-2,29	1,03E-06	4,91E-05	KLHL15	kelch-like family member 15
6,15	4,95	-2,29	6,38E-06	0,0002	INO80C	INO80 complex subunit C
9,15	7,95	-2,29	1,05E-05	0,0003	ZNF620	zinc finger protein 620
8,1	6,91	-2,29	5,63E-05	0,0011	CHST15	carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-sulfate 6-O) sulfotransferase 15
8,39	7,2	-2,29	6,66E-05	0,0012	SLC2A6	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 6
6,32	5,13	-2,29	0,0002	0,0024	GREM1	gremlin 1, DAN family BMP antagonist
8,58	7,38	-2,29	0,0004	0,0048	UNG	uracil DNA glycosylase
11,98	10,79	-2,28	1,65E-06	7,07E-05	BAMBI	BMP and activin membrane-bound inhibitor
11,93	10,75	-2,28	3,71E-06	0,0001	CUL1	cullin 1
13,79	12,6	-2,28	1,24E-05	0,0003	RBMS3	RNA binding motif, single stranded interacting protein 3
9,66	8,47	-2,28	1,82E-05	0,0004	EVL	Enah/Vasp-like
8,59	7,4	-2,28	2,23E-05	0,0005	NRG1	neuregulin 1
9,9	8,71	-2,28	4,40E-05	0,0009	XRN1	5-3 exoribonuclease 1
8,13	6,95	-2,27	7,00E-06	0,0002	FAM214A	family with sequence similarity 214, member A
8,33	7,15	-2,27	0,0001	0,0017	PLXNA4	plexin A4
8,91	7,73	-2,27	0,0001	0,0018	MOCS1	molybdenum cofactor synthesis 1
5	3,82	-2,27	0,0003	0,0041	ARHGAP36	Rho GTPase activating protein 36
6,72	5,54	-2,27	0,0009	0,009	RAB40B	RAB40B, member RAS oncogene family
11,19	10,01	-2,26	1,31E-06	5,97E-05	TAB3	TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 3
7,22	6,04	-2,26	9,48E-06	0,0003	ZNF45	zinc finger protein 45
4,66	3,48	-2,26	1,36E-05	0,0004	NRP2	neuropilin 2
9,29	8,12	-2,26	2,78E-05	0,0006	TBC1D25	TBC1 domain family, member 25
8,92	7,74	-2,26	4,01E-05	0,0008	PLEKHM3	pleckstrin homology domain containing, family M, member 3
9,47	8,29	-2,26	0,0002	0,0032	SLC30A1	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1
9,22	8,04	-2,26	0,0002	0,0032	FN1	fibronectin 1
5,61	4,43	-2,26	0,0006	0,0069	TAS2R5	taste receptor, type 2, member 5
6,2	5,02	-2,26	0,0007	0,0074	A2BP1	Transcript Identified by AceView, Entrez Gene ID(s) 54715
15,68	14,5	-2,26	0,0029	0,0218	HIST1H1B	histone cluster 1, H1b
6,09	4,92	-2,25	2,95E-05	0,0007	FGL1	fibrinogen like 1
11,23	10,06	-2,25	0,0001	0,002	DNAJC16	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 16
8,53	7,36	-2,25	0,001	0,0099	COL3A1; MIR3606	collagen, type III, alpha 1; microRNA 3606
9,27	8,11	-2,24	3,25E-06	0,0001	SYNM	synemin, intermediate filament protein
8,01	6,85	-2,24	4,08E-06	0,0001	SYT4	synaptotagmin IV
8,21	7,04	-2,24	1,11E-05	0,0003	MLLT1	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 11
8,76	7,6	-2,24	1,16E-05	0,0003	TM2D3	TM2 domain containing 3
6,67	5,51	-2,24	1,80E-05	0,0004	TRIAP1	TP53 regulated inhibitor of apoptosis 1
16,71	15,54	-2,24	2,99E-05	0,0007	MAP1B	microtubule associated protein 1B
6,71	5,55	-2,24	3,48E-05	0,0007	TLN2	talin 2
13,7	12,54	-2,24	0,0001	0,002	TMEM108	transmembrane protein 108
6,06	4,89	-2,24	0,0006	0,0061	ACE	angiotensin I converting enzyme
6,83	5,67	-2,24	0,0095	0,0526	PLD5	phospholipase D family, member 5
13,8	12,64	-2,23	5,40E-06	0,0002	CCSER2	coiled-coil serine rich protein 2
13,68	12,52	-2,23	1,09E-05	0,0003	LRBA	LPS-responsive vesicle trafficking, beach and anchor containing
8,15	6,99	-2,23	1,85E-05	0,0005	RGS16	regulator of G-protein signaling 16
11,42	10,26	-2,23	2,32E-05	0,0005	MTMR4	myotubularin related protein 4
14,58	13,42	-2,23	5,07E-05	0,001	NCAM1	neural cell adhesion molecule 1
8,27	7,11	-2,23	6,68E-05	0,0012	ATP10D	ATPase, class V, type 10D
8,12	6,96	-2,23	0,0001	0,0023	GALNT13	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 13
5,65	4,49	-2,23	0,0055	0,0355	DLL3	delta-like 3 (Drosophila)
11,67	10,52	-2,22	1,56E-06	6,79E-05	RPAP1	RNA polymerase II associated protein 1
9,32	8,17	-2,22	5,05E-06	0,0002	ATP7A	ATPase, Cu++ transporting, alpha polypeptide
6,71	5,56	-2,22	2,29E-05	0,0005	FRMPD1	FERM and PDZ domain containing 1
7,87	6,72	-2,22	4,13E-05	0,0008	ARHGAP42	Rho GTPase activating protein 42
9,7	8,54	-2,22	0,0006	0,0064	SZRD1	SUZ RNA binding domain containing 1
6,24	5,09	-2,22	0,0022	0,018	MIF4GD	MIF4G domain containing
6,32	5,17	-2,22	0,0024	0,0187	ZDHHC3	zinc finger, DHHC-type containing 3
8,15	7	-2,21	0,0001	0,0023	PDGFRB	platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide
6,15	5	-2,21	0,0002	0,0031	CNTNAP5	contactin associated protein-like 5
6,76	5,62	-2,21	0,0002	0,0032	ISL1	Transcript Identified by AceView, Entrez Gene ID(s) 3670
9,76	8,61	-2,21	0,0003	0,0039	AFF2	AF4/FMR2 family, member 2
9,52	8,38	-2,21	0,0009	0,0091	PARP12	poly(ADP-ribose) polymerase family member 12
10,75	9,61	-2,2	3,70E-06	0,0001	RDH11	retinol dehydrogenase 11 (all-trans/9-cis/11-cis)
10,52	9,38	-2,2	9,94E-06	0,0003	HAND2-AS1	HAND2 antisense RNA 1 (head to head)
6,8	5,67	-2,2	1,23E-05	0,0003	AMHR2	anti-Mullerian hormone receptor, type II
11,66	10,52	-2,2	4,75E-05	0,0009	CYGB	cytoglobin
7,53	6,4	-2,2	0,0001	0,002	GORASP1	golgi reassembly stacking protein 1
11,41	10,27	-2,2	0,001	0,0098	KIF20A	kinesin family member 20A
9,1	7,97	-2,2	0,0035	0,025	LINGO2	leucine rich repeat and Ig domain containing 2
9,02	7,89	-2,19	1,73E-05	0,0004	ZFYVE27	zinc finger, FYVE domain containing 27
6,19	5,06	-2,19	3,46E-05	0,0007	MSC	musculin
11,5	10,37	-2,19	5,27E-05	0,001	KLHL23	kelch-like family member 23
7,7	6,57	-2,19	0,0001	0,0023	JAKMIP1	janus kinase and microtubule interacting protein 1
13,12	11,99	-2,19	0,0002	0,0025	IDI1	isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1
7,69	6,56	-2,19	0,0002	0,0028	SFT2D3	SFT2 domain containing 3
7,11	5,98	-2,19	0,0004	0,0044	MRAP2	melanocortin 2 receptor accessory protein 2
5,11	3,98	-2,19	0,0014	0,0123	BNC2	basonuclin 2
9,71	8,58	-2,18	1,34E-06	6,06E-05	SDHAF2	succinate dehydrogenase complex assembly factor 2
6,43	5,3	-2,18	2,06E-06	8,31E-05	ZNF275	zinc finger protein 275
8,16	7,04	-2,18	7,64E-06	0,0002	HIST1H4A	histone cluster 1, H4a
10,68	9,55	-2,18	3,26E-05	0,0007	GGA2	golgi-associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 2
10,12	9	-2,18	4,74E-05	0,0009	KIF3B	kinesin family member 3B
7,97	6,85	-2,18	0,0002	0,0024	SOC56	suppressor of cytokine signaling 6
12,5	11,38	-2,18	0,0002	0,0028	SRRM2	serine/arginine repetitive matrix 2
6,5	5,38	-2,18	0,0002	0,003	GEMIN4	gem nuclear organelle associated protein 4
12,9	11,78	-2,18	0,0002	0,003	GOLGA7	golgin A7
5,5	4,37	-2,18	0,0002	0,0031	SYNGR4	synaptogyrin 4

8,41	7,29	-2,18	0,0035	0,0252	SCARA3	scavenger receptor class A, member 3
13,31	12,19	-2,17	2,37E-06	9,23E-05	ADRBK2	adrenergic, beta, receptor kinase 2
12,85	11,73	-2,17	3,60E-06	0,0001	SCD	stearyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)
12,14	11,03	-2,17	4,20E-06	0,0001	SORD	sorbitol dehydrogenase
8,28	7,16	-2,17	8,14E-06	0,0002	XRCC4	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4
13,1	11,98	-2,17	8,35E-06	0,0002	EZR	eZRin
8,02	6,91	-2,17	1,65E-05	0,0004	HEATR5A	HEAT repeat containing 5A
13,41	12,29	-2,17	2,80E-05	0,0006	MAB21L2	mab-21-like 2 (C. elegans)
9,4	8,28	-2,17	3,21E-05	0,0007	HIST1H4I	histone cluster 1, H4i
8,89	7,77	-2,17	6,80E-05	0,0012	PPEF1	protein phosphatase, EF-hand calcium binding domain 1
5,7	4,58	-2,17	6,92E-05	0,0013	C1QL3	complement component 1, q subcomponent-like 3
5,62	4,51	-2,17	9,09E-05	0,0016	DLC1	DLC1 Rho GTPase activating protein
7,66	6,55	-2,17	0,0001	0,0017	MSX2	msh homeobox 2
5,29	4,17	-2,17	0,0002	0,0027	CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2
7,56	6,44	-2,17	0,0003	0,0042	RUNDC3B	RUN domain containing 3B
12,79	11,68	-2,16	6,67E-06	0,0002	MAPK1	mitogen-activated protein kinase 1
9,35	8,24	-2,16	9,44E-06	0,0003	ZFYVE9	zinc finger, FYVE domain containing 9
11,34	10,23	-2,16	1,44E-05	0,0004	CHSY1	chondroitin sulfate synthase 1
9,14	8,04	-2,16	3,21E-05	0,0007	SMIM13	small integral membrane protein 13
4,97	3,86	-2,16	0,0002	0,0033	GRPR	gastrin-releasing peptide receptor
13,05	11,94	-2,16	0,0005	0,0057	HIST1H2BH	histone cluster 1, H2bh
10,65	9,54	-2,16	0,0008	0,0086	HIST1H3G	histone cluster 1, H3g
7,18	6,08	-2,15	1,17E-05	0,0003	LRRTM1	leucine rich repeat transmembrane neuronal 1
8,72	7,62	-2,15	1,49E-05	0,0004	TNNT2	troponin T type 2 (cardiac)
6,53	5,42	-2,15	6,12E-05	0,0012	ADGRA2	adhesion G protein-coupled receptor A2
11,56	10,45	-2,15	8,09E-05	0,0014	CYP51A1	cytochrome P450, family 51, subfamily A, polypeptide 1
12,02	10,91	-2,15	0,0002	0,0031	PREP	prolyl endopeptidase
10,07	8,96	-2,15	0,0014	0,0127	CCDC34	coiled-coil domain containing 34
11,03	9,92	-2,15	0,0021	0,0172	SHROOM3	shroom family member 3
9,35	8,25	-2,14	2,54E-06	9,72E-05	MTSS1	metastasis suppressor 1
10,83	9,73	-2,14	2,02E-05	0,0005	GUCD1	guanylyl cyclase domain containing 1
11,63	10,53	-2,14	5,35E-05	0,001	PARP1	poly(ADP-ribose) polymerase 1
11,56	10,46	-2,14	0,0001	0,0021	ARID2	AT rich interactive domain 2 (ARID, RFX-like)
9,02	7,92	-2,14	0,0002	0,0031	ITGA9	integrin alpha 9
10,28	9,19	-2,14	0,0004	0,0049	ACVR1B	activin A receptor type IB
9,6	8,5	-2,14	0,0031	0,0229	CENPQ	centromere protein Q
6,5	5,4	-2,14	0,0032	0,0234	CHST11	Transcript Identified by AceView, Entrez Gene ID(s) 50515
11,72	10,63	-2,13	5,24E-06	0,0002	DEPDC1	DEP domain containing 1
14,87	13,78	-2,13	5,27E-06	0,0002	RPS25	ribosomal protein S25
9,24	8,15	-2,13	6,73E-06	0,0002	GLTSCR1L	GLTSCR1-like
14,14	13,05	-2,13	1,33E-05	0,0003	C14orf1	chromosome 14 open reading frame 1
12,79	11,7	-2,13	1,98E-05	0,0005	CAMK4	calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV
6,71	5,62	-2,13	4,31E-05	0,0009	TGFB2; TGFB2-OT1	transforming growth factor beta 2; TGFB2 overlapping transcript 1
11,34	10,25	-2,13	8,67E-05	0,0015	MEAF6	MYST/Esa1-associated factor 6
11,13	10,04	-2,13	0,0002	0,0031	RFC5	replication factor C subunit 5
10,95	9,87	-2,12	1,04E-05	0,0003	ROR1	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1
8,78	7,69	-2,12	3,14E-05	0,0007	set-09	septin 9
8,71	7,62	-2,12	6,65E-05	0,0012	RECK	reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs
9,6	8,51	-2,12	0,0002	0,0029	KIAA0430; MIR6506	KIAA0430; microRNA 6506
9,08	8	-2,12	0,0002	0,003	NPY2R	neuropeptide Y receptor Y2
13,49	12,41	-2,12	0,0002	0,0032	HIST1H2AE	histone cluster 1, H2ae
11,12	10,03	-2,12	0,0003	0,0037	PSEN1	presenilin 1
10,8	9,72	-2,11	4,63E-06	0,0002	TMTC1	transmembrane and tetratricopeptide repeat containing 1
13,04	11,97	-2,11	1,13E-05	0,0003	TMOD1	tropomodulin 1
11,33	10,26	-2,11	1,53E-05	0,0004	CNTFR	ciliary neurotrophic factor receptor
13,43	12,35	-2,11	3,52E-05	0,0007	PHF3	PHD finger protein 3
9,19	8,11	-2,11	4,20E-05	0,0009	C9orf91	chromosome 9 open reading frame 91
12,01	10,94	-2,11	0,0002	0,0024	TMEM41A	transmembrane protein 41A
9,21	8,13	-2,11	0,0017	0,0143	CASC10	cancer susceptibility candidate 10
11,48	10,41	-2,1	7,72E-06	0,0002	MYH9	myosin, heavy chain 9, non-muscle
8,73	7,65	-2,1	1,02E-05	0,0003	FAM122B	family with sequence similarity 122B
10,37	9,29	-2,1	6,15E-05	0,0012	CYP2U1	cytochrome P450, family 2, subfamily U, polypeptide 1
7,27	6,2	-2,1	8,13E-05	0,0014	GRK6	G protein-coupled receptor kinase 6
11,05	9,97	-2,1	0,0001	0,0022	TMEM170A	transmembrane protein 170A
12,8	11,72	-2,1	0,0003	0,0036	MAN1A2	mannosidase, alpha, class 1A, member 2
11,61	10,53	-2,1	0,0003	0,0039	TMEM43	transmembrane protein 43
9,28	8,22	-2,09	3,58E-06	0,0001	SPRY2	sprouty RTK signaling antagonist 2
11,16	10,1	-2,09	1,74E-05	0,0004	DPY19L3	dpy-19-like 3 (C. elegans)
10,82	9,75	-2,09	3,48E-05	0,0007	RELL1	RELT-like 1
11,26	10,19	-2,09	3,84E-05	0,0008	NFYC	nuclear transcription factor Y subunit gamma
4,93	3,86	-2,09	5,08E-05	0,001	LIX1	limb and CNS expressed 1
8,63	7,56	-2,09	0,0001	0,0022	LMAN2L	lectin, mannose-binding 2-like
7,45	6,38	-2,09	0,0002	0,0033	MURC	muscle-related coiled-coil protein
12,69	11,63	-2,09	0,0005	0,0054	MFSD1	major facilitator superfamily domain containing 1
11,15	10,09	-2,09	0,0006	0,0063	TOR1AIP1	torsin A interacting protein 1
5,66	4,6	-2,09	0,0064	0,0396	PEX5L	Transcript Identified by AceView, Entrez Gene ID(s) 51555
8,83	7,77	-2,08	2,37E-05	0,0005	SLC25A33	solute carrier family 25 (pyrimidine nucleotide carrier), member 33
10,41	9,36	-2,08	2,58E-05	0,0006	PPP4R1	protein phosphatase 4, regulatory subunit 1
7,93	6,87	-2,08	3,73E-05	0,0008	GAREM2	GRB2 associated regulator of MAPK1 2
11,43	10,38	-2,08	3,80E-05	0,0008	EPB41L5	erythrocyte membrane protein band 4.1 like 5
9,59	8,54	-2,08	9,05E-05	0,0016	SMIM20	small integral membrane protein 20
9,6	8,54	-2,08	0,001	0,0098	UBR7	ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 7 (putative)
6,8	5,75	-2,08	0,0017	0,0149	TVP23A	trans-golgi network vesicle protein 23 homolog A (S. cerevisiae)
8,93	7,88	-2,07	1,93E-05	0,0005	KDM7A	lysine (K)-specific demethylase 7A
13,01	11,96	-2,07	3,84E-05	0,0008	FEN1	flap structure-specific endonuclease 1
11,65	10,61	-2,07	6,07E-05	0,0011	FOPNL	FGFR1OP N-terminal like
11,77	10,72	-2,07	0,0001	0,0019	C20orf24	chromosome 20 open reading frame 24
8,39	7,34	-2,07	0,0001	0,0019	MAPK7	mitogen-activated protein kinase 7
6,95	5,91	-2,07	0,0002	0,0026	PCDH9	protocadherin 9
13,9	12,86	-2,06	2,52E-06	9,66E-05	ARPC1A	actin related protein 2/3 complex subunit 1A
9,26	8,21	-2,06	5,94E-05	0,0011	CA14	carbonic anhydrase XIV
9,16	8,12	-2,06	6,08E-05	0,0011	PCDH6	protocadherin beta 6
6,94	5,9	-2,06	0,0001	0,0019	TBC1D16	TBC1 domain family, member 16
10,64	9,6	-2,06	0,0001	0,002	SOGA1	suppressor of glucose, autophagy associated 1
6,23	5,19	-2,06	0,0007	0,0076	PIEZO2	piezo-type mechanosensitive ion channel component 2
8,76	7,72	-2,06	0,0015	0,0132	ATPAF1	ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1
4,76	3,71	-2,06	0,0148	0,0735	CCDC73	coiled-coil domain containing 73
11,83	10,79	-2,05	1,12E-05	0,0003	AP3S2; MIR5009	adaptor-related protein complex 3, sigma 2 subunit; microRNA 5009
6,12	5,09	-2,05	1,81E-05	0,0004	LOC283731; RP11-247C2	uncharacterized LOC283731; novel transcript
12,89	11,85	-2,05	1,86E-05	0,0005	ICA1	islet cell autoantigen 1

ANEXOS – ANEXO 2

11,79	10,75	-2,05	3,14E-05	0,0007	CENPO	centromere protein O
11,35	10,31	-2,05	4,87E-05	0,001	CDKN2C	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)
6,96	5,93	-2,05	0,0001	0,002	ASS1	argininosuccinate synthase 1
10,04	9	-2,05	0,0001	0,0022	TCF20	transcription factor 20 (AR1)
10,25	9,22	-2,05	0,0003	0,0037	SCPEP1	serine carboxypeptidase 1
11,18	10,14	-2,05	0,0005	0,0056	HYOU1	hypoxia up-regulated 1
10,31	9,27	-2,05	0,0006	0,007	ATG13	autophagy related 13
10,79	9,76	-2,05	0,0013	0,0119	AIMP2	aminoacyl tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein 2
4,85	3,81	-2,05	0,0097	0,0538	PLEKHG7	pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 7
11,35	10,33	-2,04	2,13E-05	0,0005	DUSP4	dual specificity phosphatase 4
9,84	8,82	-2,04	6,13E-05	0,0012	ZFAND1	zinc finger, AN1-type domain 1
10,12	9,09	-2,04	8,31E-05	0,0015	KLHDC10	kelch domain containing 10
7,58	6,55	-2,04	0,0001	0,0018	PDK3	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 3
11,84	10,82	-2,04	0,0008	0,0079	BCAT1	branched chain amino-acid transaminase 1, cytosolic
9,15	8,12	-2,04	0,0024	0,0188	SKA1	spindle and kinetochore associated complex subunit 1
9,52	8,5	-2,04	0,0043	0,0296	APIP	APAF1 interacting protein
10,56	9,54	-2,03	5,74E-05	0,0011	ARL6IP6	ADP-ribosylation factor like GTPase 6 interacting protein 6
10,55	9,53	-2,03	0,0001	0,0017	MGAT5	mannosyl (alpha-1,6-)-glycoprotein beta-1,6-N-acetyl-glucosaminyltransferase
10,02	8,99	-2,03	0,0001	0,0021	RIMBP2	RIMS binding protein 2
8,88	7,85	-2,03	0,0002	0,0027	ABCD2	ATP binding cassette subfamily D member 2
5,42	4,4	-2,03	0,0033	0,0238	CDH26	cadherin 26
10,12	9,1	-2,03	0,0173	0,0824	ERI3; ERI3-IT1	ERI1 exoribonuclease family member 3; ERI3 intronic transcript 1
10,1	9,08	-2,02	8,02E-06	0,0002	RAB11FIP2	RAB11 family interacting protein 2 (class I)
14,56	13,54	-2,02	1,29E-05	0,0003	MYH10	myosin, heavy chain 10, non-muscle
10,3	9,28	-2,02	2,01E-05	0,0005	PLCB4	phospholipase C, beta 4
7,96	6,95	-2,02	2,67E-05	0,0006	NOL6	nucleolar protein 6 (RNA-associated)
10,52	9,51	-2,02	2,69E-05	0,0006	MCM6	minichromosome maintenance complex component 6
11,79	10,77	-2,02	0,0002	0,0023	MTPAP	mitochondrial poly(A) polymerase
8,99	7,97	-2,02	0,0002	0,0026	PLS3	plastin 3
8,21	7,2	-2,02	0,0005	0,0061	EGLN3	egl-9 family hypoxia-inducible factor 3
11,42	10,41	-2,02	0,0009	0,0089	ASNA1	arsA arsenite transporter, ATP-binding, homolog 1 (bacterial)
5,04	4,03	-2,02	0,0021	0,0171	NTRK3	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3
7,33	6,32	-2,02	0,0025	0,0194	UBL4A	ubiquitin-like 4A
4,31	3,3	-2,02	0,0057	0,0364	SYT7	synaptotagmin VII
11,64	10,63	-2,01	2,15E-05	0,0005	AKR1C3	aldo-keto reductase family 1, member C3
10,5	9,49	-2,01	2,45E-05	0,0006	ZDHHC18	zinc finger, DHHC-type containing 18
7,96	6,95	-2,01	3,75E-05	0,0008	SEMA3C	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C
7,62	6,61	-2,01	7,23E-05	0,0013	USP28	ubiquitin specific peptidase 28
11,95	10,94	-2,01	9,47E-05	0,0016	HIST1H2AM; HIST1H3J	histone cluster 1, H2am; histone cluster 1, H3j
10,26	9,25	-2,01	0,0001	0,0017	HDAC9	histone deacetylase 9
8,51	7,5	-2,01	0,0001	0,0017	GPR3	G protein-coupled receptor 3
5,16	4,15	-2,01	0,0003	0,004	PRLHR	prolactin releasing hormone receptor
9,48	8,48	-2,01	0,0007	0,0072	MKRN2	makorin ring finger protein 2
13,2	12,2	-2	1,75E-05	0,0004	SHMT2	serine hydroxymethyltransferase 2 (mitochondrial)
10,57	9,57	-2	6,59E-05	0,0012	HINT3	histidine triad nucleotide binding protein 3
8,18	7,17	-2	7,14E-05	0,0013	CLN5	ceroid-lipofuscinosis, neuronal 5
9,9	8,89	-2	0,0002	0,003	SNAP23	synaptosome associated protein 23kDa
8,14	7,14	-2	0,008	0,0466	NRSN2-AS1	NRSN2 antisense RNA 1