



Schlussbericht

LiSyM-Krebs - Liver Systems Medicine against Cancer

LiSyM-Krebs - Verbundprojekt: C-TIP-HCC

Teilprojekt: AG Saez-Rodriguez

Förderkennzeichen: 031L0257B

1. Juli 2021 – 30. Juni 2024

Teilprojektleiter:

Prof. Julio Saez-Rodriguez
Director, Institute for Computational Biomedicine
Heidelberg University, Faculty of Medicine,
Im Neuenheimer Feld 1303, 10th floor 69120 Heidelberg
Tel: + 49 622156-7520 - grants.saez@uni-heidelberg.de

Verbundkoordinator:

Prof. Steven Dooley
Sektion Molekulare Hepatologie, II. Medizinische Klinik
Universität Heidelberg, Medizinische Fakultät Mannheim
Theodor-Kutzer-Ufer 1-3
68167 Mannheim
Tel: +49 621/383-3768 - steven.dooley@medma.uni-heidelberg.d

Heidelberg, 05.12.2024 Prof. Dr. Julio Saez-Rodriguez
Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

I Kurzbericht

1.1 Aufgabenstellung

Die Aufgabe des LiSyM-Krebs Projekts bestand in der Entwicklung eines Multiskalenmodells, das anhand von messbaren Gewebe- und Zellparametern den patientenspezifischen „tipping point“ (TIP) von der Leberzirrhose zur Tumorentstehung (HCC) vorhersagen kann um Risikopatienten frühzeitig identifizieren zu können. Die Aufgaben der Saez-Rodriguez-Gruppe im Rahmen des Projekts lassen sich in zwei Hauptbereiche gliedern: 1) Entwicklung und Anpassung von Methoden zur Integration und Analyse von Multi-Omics-Daten; 2) Anwendung dieser Ansätze zur Identifikation von Biomarkern und deregulierter Signalnetzwerke. Angesichts des begrenzten Zugangs zu Serum-Proteom-Daten verlagerte sich der Fokus auf die Entwicklung von Analyse-Methoden für Multi-Omics-Daten sowie die Auswertung von Einzelzell- und orts aufgelösten Lebertranskriptom-Daten, wie im Folgenden und in den Zwischenberichten detailliert beschrieben.

Die Analyse und Verarbeitung von Omics-Daten sowie die rechnerischen Schlussfolgerungen basieren auf umfangreichem Vorwissen, das aus Datenbanken stammt. Dazu gehören molekulare Aktivitätssignaturen, Transkriptionsfaktor-Regulone, Zelltyp-Marker, kausale Interaktionen zwischen Signalmolekülen sowie Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen. Die Saez-Rodriguez-Gruppe hat bereits vor dem LiSyM-Krebs Projekt Softwaretools für die Integration von Vorwissen, signaturbasierte Aktivitätsinferenz und mechanistische Modellierung entwickelt. Diese Methoden wurden über Jahre erfolgreich in verschiedenen Omics-Studien angewandt. Dennoch können diese Methoden durch die Ergänzung fehlender Vorwissenskomponenten oder spezifischer Methodiken weiter ausgebaut werden, um die Analyse von verschiedenen Omics Daten zu verbessern.

Unsere zentrale Aufgabe bestand darin, umfassende und kuratierte Sammlungen des benötigten Vorwissens aufzubauen und dieses in einer robusten, anpassbaren und zugänglichen Form für die Analyse bereitzustellen. Ziel war es, diese Ansätze mit bestehenden Methoden zu vergleichen, ihre Effizienz zu bewerten und ihre Anwendung in verschiedenen Studien zu demonstrieren.

1.2 Ablauf des Vorhabens

Im Rahmen des LiSyM-Krebs-Projekts arbeiten zwölf Forschungsgruppen aus den Bereichen Modellierung, Experiment und Klinik interdisziplinär zusammen, um die Mechanismen der Entstehung von Leberkrebs (HCC) aus Zirrhose besser zu verstehen. Das Projekt ist in fünf Arbeitspakete (WP-P und WP1–WP4) aufgeteilt, die jeweils in mehrere Teilziele unterteilt und einer der beteiligten Gruppen zugewiesen wurden. Dabei war die Saez-Rodriguez-Gruppe primär im **WP2 - Netzwerkmodell** tätig, hat aber auch zu anderen Arbeitspaketen beigetragen:

- **MSN 1-3:** Netzwerkübergreifende Meilensteine umfassen den Aufbau einer Datenaustauschplattform, die Standardisierung von OMICs-Methoden und die Entwicklung translationaler Strategien.
- **WP2 (2.2, 2.8, 2.9, 2.13):** Etablierung einer Datenanalysepipeline für die Integrative Multi-omics-Analyse von Regenerationsknoten, die aus Leberproben von Patienten mit Zirrhose, mit und ohne HCC, isoliert wurden.

Die gesamte Arbeit wurde durch zweiwöchentliche Meetings, jährliche Statusseminare, Scientist Retreats sowie zusätzliche Sitzungen bei Bedarf koordiniert. Ergänzend dazu wurden Datenaustauschplattformen eingerichtet, die für die Zusammenarbeit genutzt werden konnten. Das Projekt baut auf den bisherigen und laufenden Methoden- und Softwareentwicklungen der beteiligten Gruppen auf.

1.3 Zusammenfassung wesentlicher Ergebnisse und Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Im Rahmen des Projekts wurde unter anderem eine erweiterte Sammlung von Transkriptionsfaktor-Gene-Verbindungen aus verschiedenen Vorwissen-Ressourcen erstellt und mit etablierten genregulatorischen Netzwerken verglichen. Dabei zeigte sich, dass diese Sammlung eine höhere Abdeckung von Transkriptionsfaktoren bietet und eine bessere Leistung bei der Wiederherstellung gestörter Transkriptionsfaktoren ermöglicht. Zudem wurden verschiedene Methoden zur Analyse von phosphoproteomischen Daten gesammelt und systematisch verglichen, wobei festgestellt wurde, dass manuell kuratierte Kinase-Substrat-Verbindungen die besten Ergebnisse liefern. Die Netzwerkmodellierung zur Identifizierung von Signalwegen wurde ebenfalls überarbeitet. Durch die Einbeziehung von phosphoproteomischen Daten und zusätzlichen Arten von Interaktionen im Vorwissen wurde ein gerichtetes Interaktionsnetzwerk geschaffen, das die Art der Regulierung berücksichtigt.

Des Weiteren wurde eng mit den anderen Gruppen innerhalb des LiSyM-Krebs zusammengearbeitet, insbesondere der Dooley- und Bode-Gruppe. Dabei zeigte unsere Analyse der GeoMX-DSP-Daten der Dooley-Arbeitsgruppe Unterschiede in der mRNA-Expression sowie in den Transkriptionsfaktor- und Signalweg-Aktivitäten von Hepatozyten, hepatischen Sternzellen und Makrophagen in verschiedenen Gewebe Regionen (Tumor, Tumorgrenze und zirrhotisches Gewebe). Eine Dekonvolution Analyse offenbarte einen gegenläufigen Trend in der Häufigkeit zweier HSC-Subpopulationen (myofibroblastic HSC und cytokine-producing HSC) zwischen der zirrhotischen und der Tumorregion. Weiterführend wurden Liganden-Rezeptor-Interaktionen untersucht, die auf eine hochregulierte Expression von CAF-Liganden wie COL1A1 und FN1 sowie Integrin-Rezeptoren auf Hepatozyten/HCC in der Tumorregion hinweisen. Diese Interaktionen könnten eine zentrale Rolle bei der Tumorentwicklung spielen. Zudem zeigte die CITE-seq-Analyse von nicht-parenchymalen Leberzellen aus einem Western-Diet-Mausmodell in Kollaboration mit der Bode-Grupp eine selektive Zunahme einer Makrophagen-Subpopulation mit hoher CD11b/CD14-Expression, deren Aktivierungsstatus maßgeblich durch TGF- β beeinflusst wird.

II Eingehende Darstellung

2.1 Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

2.1.1 Netzwerkübergreifende Meilensteine

2.1.1.1 MSN1: Klinische Datenaustauschplattform

Aufgabe der Saez-Rodriguez-Gruppe: Mitwirken an der Etablierung der klinischen Datenaustauschplattform bei.

Im Rahmen der LiSyM-Krebs Fördermaßnahme hat das Konsortium eine sichere und effiziente Teilung klinischer und experimenteller Daten zwischen allen Partnern angestrebt. Da diese Daten häufig aus Patientenproben oder Untersuchungen stammen, unterliegen sie der Datenschutzgrundverordnung (DSGVO). Die Weitergabe und Verarbeitung dieser Daten ist nun nach Abschluss eines Joint Controller Agreements (JCA) möglich, welches strenge Datenschutzbedingungen sicherstellt.

Um den Austausch von pseudonymisierten Daten und Biomaterial innerhalb und zwischen den Konsortien zu ermöglichen, wurde die Joint Controller Agreement (JCA) von der Saez-Rodriguez Gruppe unterschrieben. Darüber hinaus wurde für den Austausch klinischer Messdaten eine OpenBIS-Instanz eingerichtet und die LiSyM-Krebs Nextcloud wurde als zentrale Plattform für die Zusammenarbeit und den Datenaustausch genutzt.

2.1.1.2 MSN2: SOPs für OMICs Technologie und Entwicklung von Datenanalyse Pipelines

Aufgabe der Saez-Rodriguez-Gruppe: Entwicklung und Implementierung von Standardmethoden zur Prozessierung und Analyse von Omics-Daten.

Im Rahmen von MSN2 haben wir Standardprozeduren (SOPs) für die Abschätzung der Aktivität von Transkriptionsfaktoren und Signalwegen aus Transkriptom-Daten entwickelt und in Form von Vignetten dokumentiert. Zusätzlich haben wir Vignetten zur Abschätzung der Kinase-Aktivität anhand von Phosphoproteom-Daten erstellt. Diese Vignetten bieten detaillierte Anleitungen zur Nutzung der Methoden und unterstützen die Konsistenz und Reproduzierbarkeit der Analysen innerhalb des Konsortiums.

Des Weiteren wurden standardisierte Prozessierungs-Pipelines für (Phospho)-Proteom-Daten entwickelt. Dafür wurde der Workflow-Manager *Snakemake* verwendet, um eine modulare, transparente und reproduzierbare Datenanalyse sicherzustellen.

2.1.1.2 MSN3: Strategien für translationale Applikationen

Aufgabe der Saez-Rodriguez-Gruppe: Mitwirken zur Entwicklung von Strategien für translationale Applikationen.

Um einen klinisch einsetzbaren "Score" zu entwickeln, wurden von uns zunächst deregulierte Gene mithilfe von Mausmodellen und Gewebeproben von Patienten identifiziert. Diese Gene können in Zukunft mit zusätzlichen Datentypen, wie Netzwerkmodellen, Proteomik- und Sekretomik-Daten, validiert werden, um robuste und verlässliche Signaturen für die Entwicklung eines Scores zu gewährleisten. Unser Ziel ist es, eine Grundlage für die klinische Anwendung zu schaffen und damit die Translation von Forschungsergebnissen in die Praxis zu erleichtern.

2.1.2 WP2: Integrative Multi-omics-Analyse von Regenerationsknoten, die aus Leber von Patienten mit einer Zirrhose mit und ohne HCC isoliert wurden

2.1.2.1 WP 2.2: Etablierung einer Datenanalysepipeline unter Einsatz von experimentellem Design und einschließlich Qualitätssicherungsmaßnahmen

Aufgabe für die Saez-Rodriguez-Gruppe: Unterstützung zur Etablierung einer Datenanalyse Pipeline

Zur Standardisierung der Datenverarbeitung wurde von den Arbeitsgruppen Timmer und Klingmüller die Datenanalysepipeline „MSPypeline“ entwickelt und veröffentlicht (Heming, Hansen et al. 2022). Die Saez-Rodriguez Gruppe setzte sich intensiv mit dieser Pipeline auseinander und pflegte den Austausch mit den beteiligten Gruppen, um einen reibungslosen Arbeitsablauf sicherzustellen und die nachfolgenden Analyseschritte auf dieser Basis aufzubauen. Zusätzlich wurde ein Application Programming Interface (API) für openBIS in R von den Arbeitsgruppen Timmer und Klingmüller in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Müller entwickelt, um einen standardisierten Austausch experimenteller Daten zu ermöglichen. Auch in diesem Bereich wurde die Kommunikation mit den beteiligten Gruppen aktiv aufrechterhalten, um den Fortschritt und die Integration der API zu fördern.

2.1.2.2 WP 2.8: Entwicklung einer Pipeline für die Analyse von Multi-omics Daten

Aufgabe für die Saez-Rodriguez-Gruppe: Entwicklung und Testung einer Multi-omics-Datenanalyse Pipeline unter Verwendung öffentlicher und Partner generierter Daten sowie Bereitstellung der Pipeline als frei zugängliche Software.

Für die Analyse von Multi-omics-Daten wurde von uns zunächst die Analyse von Transkriptom Daten überarbeitet. Dafür wurde ein genregulatorisches Netzwerk mit einer erweiterten Sammlung von Transkriptionsfaktor-Gene-Verbindungen aus verschiedenen

Vorwissen-Ressourcen erstellt. Zusätzlich zu klassischen Datenbanken wurde hierfür auch Textanalyse verwendet, um weitere regulatorische Verbindungen zwischen Transkriptionsfaktoren und Genen zu identifizieren. Dieses Netzwerk zeigte im Vergleich zu etablierten genregulatorischen Netzwerken eine höhere Abdeckung von Transkriptionsfaktoren und eine bessere Leistung bei der Identifizierung von gestörter Transkriptionsfaktoren (Müller-Dott et al. 2023). Dadurch konnte die Vorhersage von Transkriptionsfaktoraktivitäten signifikant verbessert und das Netzwerk als Bestandteil der Standard-Analysepipeline implementiert werden. Dies ermöglicht eine präzisere Analyse der Rolle von Transkriptionsfaktoren bei der Entstehung von Leberkrebs.

Parallel dazu wurden von uns Methoden zur Analyse von phosphoproteomischen Daten gesammelt und systematisch verglichen. Rechenalgorithmen und Vorwissen, das Kinasen mit ihren Substraten verbindet, wurden dabei separat bewertet und in allen Kombinationen getestet. Hierbei zeigte sich, dass eine Kombination aus Datenbanken mit manuell kuriierten Kinase-Substrat Verbindungen in Kombination mit simpleren Methoden, wie dem z-score, am besten für die Vorhersage von Kinaseaktivitäten geeignet ist. Dafür wurden Kinase-Substrat-Interaktionen von PhosphoSitePlus, PTMsigDB und dem goldenen Standard von GOS 5.0 verwendet (Müller-Dott et al., 2024). Zusätzlich wurde die Netzwerkmodellierung zur Identifizierung von Signalwegen aus Phosphoproteom Daten überarbeitet. Diese umfasst nun zusätzliche Protein-Protein Interaktionen, was ein gerichtetes Netzwerk ermöglicht, das regulatorische Mechanismen einbezieht. Dies wurde bereits im Kontext von Dickdarmkrebs getestet und konnte verschiedene Wirkmechanismen von Metformin nachweisen (Salovska et al., 2023).

Des Weiteren wurde eine robuste Pipeline zur standardisierten Verarbeitung von (Phospho)-Proteom-Daten wurde mit Hilfe des Workflow-Managers Snakemake entwickelt. Dafür wurden verschiedene Normalisierungs- und Imputationsmethoden getestet. Schließlich wurde MEFISTO, eine Erweiterung der Multi-Omics-Faktoranalyse (MOFA), getestet, um latente Faktoren in verschiedenen Omics-Datentypen zu identifizieren und koordinierte Veränderungen in verschiedenen Omics Ebenen festzustellen. Diese können zukünftig genutzt werden, um relevante Kinasen und Transkriptionsfaktoren für die Netzwerkmodellierung auszuwählen und die Pipeline weiter zu verfeinern.

2.1.2.3 WP 2.9: (sc)RNA-Seq-Analyse von HSC/CAF, Makrophagen/TAM und Hepatozyten ist durchgeführt

Aufgabe für die Saez-Rodriguez-Gruppe: Analyse von (sc)RNA-Seq Daten um die Aktivität von Signalwegen, Transkriptionsfaktoren, Kinasen und regulatorischen Netzwerken in den verschiedenen Proben abzuschätzen

Im Rahmen der Analyse von GeoMX-DSP-Daten aus der Dooley-Arbeitsgruppe wurde eine Pipeline etabliert, um Veränderungen der mRNA-Expression sowie der Transkriptionsfaktor- und Signalweg-Aktivitäten in Hepatozyten/HCC-Zellen, HSC/CAF und Makrophagen/TAM zu identifizieren. Diese Analysen zeigten spezifische Unterschiede zwischen Tumor, Tumorgrenze

und nicht-tumoralem zirrhotischem Gewebe. Zusätzlich wurde eine Dekonvolutionsanalyse durchgeführt, welche gegenläufige Trends in der Häufigkeit zweier HSC-Subpopulationen (myofibroblastic HSC und cytokine-producing HSC) zwischen der zirrhotischen und Tumorregion offenbarte. Zusätzlich wurden Liganden-Rezeptor-Interaktionen analysiert, die eine hochregulierte Expression von CAF-Liganden (z. B. COL1A1, FN1) und Integrin-Rezeptoren (z. B. ITGA5, ITGAV) in der Tumorregion zeigten, was auf eine potenziell wichtige Rolle dieser Interaktionen bei der Tumorentwicklung hinweist.

Darüber hinaus wurden Makrophagen Populationen in Zusammenarbeit mit der Bode-Arbeitsgruppe mit Hilfe von Single-cell Daten analysiert. Dafür wurde zunächst eine Pipeline zur Analyse von Single-Cell-Daten entwickelt und eine Markerliste für verschiedene Leberzelltypen erstellt, welche kontinuierlich erweitert wird. Diese Liste kann auch für die Abschätzung von Zellkompositionen aus Bulk-RNA-Daten verwendet werden und wertvolle Einblicke in die zelluläre Zusammensetzung der Leber liefern. Anschließend wurden erste Parameter-Konstellationen identifiziert, die es ermöglichen, vier Makrophagen-Populationen im Lebergewebe von Mäusen unabhängig von Alter und Ernährung zu unterscheiden. Durch Clustering der Expressionsprofile wurden Marker für die einzelnen Makrophagen-Cluster identifiziert. Veränderungen in der Zusammensetzung dieser Populationen konnten während des Fortschreitens von NASH beobachtet werden, spezifisch die selektive Zunahme einer Makrophagen-Subpopulation mit hoher CD11b/CD14-Expression. Für die Makrophagen Populationen wurden ebenfalls Transkriptionsfaktor- und Signalwegsaktivitäten vorhergesagt. Dabei konnte eine erhöhte Aktivität für den TGF- β Signalweg für die erhöhte CD11b/CD14-Population beobachtet werden.

2.1.2.4 WP 2.13: Proteom der longitudinalen Serumproben ist charakterisiert und differentielle Veränderungen sind identifiziert

Aufgabe für die Saez-Rodriguez-Gruppe: Analyse von Serum Proteom Daten und Verbindung zu intrazellulären Netzwerken.

Von uns wurde eine umfassende Pipeline zur Verarbeitung und Analyse von Proteom-Daten entwickelt. Die grundlegenden Analysemethoden wurden etabliert und vorbereitet, sodass die Probenanalyse unmittelbar nach deren Verfügbarkeit hätte beginnen können. Jedoch konnten im Rahmen des ersten Förderzeitraums keine Proben von den Partnern zur Verfügung gestellt werden, sodass die Analyse des Proteoms der longitudinalen Serumproben nicht durchgeführt werden konnte.

2.3 Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Neue "Omics"-Technologien und die rasche Verbesserung bestehender Technologien führen zu einer ständig wachsenden Datenkomplexität und -menge, was eine Herausforderung für die Verarbeitung, Integration und Analyse darstellt. Das wissenschaftliche Ergebnis von Omics-Projekten hängt weitgehend von der Fähigkeit der Methoden ab, relevante biologische Zusammenhänge zu erfassen. Die im Rahmen des LiSyM-Krebs Projekts entwickelten Werkzeuge und Pipelines ermöglichen die Gewinnung biologischer Erkenntnisse aus fortgeschrittenen molekularen Technologien auf Systemebene. Wir haben modernste Berechnungs-Technologien eingesetzt, um Werkzeuge bereitzustellen, die gut konzipiert, flexibel, integriert und leistungsstark sind. Darüber hinaus wurde die Pipeline intensiv getestet und mit anderen Methoden verglichen, um eine zuverlässige und robuste Methodik zu gewährleisten.

Der Mehrwert dieser Arbeit zeigt sich bereits in der hohen Beliebtheit und Nutzung unserer Methoden innerhalb der wissenschaftlichen Gemeinschaft sowie in den Ergebnissen, die sie sowohl in unseren Projekten als auch in externen Anwendungen liefern. Die Bereitstellung unserer Methodik als Open-Source-Software und die Entwicklung von Vignetten fördern die Zugänglichkeit und erleichtern die Anwendung. Insgesamt haben wir eine robuste Grundlage für die wissensbasierte Multi-Omics-Analyse geschaffen, insbesondere für die Vorhersage von Transkriptionsfaktor- und Kinaseaktivitäten aus Transkriptom- und Phosphoproteom-Daten. Darüber hinaus haben wir unsere Methoden erfolgreich genutzt, um im Kontext von Leberkrebs verschiedene Zelltypen mit räumlicher Information zu analysieren. Dies ermöglichte die Identifikation von Unterschieden zwischen Zellen in der Tumorregion und der zirrhotischen Region von Patienten sowie potenziellen Zell-Zell-Kommunikation Events, die eine entscheidende Rolle bei der Tumorentwicklung spielen könnten.

Wir gehen davon aus, dass unsere Methoden in den nächsten Jahren weiterhin von der akademischen Gemeinschaft eingesetzt werden und dazu beitragen, Leberkrebs und andere Krankheiten besser zu verstehen.

2.4 Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Während der Durchführung des Vorhabens sind uns keine spezifischen Fortschritte bei anderen Stellen bekannt geworden, die direkte Änderungen unsererseits erforderlich gemacht hätten.

2.5 Erfolgte oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses

Die folgenden Publikationen wurden veröffentlicht und enthalten die wichtigsten Ergebnisse der Arbeit der Saez-Rodriguez-Gruppe im Rahmen des LiSyM-Krebs Projekts :

Müller-Dott, Sophia, Eric J. Jaehnig, Khoi Pham Munchic, Wen Jiang, Tomer M. Yaron-Barir, Sara R. Savage, Martin Garrido-Rodriguez, et al. 2024. "Comprehensive Evaluation of Phosphoproteomic-Based Kinase Activity Inference." bioRxiv.
<https://doi.org/10.1101/2024.06.27.601117>.

Badia-i-Mompel, Pau, Lorna Wessels, Sophia Müller-Dott, Rémi Trimbour, Ricardo O. Ramirez Flores, Ricard Argelaguet, and Julio Saez-Rodriguez. 2023. "Gene Regulatory Network Inference in the Era of Single-Cell Multi-Omics." *Nature Reviews Genetics* 24 (11): 739–54.

Müller-Dott, Sophia, Eirini Tsirvouli, Miguel Vazquez, Ricardo O. Ramirez Flores, Pau Badia-I-Mompel, Robin Fallegger, Dénes Túrei, Astrid Lægreid, and Julio Saez-Rodriguez. 2023. "Expanding the Coverage of Regulons from High-Confidence Prior Knowledge for Accurate Estimation of Transcription Factor Activities." *Nucleic Acids Research* 51 (20): 10934–49.

Wolf, Stephanie D., Christian Ehltig, Sophia Müller-Dott, Gereon Poschmann, Patrick Petzsch, Tobias Lautwein, Sai Wang, et al. 2023. "Hepatocytes Reprogram Liver Macrophages Involving Control of TGF- β Activation, Influencing Liver Regeneration and Injury." *Hepatology Communications* 7 (8). <https://doi.org/10.1097/HCG9.000000000000208>.

Salovska, Barbora, Erli Gao, Sophia Müller-Dott, Wenxue Li, Carlos Chacon Cordon, Shisheng Wang, Aurelien Dugourd, George Rosenberger, Julio Saez-Rodriguez, and Yansheng Liu. 2023. "Phosphoproteomic Analysis of Metformin Signaling in Colorectal Cancer Cells Elucidates Mechanism of Action and Potential Therapeutic Opportunities." *Clinical and Translational Medicine* 13 (2): e1179.

Badia-i-Mompel, Pau, Jesús Vélez, Jana Braunger, Celina Geiss, Daniel Dimitrov, Sophia Müller-Dott, Petr Taus, et al. 2021. "decoupleR: Ensemble of Computational Methods to Infer Biological Activities from Omics Data." <https://doi.org/10.1101/2021.11.04.467271>.