

# Etablierung des E2F1-Interaktoms metastasierungsrelevanter Faktoren durch Integration bioinformatischer und experimenteller Methoden

## Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

## vorgelegt von

Stephan Marquardt,

geboren am 05.07.1981 in Berlin

Rostock, Oktober 2019



Dieses Werk ist lizenziert unter einer  
Creative Commons Namensnennung-Nicht kommerziell 4.0  
International Lizenz.

**Gutachter:**

Frau Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Brigitte M. Pützer, Institut für Experimentelle  
Gentherapie und Tumorforschung an der Universitätsmedizin Rostock

Herr Prof. Dr. rer. nat. Lars Kaderali, Institut für Bioinformatik der Universität  
Greifswald

Jahr der Einreichung: 2019

Jahr der Verteidigung: 2020

## Vorwort

*„Ich werde Pflanzen und Tiere sammeln, die Wärme, die Elastizität, den magnetischen und elektrischen Gehalt der Atmosphäre untersuchen, sie zerlegen, geografische Längen und Breiten bestimmen, Berge messen – aber alles dies ist nicht Zweck meiner Reise. Mein eigentlicher, einziger Zweck ist, das Zusammen- und Ineinander-Weben aller Naturkräfte zu untersuchen, den Einfluss der toten Natur auf die belebte Tier- und Pflanzenschöpfung.“*

Alexander von Humboldt (1769 - 1859)

in „Versuch über den politischen Zustand des Königreichs Neu-Spanien“ (1813)

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
I.1. Der Transkriptionsfaktor E2F1.....	5
I.1.1. E2F1 als Schlüsselprotein im Zellzyklus .....	6
I.1.2. E2F1 als Tumorsuppressor - Regulator der DNA-Integrität und Auslöser der Apoptose .....	10
I.1.3. E2F1 als Onkogen – Auslöser von Tumorwachstum und Metastasierung .....	12
I.1.4. E2F1 ist in zahlreiche weitere zelluläre Prozesse involviert .....	14
I.2. Genregulatorische Netzwerke .....	16
I.3. Zielsetzung .....	19
<b>II. Material und Methoden.....</b>	<b>21</b>
II.1. Material .....	21
II.1.1. Geräte .....	21
II.1.2. Chemikalien und Enzyme .....	22
II.1.3. Kits.....	23
II.1.4. Plasmide .....	23
II.1.5. Adenovirale Vektoren .....	23
II.1.6. Lentivirale Vektoren.....	24
II.1.7. Zelllinien .....	25
II.1.8. Antikörper .....	26
II.1.9. Oligonukleotide.....	27
II.1.10. Online-Datenbanken und Software .....	27
II.2. Methoden .....	30
II.2.1. RNA-Arbeitstechniken.....	30
II.2.2. DNA-Arbeitstechniken .....	31
II.2.3. Protein-Arbeitstechniken.....	33
II.2.4. Zellbiologische Arbeitstechniken .....	35
II.2.5. Konstruktion und Analyse des E2F1-Interaktionsnetzwerkes .....	38
II.2.6. Akquisition von Daten aus bioinformatischen Datenbanken .....	39
<b>III. Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>
III.1. Das E2F1-Interaktom .....	47
III.1.1. Modellierung des E2F1-Interaktions-Netzwerkes zur E2F1-Map.....	47
III.1.2. Systembiologische Analyse der E2F1-Map .....	54
III.1.3. Validierung der Ergebnisse der <i>in silico</i> -Simulationen in Tumorzelllinien .....	57
III.1.4. Analyse von Brust- und Blasenkrebs-Patientendaten der TCGA-Datenbank ...	69
III.2. Das Koregulom von E2F1 und TGF $\beta$ .....	73



III.2.1. Screening bekannter und potentieller Zielgene von E2F1 und SMAD2-4 mithilfe von ChIP-seq-Daten .....	74
III.2.2. Sequenzbasierte Suche von TFBS im Humangenom durch PWM .....	75
III.2.3. Identifizierung von E2F1- und SMAD2-4-regulierten Genen in humanen Zelllinien mit Hilfe von Transkriptomdaten .....	76
III.2.4. Zuordnung der potentiellen Zielgene zu TGF $\beta$ -assoziierten Signalwegkaskaden .....	77
III.2.5. Überlappung der potentiellen Zielgene mit bekannten EMT-Markern und EMT-assoziierten Faktoren.....	77
III.2.6. Korrelations-Analyse von Expressionsdaten der TCGA-Datenbank .....	80
III.2.7. Zusammenfassung und Auswertung der gesammelten Daten mithilfe einer multi-objektiven Optimierungsfunktion .....	81
<b>IV. Diskussion .....</b>	<b>85</b>
IV.1. Beispiele systembiologischer und bioinformatischer Arbeiten .....	86
IV.2. Die kombinierte Netzwerkanalyse als Werkzeug für die Identifizierung tumorrelevanter Mechanismen/Signaturen – E2F1 als EMT-induzierender Faktor.....	88
IV.3. TGF $\beta$ als EMT-induzierender Faktor .....	94
IV.4. Das Koregulom zweier potentieller Onkogene .....	96
IV.5. Zusammenfassung.....	99
<b>V. Anhang .....</b>	<b>i</b>

## Abkürzungsverzeichnis

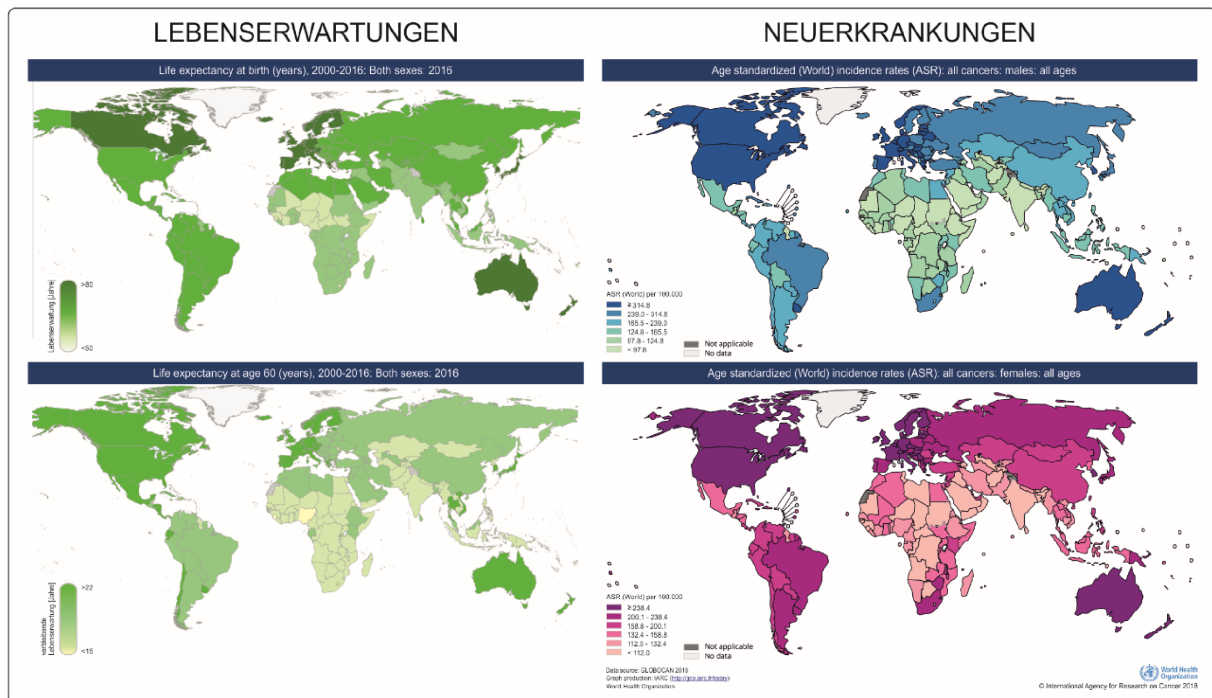
4-OHT	4-Hydroxy-Tamoxifen
AK mk/pk	Antikörper, monoklonal/polyklonal
BLCA	TCGA Bladder Cancer Kohorte
bp	Basenpaare
BRCA	TCGA Breast Cancer Kohorte
BS	Binding Site/Bindestelle
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Cytomegalovirus
DBD	DNA Bindedomäne
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	Extracellular Matrix/Extrazelluläre Matrix
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
FBL	Feedback Loop
FBS	fetal bovin Serum
FC	Fold Change
FFL	Feedforward Loop
FGFR1	Fibroblast Growth Factor Receptor 1
GEO	Gene Expression Omnibus
GFP	Green Fluorescent Protein
GO	Gene Ontology
GRN	Genregulatorisches Netzwerk
HRP	Horseradish Peroxidase
iPC	induced pluripotent cells
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MOI	Multiplicity of Infection
NES	Nuclear Export Signal/Sequence
NLS	Nuclear Localization Signal/Sequence

PBS	phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PPI	Protein-Protein-Interaktion
PWM	Position Weight Matrix
RIPA	Radio-Immun-Präzipitations-Assay-Puffer
Rb	Retinoblastoma Protein
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-Medium
RT	Raumtemperatur
TBS(T)	Tris-gepufferte Saline (mit 0,1% Tween 20)
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TF	Transkriptionsfaktor
TFBS	Transkriptionsfaktor-Bindestelle
TGFβ(R1/2)	Tumor Growth Factor beta (Receptor 1 und 2)
T <sub>m</sub>	primerspezifische Schmelztemperatur
TME	Tumormicroenvironment/Tumormikromilieu
TSS	Transcription Start Site
UV	Ultraviolett

# I. Einleitung

Krebs ist zur zweithäufigsten Erkrankung des Menschen avanciert. Die Zahl der Neuerkrankungen im Jahr 2018 wird 18,1 Millionen übersteigen, die Todesfallrate liegt mit 9,6 Millionen bei mehr als der Hälfte (IARC, 2018). Diese Entwicklung ist auf eine Vielzahl von Ursachen zurückzuführen. Zum einen sind es äußere Faktoren, die die Tumorentstehung hervorrufen oder zumindest begünstigen. Dazu zählen Lebens- und Ernährungsgewohnheiten wie Rauchen, Alkoholkonsum, Übergewicht, mangelnde körperliche Bewegung, Dysstress und Umwelteinflüsse wie die UV-Belastung und Luftverschmutzung, die das Risiko an Krebs zu erkranken besonders in Industrienationen erhöhen. Hinzu kommen genetische Alterationen und Veränderungen der Genexpression, deren Gemeinsamkeit in der Deregulierung von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen besteht. Diese können durch genetische Prädisposition (Wendt & Margolin, 2019; Lott & Carvajal-Carmona, 2018; Ma, Brosens, et al., 2018; Pintarelli, Cotroneo, et al., 2017) oder spezielle Krebs-assoziierte Viren (Kobayashi, Hisamatsu, et al., 2018; X. Wang, Huang, & Zhang, 2018; Morales-Sanchez & Fuentes-Panana, 2017; Xie, 2017) ausgelöst werden.

Des Weiteren steigt durch den stetigen medizinischen Fortschritt und die verbesserte Gesundheitsversorgung in den Industrieländern die Lebenserwartung der Menschen. Das hat nach dem von Armitage und Doll vorgeschlagenen „Multi-Hit-Modell“ vieler Krebsarten (Armitage & Doll, 1954) zur Folge, dass Krebs auslösende Mutationen mit zunehmendem Alter akkumulieren und die Tumor-Prädisposition steigt. Hinzu kommt bei einer älter werdenden Bevölkerung die Zunahme ineffektiver zellulärer Reparaturmechanismen und der Immunseneszenz (Fulop, Larbi, et al., 2013; Fulop, Kotb, et al., 2010). Der Vergleich der weltweiten Krebs-Inzidenzen mit der durchschnittlichen Lebenserwartung in den einzelnen Ländern spiegelt diese Korrelation wider (IARC, 2018)(Abb. 1). Bei einer geringen Lebenserwartung hat Krebs kaum die Chance, sich zur Todesursache zu entwickeln, wenn nicht genetische Prädispositionen oder Virus-assoziierte Erkrankungen vorliegen.



**Abbildung 1: Korrelation der Lebenserwartung mit der Krebs-Inzidenz 2016. (WHO-Statistik)**

Die Abbildung der WHO zeigt die durchschnittliche Lebenserwartung in den einzelnen Ländern bei der Geburt (links oben) und im Alter von 60 Jahren (links unten). Rechts ist die Verteilung der altersstandardisierten Krebs-Inzidenzen abgebildet (oben männlich, unten weiblich). Hier korrelieren die höhere Lebenserwartung in Industrienationen und Schwellenländern im Vergleich zu Entwicklungsländern mit erhöhten Inzidenzen. Zusätzliche Umweltfaktoren wie zum Beispiel Lebensgewohnheiten können die Unterschiede innerhalb der Industrieländer (Nord- und Südamerika, Europa, Australien) ausmachen. Abbildung nach (GCO, 2018b)

In der Regel beginnt eine Krebserkrankung mit unkontrollierter Zellteilung aufgrund von durch einzelne Mutationen gestörten Signalwegen. Dieses Stadium des Primärtumors ist in den seltensten Fällen tödlich (Mehlen & Puisieux, 2006). Erst durch Akkumulation weiterer genetischer und epigenetischer Aberrationen und das dadurch einsetzende invasive Wachstum, wodurch es zur Ausbreitung maligner Zellen im Körper und zur Metastasenbildung kommt, enden etwa 53% aller Krebserkrankungen tödlich. Während bestimmte Tumorentitäten wie das Prostatakarzinom (Mortalität/Inzidenz 2018: 28%) und bestimmte Brustkrebstypen (30%) weniger aggressive Formen ausbilden, was als Erfolg der verbesserten Früherkennung bewertet werden kann, beziehungsweise ein großer Teil der Patienten gut behandelbar ist, sind Karzinome der Lunge, Leber und

Bauchspeicheldrüse hoch aggressiv und führen in den meisten Fällen (Mortalität/Inzidenz 2018: 84%, 93%, 94%) zum Tod (GCO, 2018a). Dabei werden mehr als 90% der krebsbedingten Todesfälle durch die Metastasierung des Primärtumors verursacht. Die Schwierigkeiten bei der Behandlung solcher Tumoren lassen sich auf mehrere Faktoren zurückführen: i) das Streuungspotential des Primärtumors und die Zielorgane der Metastasen; ii) das Proliferationspotential der Metastasen im Sekundärorgan; entweder sind die Tumorzellen stark proliferierend und wachsen aggressiv in das umgebende Gewebe hinein oder sie liegen „schlafend“ als sogenannte dormante Zellen vor; iii) die Therapieresistenz von Primärtumor und Metastasen. Dabei gehören die Bestrahlung, Chemotherapie oder die Behandlung mit biochemischen Inhibitoren wie Tyrosinkinase-Hemmern (zum Beispiel Afatinib, Erlotinib, Imatinib), Rezeptor-Antikörpern (zum Beispiel Trastuzumab, Ipilimumab, RO5429083, TC-BsAb) oder Immuntherapien mit Checkpoint-Inhibitoren wie PD-1- oder CTLA4-Inhibitoren (Marquardt, Solanki, et al., 2018) zu den gängigen Verfahren. Für das Nichtansprechen auf eine Therapie sind möglicherweise heterogene Tumoren mit Krebsstammzell-assoziierten Therapieresistenzen verantwortlich, die als Rezidive wiederkehren.

Die größte und bis heute nur mäßig erfolgversprechende Herausforderung bei Krebserkrankungen besteht in der Entwicklung von Therapien zur Prävention von Metastasen und zur Verbesserung der Überlebensrate von Patienten durch hochselektive anti-metastatische Behandlungsverfahren. Dabei ist die Früherkennung tumor-progressiver Prozesse auf der Basis von Tumor- und Metastasierungs-Biomarkern und die Kenntnis molekularer Signalnetzwerke, die zur Metastasierung führen, von entscheidender Bedeutung.

Zu den verschiedenen Stufen der Metastasierungskaskade gehören die epithelial-mesenchymale Transition (EMT), die Intravasation, Homing und Extravasation sowie die Ansiedlung der Tumorzelle im Sekundärorgan und Ausbildung der sogenannten metastatischen Nische zur Proliferation der Metastase. Bereits dieser erste Schritt ist ein komplexer Prozess, durch den die Zelle eine Reihe von neuen Eigenschaften erhält. Bei der EMT nehmen epitheliale Zellen mesenchymale Eigenschaften an, wobei sie die Zell-Zell-Kontakte verlieren und invasiv-migratorische Fähigkeiten erlangen und sind dadurch in der Lage, sich aus dem Zellverband zu lösen. In der Embryogenese ist die EMT ein notwendiger Mechanismus, um Organstrukturen zu formen. In der Regel werden die

beteiligten Prozesse von den Zellen wieder abgeschaltet (Thiery, Acloque, et al., 2009). Tumorzellen können die Fähigkeit, mesenchymale Eigenschaften anzunehmen, durch epigenetische Mechanismen und die Aktivität bestimmter Transkriptionsfaktoren reaktivieren (Stemmler, Eccles, et al., 2019; Skrypek, Goossens, et al., 2017; Tam & Weinberg, 2013). Hierzu gehören das Überwinden der sogenannten Anoikis, der durch fehlende Zellkontakte induzierten Apoptose, die Produktion sowie Sekretion von Enzymen zum Verdau der extrazellulären Matrix (ECM) und der Basalmembran und die nötige Motilität, sich gerichtet durch die ECM bewegen zu können. Anschließend stellt die Intravasation den Übergang der Tumorzelle in die Lymph- oder Blutgefäße dar, was ihr die Möglichkeit verleiht, in andere Organe zu gelangen. Die Eigenschaft von Tumorzellen, sich aus der Blutbahn in spezifischen Organen niederzulassen, nennt man Homing. In vielen Fällen folgen die zirkulierenden Tumorzellen dem Blutstrom und befallen nachfolgende Organe. Aus physiologischen Gründen ist dies oft die Lunge. Es gibt aber auch molekulare Affinitäten und Aversionen zwischen Tumorzellen und bestimmten Organen. So wandern Prostata- und Brustkrebszellen häufig in das Knochengewebe, Lungentumoren dagegen in die Nieren. Durch die Extravasation gelangen die Tumorzellen schließlich in das Sekundärorgan, wo sie entweder neue Kolonien, die Metastasen, bilden oder für unbestimmte Zeit still in ihrer Nische verharren.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass der Transkriptionsfaktor E2F1 auf die molekularen Vorgänge bei der Metastasierung direkten Einfluss ausübt. Eine Deregulierung der strengen Kontrolle der E2F1-Aktivität und seines genregulatorischen Netzwerkes (GRN) kann in einer Vielzahl von Krebsarten zur Ausbildung hoch aggressiver, therapieresistenter Tumoren und Metastasen führen (Knoll, Fürst, et al., 2014; Meier, Spitschak, et al., 2014; Knoll, Emmrich, & Pützer, 2013; Vera, Schmitz, et al., 2013; Alla, Kowtharapu, et al., 2012; Engelmann & Pützer, 2012; Alla, Engelmann, et al., 2010; Lee, Leem, et al., 2010; Pützer, Steder, & Alla, 2010). Nachdem Studien gezeigt haben, dass Melanom-Metastasen im Vergleich zu ihren Primärtumoren erhöhte E2F1-Level aufweisen (Nelson, Reynolds, et al., 2006; Tuve, Wagner, et al., 2004), konnten wir zum ersten Mal die metastasierungsfördernde Funktion von E2F1 *in vivo* nachweisen (Alla, Engelmann, et al., 2010).

## I.1. Der Transkriptionsfaktor E2F1

Das zentrale Dogma der Biologie, Gen – mRNA – Protein, lässt sich zu einem Regelkreis schließen, da es Proteine sind, die wiederum die Gene regulieren, um die genomischen Informationen im Zellkern nutzen zu können. Da nicht alle Gene ständig exprimiert werden müssen, ist eine strenge Kontrolle der Genexpression ausschlaggebend für die organspezifische Funktion von Zellen. In den 1960er und 70er Jahren wurde der Einfluss von bestimmten Proteinen, sogenannten Transkriptionsfaktoren (TF), auf die Transkription untersucht. Modellorganismen waren damals die vergleichsweise simpel konstruierten und einfach zu nutzenden Prokaryoten. Die hier entdeckten genomischen Regulationsmechanismen wie Enhancer, Silencer und das Operon-Modell sind sehr schematisch und einfach verständlich. Das heutige Wissen über die eukaryotische Genregulation beleuchtet die immense Komplexität der evolutionär immer komplexeren Regulationsmechanismen aus Proteinen (TF, Kofaktoren, epigenetische Modulatoren), nicht-kodierenden RNAs (microRNAs, zirkuläre RNAs, small nuclear RNAs, long non-coding RNAs), Ribozymen und anderem mehr. Dabei stellen die Proteine die effektivsten Regulatoren dar. Die evolutionär jüngere Regulation durch einige RNAs sorgte für weiteres Entwicklungspotenzial der Organismen (Morris & Mattick, 2014; Rinn & Chang, 2012; Guarnieri & DiLeone, 2008; Venter, Adams, et al., 2001; Eddy, 1999).

Per Definition besitzen alle TF eine oder mehrere DNA-Bindedomänen und zusätzlich Effektdomänen zur Interaktion mit anderen Proteinen für die Transaktivierung oder die eigene Regulierbarkeit. Die DNA-Bindedomänen sind evolutionär hoch konserviert, während die Effektdomänen größeren evolutionären Entwicklungen unterliegen. Im Lauf der Evolution hat sich nur eine Handvoll an Strukturmotiven entwickelt, um DNA zu binden: das *helix-turn-helix*- (E2F1), *helix-loop-helix*-, *zinc finger*-, *basic protein-leucine zipper*- und das *beta-Faltblatt-Motiv*. Einige TF werden ubiquitär in allen Zellen exprimiert wie JUN (Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit) oder NFκB (Nuclear Factor kappa B), andere sind zelltypspezifisch und beispielsweise für die Enzymproduktion in bestimmten Drüsenzellen oder für die Differenzierung in einen speziellen Zelltyp verantwortlich. TF interagieren miteinander und bilden Multiprotein-Komplexe aus TF und Kofaktoren, wie Chromatin modifizierenden Enzymen (zum Beispiel Histon-Acetyltransferasen und Histon-Methyltransferasen). Zusätzlich existieren Mediatoren für

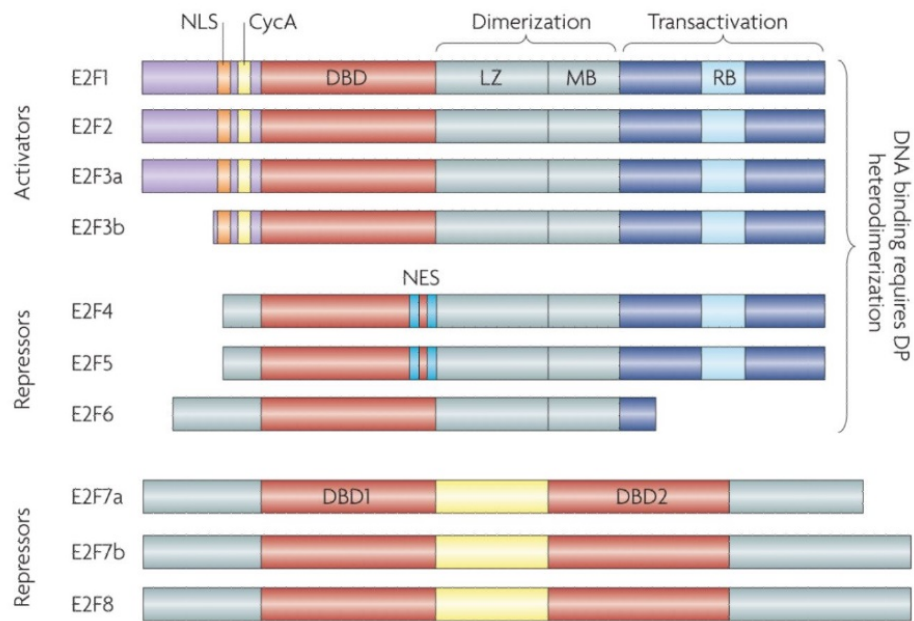


Protein-Protein-Interaktionen (PPI), sodass verschiedene TF aus unterschiedlichen Signalwegen auf einem Gen miteinander wechselwirken können.

Eines der bekanntesten Beispiele für das Zusammenspiel von Transkriptionsfaktoren ist das GRN der Yamanaka-Faktoren Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc, welches während der Embryogenese die Stammzeleigenschaften aufrechterhält (Takahashi & Yamanaka, 2006). Die Yamanaka-Faktoren autoregulieren sich selbst (positiver Feedback-Loop, FBL), aktivieren andere Transkriptionsfaktoren, Kofaktoren und Chromatinregulatoren und reprimieren Faktoren, die zur Zelldifferenzierung führen (Onichtchouk, Geier, et al., 2010).

### I.1.1. E2F1 als Schlüsselprotein im Zellzyklus

Der 1986 als Transkriptionsfaktor des adenoviralen E2-Promotors entdeckte Transkriptionsfaktor E2F1 (Kovesdi, Reichel, & Nevins, 1986) ist das am besten untersuchte und bis dato mit den meisten Funktionen belegte Mitglied der E2F-Familie. Diese Familie besteht aus acht Transkriptionsfaktoren (E2F1-8) mit hoher Sequenz-Ähnlichkeit (DeGregori & Johnson, 2006). Je nach Vertreter existieren konservierte Domänen für die Bindung von DNA, Dimerisierungspartnern (Transcription Factor Dp-1-3, TFDP1-3) (Morgunova, Yin, et al., 2015; Xanthoulis & Tiniakos, 2013; Yonghui Zhang, Venkatraj, et al., 1997; Y Zhang & Chellappan, 1995), Pocket-Proteinen (Retinoblastoma - Rb, p107, p130) (Schwarz, Devoto, et al., 1993; Chellappan, Hiebert, et al., 1991) und Kofaktoren für die Transaktivierung von Genen (Abb. 2).

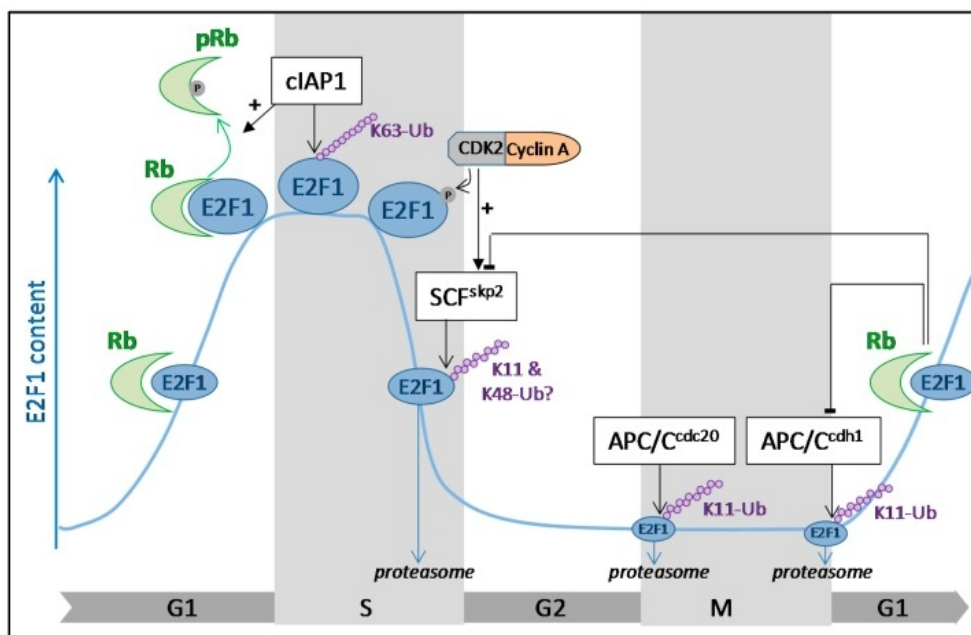


## Abbildung 2: Die Familie der E2F-Transkriptionsfaktoren.

Dargestellt sind die acht Mitglieder der E2F-Familie mit ihren durch einen alternativen Promotor (E2F3) beziehungsweise alternatives Splicing (E2F7) entstehenden Isoformen. Allen Vertretern gemein ist die erste DNA-Bindedomäne (DBD). E2F7 und -8 besitzen zwei DNA-Bindedomänen, was sie unabhängig von den Kofaktoren TFDP1-3 macht. E2F1-6 können über ihre Dimerisierungsdomäne (mit Leucin-Zipper- und Marked-Box-Sequenz) TFDP1-3 binden. E2F1-5 besitzen zudem die Transaktivierungsdomäne, die durch die Bindung an eines der Pocket-Proteine (RB) kaschiert wird. Die aktivierenden Vertreter (E2F1-3) besitzen N-terminal eine Nukleus-Lokalisations-Sequenz (NLS) und eine Zyklin A-Bindesequenz (CycA), die hemmenden (E2F4, -5) eine Nukleus-Export-Sequenz (NES) (H.-Z. Chen, Tsai, & Leone, 2009).

Die acht Mitglieder haben sowohl spezifische, redundante, als auch antagonistische Funktionen (To & Andrechek, 2018; X. Xu, Bieda, et al., 2007). Verschiedene Vertreter können dieselben Zielgene aktivieren beziehungsweise inhibieren. Die unterschiedlichen Funktionen zeigen sich bereits, wenn man die Regulierung der jeweiligen E2Fs betrachtet: E2F1-5 werden durch Mitglieder der Pocket-Proteine (Rb-Familie: Rb, p107/Rb-like protein 1 und p130/Rb-like protein 2) über die Transaktivierungsdomäne gebunden und kontrolliert, wodurch es entweder zur Hemmung ihrer transaktivierenden Funktion (E2F1-3) oder zur Aktivierung ihrer suppressiven Funktion (E2F4 und E2F5) an den Zielgenen kommt (DeGregori & Johnson, 2006; Hatakeyama & Weinberg, 1995; Buchkovich, Duffy,

& Harlow, 1989). Pro-proliferative Wachstumsfaktoren führen zur Aktivierung von zyclin-abhängigen Kinasen, wodurch die Pocket-Proteine phosphoryliert und E2F freigesetzt beziehungsweise aktiviert wird (Abb. 3). E2F1-3 translozieren daraufhin mithilfe ihrer nukleären Lokalisierungs-Sequenz (NLS) in den Zellkern und induzieren die Transaktivierung zellzyklusrelevanter S-Phase-Gene (L. Wu, Timmers, et al., 2001; Magae, Wu, et al., 1996). Auf ähnliche Weise führt die Hyperphosphorylierung von p107 und p130 zur Inaktivierung der zellzyklushemmenden Mitglieder E2F4 und -5. Letztere üben im Komplex mit ihren dephosphorylierten Kofaktoren p107 und p130 in der G0-Phase, dem Ruhezustand der Zelle (sogenannte Quieszenz), eine hemmende Wirkung auf ihre Zielgene (S-Phase-Gene) aus und spielen daher bei Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen eine Rolle (Kwon, Everetts, et al., 2017; Chong, Wenzel, et al., 2009; Gaubatz, Lindeman, et al., 2000; Humbert, Rogers, et al., 2000). Die nach Hyperphosphorylierung von p107 beziehungsweise p130 zugängliche Nukleus-Export-Sequenz (NES) von E2F4 und -5 führt zum Export aus dem Zellkern.

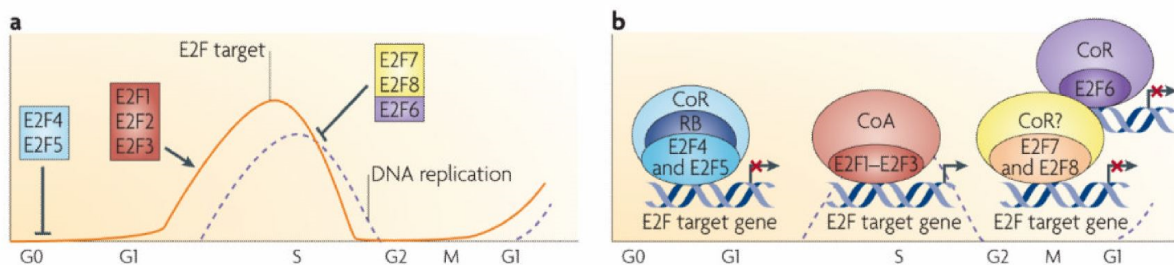


**Abbildung 3: Die Regulation von E2F1 im Verlauf des Zellzyklus.**

Die Aktivität von E2F1 im Verlauf des Zellzyklus wird zum einen auf transkriptioneller Ebene (E2F1 content), zum anderen durch Protein-Protein-Interaktionen (Rb), posttranslationale Modifikationen (cIAP1, Cyclin A) und proteasomalen Abbau reguliert (Dubrez, 2017).

E2F6-8 werden aufgrund der fehlenden Pocket-Protein-Bindedomäne Rb-unabhängig reguliert und besitzen zum Teil zwei DNA-Bindedomänen (E2F7 und E2F8), was sie unabhängig von der Heterodimerisierung mit TFDP1-3 macht. Sie alle fungieren als transkriptionelle Repressoren (Abb. 4a und b) (Logan, Graham, et al., 2005; de Bruin, Maiti, et al., 2003; Di Stefano, Jensen, & Helin, 2003; J M Trimarchi, Fairchild, et al., 2001; Cartwright, Müller, et al., 1998; Gaubatz, Wood, & Livingston, 1998; Verona, Moberg, et al., 1997).

Parallel zum Zellzyklus durchläuft auch E2F1 einen Expressions-Zyklus. In der G2- und M-Phase wird es supprimiert und erst zu Beginn der G1-Phase induziert (Abb. 3). Es interagiert nach einem genauen molekularen Plan mit einer Reihe von Kofaktoren, die durch posttranskriptionelle Modifikationen seine Aktivität, Zielgen-Spezifität, Proteinstabilität und am Ende der S-Phase wieder seinen proteasomalen Abbau beeinflussen (Dubrez, 2017). Eine Störung dieses Prozesses, zum Beispiel durch Anwesenheit einer abbauresistenten E2F1-Mutante in der G2-Phase, kann zur Apoptose der Zellen führen (Davidson & Duronio, 2012).



**Abbildung 4: Die antagonistische Regulation von Zielgenen durch die E2F-Familie.**

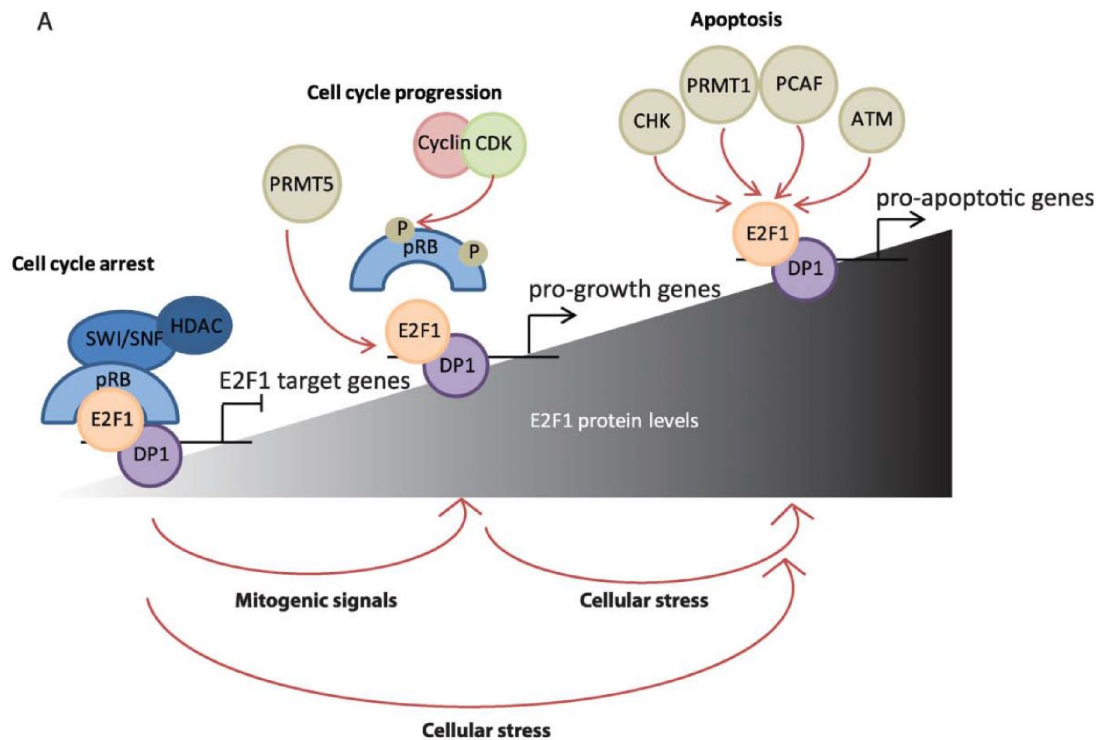
**(a)** Im Verlauf des Zellzyklus agieren die Mitglieder der E2F-Familie antagonistisch. Die jeweiligen Aktivitäten unterliegen dabei einer streng regulierten Kontrolle **(b)** E2F4/5 im Komplex mit einem Pocket-Protein (RB) und Korepressoren (CoR) hemmen die Expression von S-Phase-Genen. Erst nach Inaktivierung der Pocket-Proteine zu Beginn der S-Phase werden die repressiven Proteinkomplexe an den Promotoren von den aktivierenden E2F1/2/3-Koaktivator-Komplexen (CoA) ersetzt. Zusätzlich können am Ende der S-Phase E2F6-8 zusammen mit Korepressoren die Expression von E2F-Zielgenen hemmen (H.-Z. Chen, Tsai, & Leone, 2009).

### I.1.2. E2F1 als Tumorsuppressor - Regulator der DNA-Integrität und Auslöser der Apoptose

Als ein Schlüsselfaktor im Zellzyklus zu fungieren, ist nicht die einzige Aufgabe, die E2F1 abhängig vom molekularen Kontext der Zelle erfüllt. Die Überexpression von E2F1 in ruhenden (quieszenten) normalen Zellen und Tumorzellen kann zur Apoptose führen (Jens Stanelle & Pützer, 2006; J Stanelle, Stiewe, et al., 2003; H. L. Yang, Dong, et al., 2000; Gomez-Manzano, Fueyo, et al., 1999; Fueyo, Gomez-Manzano, et al., 1998; Kowalik, DeGregori, et al., 1995; Shan & Lee, 1994; X. Q. Qin, Livingston, et al., 1994; X. Wu & Levine, 1994; Johnson, Schwarz, et al., 1993). Durch Wachstumsfaktoren zur Proliferation angeregte Zellen können hingegen über den PI3K-AKT-Signalweg dem E2F1-vermittelten Zelltod (Apoptose) entgegenwirken (Hallstrom, Mori, & Nevins, 2008).

Registriert die Zelle durch genotoxischen Stress induzierte DNA-Schäden, kann E2F1 Apoptose über p53-abhängige und -unabhängige Signalwege einleiten. Dazu aktiviert es zum Beispiel das p53-Homolog p73 (Stiewe & Pützer, 2000) und weitere pro-apoptotische Gene wie APAF1 (Apoptotic Peptidase Activating Factor 1), Puma (BBC3), Noxa (PMAIP1), Harakiri (HRK) oder Bim (BCL2L11). Gleichzeitig hemmt es anti-apoptotische Faktoren wie BCL2 und HSPA5 (Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 5) (Poppy Roworth, Ghari, & La Thangue, 2015; Massip, Arcondéguy, et al., 2013; Engelmann & Pützer, 2010; Engelmann, Knoll, et al., 2010; Racek, Buhlmann, et al., 2008; Hershko & Ginsberg, 2004; Stiewe & Pützer, 2000). Parallel dazu ist E2F1 in der Lage, durch die Transaktivierung entsprechender Zielgene wie RAD51, XRCC4 (X-ray Repair Cross Complementing 4), NHEJ1 (Non-Homologous End Joining Factor 1), Artemis und Survivin die DNA-Reparatur und Überlebenssignale zu induzieren (Richter, Marquardt, et al., 2019; Galanos, Pappas, et al., 2018; Castillo, Campalans, et al., 2015; M. Wu, Wang, et al., 2014; Huang, Liu, et al., 2007; Hasselbach, Haase, et al., 2005; Jiang, Saavedra, et al., 2004). Posttranslationale Modifikationen durch DNA-Damage Checkpoint Kinasen wie ATM, ATR und CHEK1 (Checkpoint Kinase) und -2 stabilisieren E2F1 und es übernimmt neben den transkriptionellen auch nicht-transkriptionelle Aufgaben, indem es zusammen mit Kofaktoren (TOPBP1 - DNA Topoisomerase II Binding Protein 1, KAT2A - Lysine Acetyltransferase 2A) an den DNA-Doppelstrangbrüchen akkumuliert, um Reparaturenzyme zu rekrutieren (Biswas & Johnson, 2012; Jie Chen, Zhu, et al., 2011; S.-Z. Yang, Lin, & Lin, 2008) (Abb. 5).

In Abbildung 5 sind die Funktionen des Transkriptionsfaktors in Abhängigkeit vom E2F1-Proteingehalt in karyotypisch normalen Zellen zusammengefasst.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Rolle von E2F1 in karyotypisch normalen Zellen abhängig vom E2F1-Proteinlevel.**

In gesunden ruhenden Zellen wird die E2F1-Aktivität durch Bindung an Rb und den SWI/SNF-Silencing-Komplex inhibiert. Letzterer rekrutiert Chromatin modifizierende Enzyme wie Histon-Deacetylasen (HDAC), die Gene abschalten (links). In proliferierenden Zellen wird Rb zu Beginn der G1-Phase durch zyklinabhängige Kinasen (CDK) phosphoryliert (deaktiviert), wodurch E2F1 und seine Transaktivierungsdomäne frei werden. Die transaktivierende Funktion von E2F1 an Zellzyklusgenen wird durch Koaktivatoren wie den Chromatin modulierenden Faktor PRMT5 (Protein Arginine Methyltransferase 5) unterstützt (Mitte). Gleichzeitig besetzte Promotoren pro-apoptotischer Gene werden in diesem Kontext nicht transaktiviert. Kommt es jedoch unter genotoxischem Stress zu DNA-Schäden, wird das E2F1-Protein durch post-translationalen Modifikatoren (ATM, CHK/CHEK) stabilisiert und reichert sich in der Zelle an. Dabei aktiviert E2F1 DNA-Reparaturenzyme und rekrutiert diese zu den besetzten geschädigten DNA-Abschnitten. Ist der Grad der DNA-Schädigung zu hoch, aktiviert E2F1 mithilfe von Kofaktoren (PCAF/KAT2B – Lysine Acetyltransferase 2B, PRMT1 – Protein Arginine Methyltransferase 1) pro-apoptotische Zielgene und induziert Apoptose (rechts) (Poppy Roworth, Ghari, & La Thangue, 2015).

### I.1.3. E2F1 als Onkogen – Auslöser von Tumorwachstum und Metastasierung

Da E2F1 als Zellzyklusregulator für die Transaktivierung proliferationsrelevanter Gene verantwortlich ist, scheint es nicht überraschend, dass es auch tumorogene Eigenschaften besitzt. Diese manifestieren sich nach Verlust des E2F1-Inhibitors Rb durch Deregulation von E2F1 (Simin, Wu, et al., 2004). In transgenen Rb<sup>+/-</sup>-Mäusen, die aufgrund eines fehlenden Rb-Allels wenig Rb exprimieren, kommt es durch die erhöhte E2F1-Aktivität zu einer gesteigerten Tumorbildung. Diese kann durch Deletion von E2F1 in diesen Tieren gehemmt werden. Andererseits wurde in transgenen E2F1<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht nur eine gestörte Apoptose-Funktion, sondern auch eine erhöhte Tumorphilierung beobachtet (Yamasaki, Bronson, et al., 1998). In einem Mausmodell, in dem Her2/Neu-transgene Tiere mit E2F-Knockout-Mäusen gekreuzt wurden, verzögerte sich durch das Fehlen von E2F1, -2 oder -3 die durch Her2/Neu-induzierte Bildung von Tumoren (Rennhack & Andrechek, 2015). Gleichzeitig beschleunigte der Verlust von E2F1, jedoch nicht der von E2F2 oder -3, das spätere Tumorwachstum. Des Weiteren schlug sich das Fehlen von E2F1 und -2 auf die Anzahl an zirkulierenden Tumorzellen und das metastasierende Potential der entstandenen Tumoren nieder. Ausgehend von diesen Beobachtungen im Mausmodell identifizierte die Gruppe von Andrechek bei Brustkrebspatienten eine Subpopulation von Her2<sup>+</sup>-Patienten, bei der die rezidivfreie Zeit umgekehrt proportional mit der Aktivität von E2F1 zusammen hing (Andrechek, 2015).

Durch Transkriptom-Analysen von Blasenkarzinomen wurde eine Signatur von E2F1-abhängigen Zielgenen identifiziert, deren Expression ein stark erhöhtes Risiko für den Übergang von einem nicht invasiven zu einem muskelinvasiven Tumor darstellt (Lee, Leem, et al., 2010). Vergleichbare Untersuchungen von Brust-, Ovarial- und Prostatakarzinomen weisen auf E2F1-abhängige Gensignaturen hin, deren gesteigerte Expression mit einem erhöhten Tumorgrad beziehungsweise einer fortgeschrittenen Tumorerkrankung einhergeht (ERGO – E2F1-Responsive Gene Overexpressing tumors) (Shackney, Chowdhury, & Schwartz, 2014). Unsere Arbeitsgruppe hat als erste den funktionellen Nachweis für die Schlüsselfunktion von E2F1 bei der Metastasierung von Melanomzellen erbracht und gezeigt, dass die E2F1-induzierte Invasivität durch Inhibition des direkten Zielgenes Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) verhindert werden kann (Alla, Engelmann, et al., 2010; Pützer, Steder, & Alla, 2010).

Mittlerweile assoziieren mehrere Gruppen die hohen E2F1-Level in Tumoren von Patienten mit Lungen-, Magen- und Ovarialkarzinom, Lymphom, Melanom, Blasen- und Brustkrebs mit einer schlechten Überlebensprognose (Manicum, Ni, et al., 2018; Rouaud, Hamouda-Tekaya, et al., 2018; B. Wang, Ma, et al., 2015; Molina-Privado, Rodríguez-Martínez, et al., 2009; Rhodes, Kalyana-Sundaram, et al., 2005; Imai, Oda, et al., 2004; Gorgoulis, Zacharatos, et al., 2002). Die Relevanz von E2F1 für die Metastasierung unterstützend wurde in fortgeschrittenen Tumoren und Metastasen verschiedener Tumorentitäten gegenüber Primärtumoren beziehungsweise frühen Tumorstadien eine erhöhte E2F1-Expression nachgewiesen (Fenner, Goody, et al., 2017; X. T. Wang, Xie, & Xiao, 2011; Melnikova, Dobroff, et al., 2010; Nelson, Reynolds, et al., 2006; Iwamoto, Banerjee, et al., 2004; Tuve, Wagner, et al., 2004). Die gesteigerte E2F1-Aktivität führt bei hochgradigen Tumoren nicht zur Apoptose wie in gesunden Zellen, sondern verleiht ihnen einen selektiven Vorteil, indem sie die Tumorzellen unabhängiger von ihrer Umgebung macht, sie stärker proliferieren und genetisch flexibler werden lässt (De Smedt, Lui, et al., 2018; Skrypek, Goossens, et al., 2017; Y. Gao, Li, et al., 2017; Tam & Weinberg, 2013). Dadurch werden E2F1-regulierte Tumorzellen, wie für aggressive Krebszellen typisch, resistent gegenüber äußeren Einflüssen und konventionellen Therapien. Die hierfür verantwortlichen molekularen Mechanismen werden durch E2F1-abhängige Gene und Signalnetzwerke gesteuert (Li, Huang, et al., 2018; Loria, Laquintana, et al., 2018; Xiong, Ye, et al., 2018; Alla, Kowtharapu, et al., 2012; Engelmann, Knoll, et al., 2010).

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben den Vascular Endothelial Growth Factor C (VEGF-C) und dessen Rezeptor FLT4 (Fms related Tyrosine Kinase 4) als direkte Zielgene von E2F1 identifiziert. Die E2F1-induzierte Expression von VEGF-C und FLT4 in Endothelzellen führt zur Ausbildung von Tubulus-Strukturen und zur Neovaskularisierung in Mäusen. Gleichzeitig wird E2F1 durch den FLT4-Signalweg in einem positiven Feedback-Loop aktiviert und induziert im Komplex mit FLT4 die Expression des pro-angiogenen Zytokins Platelet Derived Growth Factor B (PDGF-B) (Engelmann, Mayoli-Nüssle, et al., 2013). Das Muster, seinen eigenen Koregulator zu aktivieren, wurde auch bei dem mit der Metastasierung von Brust- und Pankreaskarzinomen assoziierten Protein MTA1 (Metastasis Associated 1) und beim Hyaluronsäurerezeptor HMMR (Hyaluronan Mediated Motility Receptor) beobachtet. Der von E2F1 induzierte E2F1:MTA1-Komplex steigert das invasive Potential der Tumorzellen durch die Aktivierung von pro-metastatischen



Zielgenen. Die verstärkte Expression der Hyaluronsäuresynthase HAS2 hat unterdessen Einfluss auf die Tumorumgebung (tumor microenvironment, TME) und die Immunevasion des Tumors (Goody, Gupta, et al., 2019). Darüber hinaus moduliert E2F1 das TME über die Interaktion/Kooperation mit HMMR und die gemeinsame Aktivierung des Extrazelluläre-Matrix-Proteins Fibronectin (FN1). Das führt zur Erhöhung des invasiven Potentials und zur Tumormetastasierung. Die erhöhte E2F1/HMMR/FN1-Expression korreliert bei Patienten mit einer ungünstigen Überlebensprognose (Meier, Spitschak, et al., 2014).

#### I.1.4. E2F1 ist in zahlreiche weitere zelluläre Prozesse involviert

Die aktuellen Entwicklungen in der onkologischen Forschung weisen auf weitere Funktionen des Transkriptionsfaktors hin. Die erhöhte E2F1-Aktivität bei fehlendem Rb wird zum Beispiel mit dem Verlust der genomischen Stabilität in Zusammenhang gebracht, obwohl E2F1 für die DNA-Reparatur wichtig ist und bekannte DNA-Reparaturfaktoren induzieren kann (Richter, Marquardt, et al., 2019; Pappas, Xu, et al., 2017; Vélez-Cruz & Johnson, 2017; M. Wu, Wang, et al., 2014). Zudem ist E2F1 an der Regulation einer ganzen Reihe von Wachstums- und inflammatorischen Faktoren wie Zytokinen und Interferonen beteiligt (Ertosun, Hapil, & Osman Nidai, 2016; Lim, Yao, et al., 2007; M. Chen, Capps, et al., 2002). Durch kombinierte Netzwerk- und Transkriptom-Analyse von Melanomen wurde ein E2F1-abhängiges Netzwerk aus differentiell regulierten EMT-Faktoren identifiziert, welches die Resistenz von Patienten gegenüber einer PD-1 (Programmed Cell Death 1)-Therapie verursacht (Dreyer, Cantone, et al., 2018). In T-Zellen ist E2F1 ein prominenter Regulator von Chromatinbereichen, die zu einer Abnahme der T-Zell-Antwort auf Tumor-Neoantigene und damit zur Immun-Evasion dieser Tumoren führen (Philip, Fairchild, et al., 2017; Schietinger, Philip, et al., 2016). Ein weiteres aktuelles Forschungsfeld, in dem E2F1 eine Rolle zu spielen scheint, ist die Etablierung von Stammzeleigenschaften und Induktion pluripotenter Zellen (iPCs). E2F1 ist Teil eines Netzwerkes aus Pluripotenz induzierenden TF und transaktiviert nachweislich an der Selbsterneuerung beteiligte Signalwege (Boward, Wu, & Dalton, 2016; Yeo, Beh, et al., 2011; Xi Chen, Xu, et al., 2008). Als Transkriptionsfaktor mit breiter Spezifität ist E2F1 in der Lage, eine große Anzahl von Zielgenen zu regulieren. Dazu zählen auch Faktoren des zellulären Metabolismus, wodurch E2F1 Einfluss auf den Warburg-

Effekt, die Insulin-Sekretion, die Glykolyse/Glukoneogenese, die Lipolyse/Lipogenese, die Adipogenese und den oxidativen Stoffwechsel ausübt (Denechaud, Fajas, & Giral, 2017; Denechaud, Lopez-Mejia, & Fajas, 2016; Denechaud, Lopez-Mejia, et al., 2016).

Die beschriebenen Erkenntnisse unterstreichen die Rolle, die E2F1 bei der Initiation, Progression und Therapieresistenz hoch aggressiver Tumoren spielt. Sie weisen auf seine antagonistischen, stark kontextabhängigen Funktionen hin, die eine streng kontrollierte spatio-temporäre Regulation von E2F1 durch andere Faktoren erfordert. Gerät dieses fein ausbalancierte „Yin-und-Yang-Verhalten“ von E2F1 außer Kontrolle, überwiegen entweder die tumorsuppressiven Funktionen und führen zum Zelltod oder die onkogenen Eigenschaften, die zur unkontrollierten Proliferation und im Weiteren zu aggressiven, resistenten Tumoren und Metastasen führen können (Meng & Ghosh, 2014; Pützer & Engelmann, 2013; Tian, Cui, & Esteban, 2013; Hallstrom, Mori, & Nevins, 2008; La Thangue, 2003). Weil E2F1 nicht nur als nachgeschalteter Effektor von Signalkaskaden agiert, sondern auch maßgeblich an deren Regulation beteiligt ist, steht es im Zentrum vieler regulatorischer Feedback- und Feedforward (FFL)-Loops (Jiaoe Chen, Gong, et al., 2018; Rouaud, Hamouda-Tekaya, et al., 2018; Ertosun, Hapil, & Osman Nidai, 2016; Meier, Spitschak, et al., 2014; Engelmann, Mayoli-Nüssle, et al., 2013; Alla, Engelmann, et al., 2010; M. Chen, Capps, et al., 2002; Brennan, Babbage, et al., 1997). Dieser Umstand trägt maßgeblich dazu bei, dass die Aktivität von E2F1 sowie die nachgeschalteten molekularen Signalwege und Reaktionen der Zelle sehr komplex, nicht intuitiv und dadurch im Zusammenspiel nur schwer fassbar sind.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit ein Netzwerk erstellt, welches die in der Literatur beschriebenen Interaktionen von E2F1 mit seinen Zielgenen, nicht-kodierenden RNAs und Kofaktoren in ihrer Komplexität erfasst. Das entstandene E2F1-Interaktionsnetzwerk (sogenannte E2F1-Map) war die Grundlage für eine Netzwerkanalyse zum Verhalten von E2F1 vor verschiedenen Tumor-Hintergründen.

## I.2. Genregulatorische Netzwerke

Bereits 1941 haben George Wells Beadle und Edward Lawrie Tatum in ihrer Arbeit "Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*" konstatiert: "*An organism consists essentially of an integrated system of chemical reactions controlled in some manner by genes.*" (Beadle & Tatum, 1941). Die hohe Komplexität der damals noch vage mit "*in some manner*" beschriebenen genetischen Kontrollmechanismen stellt die Forschung bis heute vor eine große Aufgabe und lässt neue Zweige der Biologie erwachsen.

Diese Kontrollmechanismen sind hoch dynamische und flexible genregulatorische Netzwerke (GRN). Auf der einen Seite sind sie sensitiv, um auf ihre Umwelt reagieren zu können, auf der anderen Seite robust gegen äußere Störungen (Zhou, Chen, et al., 2018; Masunaga, Sugimoto, et al., 2017; Kim, Vandamme, et al., 2014). GRN bestehen aus Transkriptionsfaktoren (TF), die räumlich-zeitlich kontrolliert die genomische Information ihrer Zielgene zur Expression bringen. Dazu interagieren sie an einer spezifischen Sequenz, der Transkriptionsfaktor-Bindestelle (TFBS), mit der DNA des Genes, was zur Initiation der Transkription dieses Genes führt. Das durch Translation entstehende Protein kann wiederum auf andere Gene oder auf die Transkriptionsfaktoren selbst Einfluss nehmen, wodurch ein Interaktionsnetzwerk mit FBL und FFL entsteht. Da ein TF in der Regel viele Zielgene hat und ein Zielgen durch das Zusammenwirken mehrerer TF aktiviert wird, entstehen komplexe regulatorische Netzwerke aus TF und Zielgenen. Eine fehlerhafte Regulierung des sensibel gesteuerten Fließgleichgewichtes der Zelle ist in vielen Fällen Auslöser für die Entstehung von Krankheiten wie Krebs (Shats, Deng, et al., 2017; Kolch, Halasz, et al., 2015; Krogan, Lippman, et al., 2015; Hofree, Shen, et al., 2013; Kreeger & Lauffenburger, 2010), Autoimmunerkrankungen (Meynier & Rieux-Laucat, 2019; Xin Wu, Sheng, et al., 2019; Seldin, 2015), neurodegenerative Erkrankungen (Panza, Lozupone, et al., 2019; Z.-T. Wang, Tan, et al., 2019; Alipour, Nabavi, et al., 2018; Sharma, Srivastava, et al., 2018; Blennow, de Leon, & Zetterberg, 2006) und vielen anderen (An, Lin, et al., 2018; Khera, Chaffin, et al., 2018; Rothblum-Oviatt, Wright, et al., 2016). Häufig sind die regulatorischen Mechanismen Grundlage eines hoch komplexen, nicht intuitiven Systemverhaltens, das sich der konventionellen Analyse entzieht (Alon, 2007; Kitano, 2007). Aus diesem Grund haben sich netzwerkbasierte Methoden und die mathematische Modellierung dieser Vorgänge etabliert, zum Beispiel im Zusammenhang mit der

Entstehung von Tumoren (Hofree, Shen, et al., 2013; Jonsson & Bates, 2006; Wachi, Yoneda, & Wu, 2005; Hartwell, Hopfield, et al., 1999).

Für die Analyse komplexer Netzwerke hat sich ein eigener Zweig der Biologie herausgebildet. Seit dem Hodgkin-Huxley-Modell der Nervenzelle im Jahr 1952, der ersten Simulation von Lebensprozessen auf der Basis von Differentialgleichungen, ist die mathematische Modellierung dynamischer biologischer Prozesse unmittelbar mit dem Begriff der Systembiologie verbunden (Hodgkin & Huxley, 1952).

Der Durchbruch der Systembiologie um die Jahrtausendwende geht hauptsächlich auf die Entschlüsselung des menschlichen Genomes (<http://encodeproject.org>) (Collins, Morgan, & Patrinos, 2003), die technischen Errungenschaften in den molekularbiologischen Hochdurchsatz-Verfahren, die Computertechnik und die Vernetzung durch das Internet zurück.

Auf der Grundlage des bekannten menschlichen Genomes ist es möglich, Erkrankungen durch Genom- und RNA-Sequenzierung und Genome-Wide Association Studies (GWAS) bestimmten genomischen Mutationen zuzuordnen (Xiaoji Chen, Chang, et al., 2019; Batai, Imler, et al., 2018; C. Yang, Wang, et al., 2018; Chakraborty, Hosen, et al., 2018; Ghosh, Bernstein, et al., 2018; Kyrochristos, Ziogas, & Roukos, 2018). Des Weiteren beleuchten die verschiedenen Hochdurchsatz-Methoden die unterschiedlichen Ebenen der biologischen Regulation mittels *in vitro*-Experimenten oder in Patientenmaterial. Das sogenannte Transkriptom gibt hierbei einen Einblick in die Gesamtheit aller aktiven Gene einer Zelle (Sumitomo, Nagafuchi, et al., 2018; Valdes-Mora, Handler, et al., 2018; Hoeijmakers, Bártfai, & Stunnenberg, 2012). Die Begriffe Proteom, Enzymom und Interaktom einer Zelle geben jeweils Aufschluss über verschiedene Aspekte ihrer Proteine, während das sogenannte Lokalisom den Aufenthalts- und Wirkort der zellulären Komponenten beschreibt (Chakraborty, Hosen, et al., 2018; Jalili, Gebhardt, et al., 2018; de Hijas-Liste, Klipp, et al., 2014; Kreeger & Lauffenburger, 2010; Liebermeister & Klipp, 2006; Binder & Heinrich, 2002; Heinrich, Neel, & Rapoport, 2002; Wolkenhauer, 2002).

Durch diese Technologien werden große Datenmengen (Big Data) generiert, die über online-Datenbanken prinzipiell für jeden zugänglich und mithilfe bioinformatischer Analyseverfahren interpretierbar sind. Mit ihrer Hilfe erstellen Systembiologen eine mathematische Beschreibung der Wirklichkeit, um das Verhalten von sehr einfachen bis hin zu komplexen Systemen deterministisch oder stochastisch vorherzusagen. Die

Systembiologie erweitert die bisher hauptsächlich qualitative Beschreibung der Regulation von Genen und Proteinen durch die Molekularbiologie um die quantitative Beschreibung des Zusammenwirkens der einzelnen Komponenten, um hoch komplexe und dynamische Prozesse zu verstehen, die der klassischen Biologie bisher verborgen blieben (Werner, Mills, & Ram, 2014).

### I.3. Zielsetzung

Die Behandlung von Patienten mit einem invasiv wachsenden oder bereits metastasierten Tumor stellt eine besondere Herausforderung für die Krebstherapie dar. Beim zugrunde liegenden biologischen Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition, kurz EMT, durchläuft eine polarisierte Epithelzelle multiple biochemische Veränderungen, die es ihr ermöglichen, einen mesenchymalen Phänotyp anzunehmen, der durch erhöhte migratorische Kapazität, Invasivität, gesteigerte Resistenz gegenüber Apoptose und die verstärkte Produktion extrazellulärer Matrixkomponenten charakterisiert ist. Mithilfe von molekularen Markern versucht man dieser Entwicklung in einem frühen Stadium zu begegnen oder ihr zuvorzukommen. Zu den für die EMT und Metastasierung von Tumorzellen maßgeblich verantwortlichen Transkriptionsfaktoren gehört E2F1. Seine Aktivitäten vermittelt E2F1 über dessen Zielgene und die Interaktion der Genprodukte mit zellulären Signalwegen. Welche Zielgene unter welchen zellulären Bedingungen aktiviert werden, wird durch die Regulation des E2F1-Proteins gesteuert. Diese umfasst die posttranslationale Modifikation zur Modulation der Proteinstabilität beziehungsweise der Protein-Protein- und Protein-DNA-Wechselwirkungen und die Verstärkung, Hemmung oder Determinierung seiner transkriptionellen Aktivität durch Protein-Protein-Interaktionen mit Kofaktoren.

In der vorliegenden Arbeit sollten die zahlreichen Protein-Protein- und Protein-Gen-Interaktionen von E2F1 für die bioinformatische Analyse zu einem umfassenden Interaktionsnetzwerk zusammengefasst werden. Grundlage für die Erstellung des genregulatorischen Netzwerkes war eine umfangreiche Literaturrecherche zu E2F-Transkriptionsfaktoren mit Fokus auf E2F1. Des Weiteren sollten die Signalwege mitbetrachtet werden, in die E2F1 involviert ist. Ziel des Projektes, das Grundlage für zwei parallele Doktorarbeiten darstellt, war es, aus dem E2F1-Netzwerk die Interaktionen zu extrahieren, die für die E2F1-vermittelte EMT verantwortlich sind. Dazu flossen systembiologische Parameter und klinisch-molekulare Daten in die Netzwerkanalyse ein (Doktorarbeit Faiz M. Khan). Identifizierte EMT-relevante Faktoren wurden mittels Perturbations-Analysen sowohl auf Expression als auch Aktivität experimentell validiert. Darüber hinaus sollten anhand von Patientendaten Korrelationsanalysen zwischen der Expression dieser Marker und Überlebensrate von Tumorkranken durchgeführt werden.

In einem weitergehenden Ansatz wurden durch Datenbank-Recherche und anschließende bioinformatische Analysen diejenigen E2F1-Zielgene identifiziert, die signifikanten Einfluss auf die Überlebensprognose von Krebspatienten haben. Des Weiteren wurde anhand der identifizierten Zielgene des E2F1-Transkriptionsfaktors dessen Einfluss auf den ebenfalls EMT-induzierenden TGF $\beta$ -Signalweg und eine mögliche Interaktion beider Signalwege untersucht. Diese Faktoren stellen Angriffspunkte für eine Kombinations-Therapie bei Patienten mit aberranten TGF $\beta$ - und E2F1-Signalwegen dar.

## II. Material und Methoden

### II.1. Material

#### II.1.1. Geräte

Art	Apparatur	Gerätetyp	Hersteller
Zellkultur	<b>Hera Cell 240</b>	CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heraeus (Osterode)
	<b>Hera Safe</b>	Zellkulturwerkbank	Heraeus (Osterode)
	<b>S@felow 1.2</b>	Zellkultur-Werkbank	Nunc (Wiesbaden)
	<b>Axiovert 25 und 40</b>	Mikroskop	Carl Zeiss (Göttingen)
	<b>MicroCam 3.3</b>	Digitalkamera	dhs (Greifenstein- Beilstein)
	<b>Multifuge 3L-R</b>	Zentrifuge	Heraeus (Osterode)
	<b>Centrifuge 5415C</b>	Zentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
	<b>Centrifuge 5415R</b>	Tischzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
	<b>Centrifuge 5417R</b>	Zentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
DNA-/RNA-Aufreinigung, Klonierung	<b>Bakterieninkubator</b>	Inkubator	Kendro (Langenselbold)
	<b>GFL-3033</b>	Schüttelinkubator	GFL (Burgwedel)
	<b>UV-Dokumentation</b>	UV-Dokumentations- gerät	ITF Labortechnik (Wasserburg)
	<b>UV solo TS Imaging</b>	UV-Transilluminator	Biometra (Göttingen)
	<b>UV- Cleaner UV/CTAR</b>	UV-Transilluminator	Vilber Lourmat (Eberhardzell)
	<b>Mastercycler gradient</b>	Thermozykler	Eppendorf (Hamburg)
	<b>MyCycler</b>	Thermozykler	Bio-Rad (München)
	<b>NanoDrop ND1000</b>	Spektralphotometer	PEQLAB (Erlangen)
	<b>Pico 17 Centrifuge</b>	Tischzentrifuge	Heraeus (Osterode)
	<b>Thermo mixer 5436</b>	Thermomixer	Eppendorf (Hamburg)
	<b>Thermo mixer comfort</b>	Thermomixer	Eppendorf (Hamburg)



Proteinarbeitungs- techniken	<b>Mini-PROTEAN 3</b>	System für vertikale Gelelektrophorese	Bio-Rad (München)
	<b>Trans-Blot SD</b>	Blot-Kammer	Bio-Rad (München)
	<b>Celloshaker</b>	Schüttler	Renner (Darmstadt)
	<b>ChemiDoc™Touch Imaging System</b>	Lumineszenz Detektionsystem	Bio-Rad (München)
Sonstiges Equipment	<b>Lumat LB9507</b>	Luminometer	Berthold Technologies (Bad Wildbad)
	<b>BL210S</b>	Feinwaage	Sartorius (Haverhill)
	<b>Vortex GENIE® 2</b>	Schüttler	Scientific Industries (New York)
	<b>BioPhotometer</b>	Fotometer	Eppendorf (Hamburg)

### II.1.2. Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien sind von folgenden Firmen bezogen worden: Amersham Biosciences (Freiburg), BD-Bioscience (Heidelberg), Bio-Rad (München), Cell Signaling (Frankfurt), Eppendorf (Hamburg), Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland), Gibco (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), PAA (Pasching, Österreich), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (München), Restriktionsenzyme und DNA-modifizierende Enzyme von New England Biolabs (Frankfurt), Invitrogen (Karlsruhe) und Promega (Mannheim).

### II.1.3. Kits

Bezeichnung	Hersteller
NucleoSpin® RNAII	Macherey-Nagel (Düren)
Plasmid DNA Purification Kit (Nucleo-Bond)	Macherey-Nagel (Düren)
PerfectPrep® Gel Cleanup	Eppendorf (Hamburg)
First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
TurboFect™ Transfection Reagent	Fermentas (St. Leon-Rot)
ECL Plus Western Blotting Detection System	Amersham Biosciences (Freiburg)
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Pierce (Bonn)

### II.1.4. Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung
pcDNA3.1	Expressionsplasmid mit CMV-Promotor (Invitrogen, Karlsruhe)
pcDNA3.1-E2F1	Plasmid zur Expression von humanem E2F1

### II.1.5. Adenovirale Vektoren

Bezeichnung	Beschreibung
pShuttle	adenoviraler Expressionsvektor
Ad.GFP	adenoviraler Vektor für die GFP-Expression als Transduktionskontrolle
Ad.ER-E2F1	adenoviraler Vektor für die Expression von ER-E2F1
Ad.sh-E2F1	adenoviraler Vektor für die Expression einer shRNA gegen E2F1
Ad.sh-GFP	adenoviraler Vektor für die Expression einer shRNA gegen GFP

### II.1.6. Lentivirale Vektoren

Bezeichnung	Beschreibung
pWPXL	lentiviraler Expressionsvektor (Invitrogen)
pMD2.G	Hilfs-Plasmid zur Herstellung von lentiviralen Vektoren; enthält das Gen für das Vesikular Stomatitis Virus (VSV)-G Hüllprotein („envelope“) (Addgene)
psPAX2	Hilfs-Plasmid zur Herstellung von lentiviralen Vektoren; enthält Gene für die <i>HIV-1 Gag, Pol, Tat, Rev Proteine</i> (Addgene)
pLKO.1	Plasmid kodiert eine small hairpin (sh)RNA für die Herstellung von lentiviralen Vektoren
pWPXL-sh.ktrl	retroviraler Expressionsvektor zur Expression einer scrambled shRNA gegen kein humanes Zielgen (Mission shRNA, Sigma)
pWPXL-sh.E2F1	retroviraler Expressionsvektor zur Expression einer shRNA gegen E2F1 (TRCN0000000250) (Mission shRNA, Sigma)
pWPXL-sh.FN1	retroviraler Expressionsvektor zur Expression einer shRNA gegen FN1 (TRCN0000286357) (Mission shRNA, Sigma)
pWPXL-sh.NFκB	retroviraler Expressionsvektor zur Expression einer shRNA gegen NFκB (p65) (TRCN0000006517) (Mission shRNA, Sigma)
pWPXL-sh.SMAD3	retroviraler Expressionsvektor zur Expression einer shRNA gegen SMAD3 (TRCN0000330055) (Mission shRNA, Sigma)
pWPXL-sh.SRC	retroviraler Expressionsvektor zur Expression einer shRNA gegen SRC (TRCN0000038149) (Mission shRNA, Sigma)

## II.1.7. Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Medium
<b>HT1197<sup>(a)</sup></b>	Humane Blasenkarzinom-Zelllinie von ATCC®	(A)
<b>J82<sup>(a)</sup></b>	Humane Blasenkarzinom-Zelllinie von ATCC®	(B)
<b>RT-4<sup>(a)</sup></b>	Humane Blasenkarzinom-Zelllinie von ATCC®	(A)
<b>SW1710<sup>(a)</sup></b>	Humane Blasenkarzinom-Zelllinie von ATCC®	(B)
<b>T24<sup>(a)</sup></b>	Humane Blasenkarzinom-Zelllinie von ATCC®	(B)
<b>UM-UC3<sup>(a)</sup></b>	Humane Blasenkarzinom-Zelllinie von ATCC®	(B)
<b>VM-CUB1<sup>(a)</sup></b>	Humane Blasenkarzinom-Zelllinie von ATCC®	(A)
<b>MCF-7<sup>(b)</sup></b>	Humane Mammakarzinom-Zelllinie von ATCC®	(B)
<b>T47D<sup>(b)</sup></b>	Humane Mammakarzinom-Zelllinie von ATCC®	(A)
<b>BT549<sup>(b)</sup></b>	Humane Mammakarzinom-Zelllinie von ATCC®	(B)
<b>MDA-MB231<sup>(b)</sup></b>	Humane Mammakarzinom-Zelllinie von ATCC®	(B)
<b>UM-UC3-LV-sh.ktrl</b>	Humane Blasenkarzinom-Zelllinie mit stabiler Expression der scrambled shRNA als Kontrolle	(C)
<b>UM-UC3-LV-sh.NFκB</b>	Humane Blasenkarzinom-Zelllinie mit stabiler Expression der shRNA (TRCN0000006517) gegen NFκB (p65)	(C)
<b>UM-UC3-LV-sh.SMAD3</b>	Humane Blasenkarzinom-Zelllinie mit stabiler Expression der shRNA (TRCN0000330055) gegen SMAD3	(C)
<b>UM-UC3-LV-sh.NFκB-sh.SMAD3</b>	Humane Blasenkarzinom-Zelllinie mit stabiler Expression der shRNAs gegen NFκB (p65) und SMAD3	(C)
<b>MDA-MB231-LV-sh.ktrl</b>	Humane Mammakarzinom-Zelllinie mit stabiler Expression der scrambled shRNA als Kontrolle	(C)
<b>MDA-MB231-LV-sh.FN1</b>	Humane Mammakarzinom-Zelllinie mit stabiler Expression der shRNA (TRCN0000286357) gegen FN1	(C)
<b>MDA-MB231-LV-sh.SRC</b>	Humane Mammakarzinom-Zelllinie mit stabiler Expression der shRNA (TRCN0000038149) gegen SRC	(C)
<b>MDA-MB231-LV-sh.FN1-sh.SRC</b>	Humane Blasenkarzinom-Zelllinie mit stabiler Expression der shRNAs gegen FN1 und SRC	(C)

**(a)** Zelllinien mit freundlicher Unterstützung erhalten von Frau Prof. Dr. S. Füssel, Urologisches Labor des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus, Dresden.

**(b)** Zelllinien mit freundlicher Unterstützung erhalten von der Abteilung für Frauenheilkunde, Universitätsmedizin Rostock.

**Verwendete Kulturmedien (Details siehe II.2.4.a Kultivierung von Zellen):**

**(A)** RPMI + 10% FBS, Aminosäuren, Pyruvat, Penicillin/Streptomycin/Amphotericin

**(B)** DMEM + 10% FBS, Aminosäuren, Pyruvat, Penicillin/Streptomycin/Amphotericin

**(C)** wie (B) + 2 µM Puromycin

## II.1.8. Antikörper

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
<b>β-Actin</b>	mk AK (Maus) gegen humanes β-Aktin	(1)
<b>E2F1</b> (KH-95)	pk AK (Ziege) gegen humanes E2F1	(2)
<b>EGFR</b>	pk AK (Kaninchen) gegen den humanen EGFR	(2)
<b>NF-κB p65</b> (C22B4)	mk AK (Kaninchen) gegen humanes NFκB (p65)	(3)
<b>FGFR1</b> (Flg C15)	mk AK (Kaninchen) gegen den humanen FGFR1	(2)
<b>TGFβR1</b> (V22)	mk AK (Maus) gegen den humanen TGFβR1	(2)
<b>TGFβR2</b> (L21)	pk AK (Ziege) gegen den humanen TGFβR2	(2)
<b>Vimentin</b> (V9)	pk AK (Ziege) gegen humanes Vimentin	(2)
<b>ZEB1</b> (H-102)	pk AK (Kaninchen) gegen humanes ZEB1	(2)
<b>SNAI1</b> (H-130)	mk AK (Maus) gegen humanes SNAI1	(2)
<b>c-SRC</b> (B12)	mk AK (Maus) gegen humanes c-SCR	(2)
<b>Fibronectin</b>	mk AK (Maus) gegen humanes Fibronectin	(4)
<b>E-Cadherin</b> (24E10)	mk AK (Kaninchen) gegen humanes E-Cadherin	(3)
<b>N-Cadherin</b> (610921)	mk AK (Maus) gegen humanes N-Cadherin	(4)
<b>SMAD2/3</b> (FL-425)	pk AK (Kaninchen) gegen humanes SMAD2 und -3	(2)
<b>anti-goat IgG-HRP</b>	konjugiert an Horseradish Peroxidase (HRP)	(2)
<b>anti-mouse IgG-HRP</b>	konjugiert an Horseradish Peroxidase (HRP)	(3)
<b>anti-rabbit IgG-HRP</b>	konjugiert an Horseradish Peroxidase (HRP)	(3)

mk AK – monoklonaler Antikörper, pk AK – polyklonaler Antikörper

Sigma-Aldrich (München) (1), Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg) (2), Cell Signaling (Frankfurt) (3), BD Bioscience (Heidelberg) (4),

### II.1.9. Oligonukleotide

Bezeichnung	Forward-Sequenz 5' - 3'	Reverse-Sequenz 5' - 3'
<b>EGFR</b>	AACTGTGAGGTGGTCCTTGG	GGAATTCGCTCCACTGTGTT
<b>FGFR1</b>	ACCACCGACAAAGAGATGGA	GCCCCTGTGCAATAGATGAT
<b>TGFβR1</b>	TTGCTCCAAACCACAGAGTG	TGAATTCCACCAATGGAACA
<b>TGFβR2</b>	CTGGTGCTCTGGGAAATGAC	CAGAAGCTGGGAATTTCTGG
<b>E-Cadherin</b>	GCTTTGACGCCGAGAGCTACA	TCCCAGGCGTAGACCAAGAAA
<b>Vimentin</b>	CTCCCTGAACCTGAGGGAAAC	TTGCGCTCCTGAAAACTGC
<b>GAPDH</b>	CACCACCCTGTTGCTGTA	CACAGTCCATGCCATCAC

### II.1.10. Online-Datenbanken und Software

Zweck	Name	Link	Referenz
<b>A</b>	ArrayExpress	<a href="https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/">https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/</a>	(Kolesnikov, Hastings, et al., 2015)
<b>A</b>	TCGA	<a href="http://cancergenome.nih.gov/">http://cancergenome.nih.gov/</a> <a href="https://xenabrowser.net;">https://xenabrowser.net;</a>	-/-
<b>A</b>	CCLE	<a href="http://www.broadinstitute.org/ccle">http://www.broadinstitute.org/ccle</a>	-/-
<b>B</b>	ChIP-Atlas	<a href="http://chip-atlas.org">http://chip-atlas.org</a>	(Oki, Ohta, et al., 2018)
<b>B</b>	GTRD	<a href="http://gtrd.biouml.org/">http://gtrd.biouml.org/</a>	(Yevshin, Sharipov, et al., 2017)
<b>C</b>	IntAct	<a href="https://www.ebi.ac.uk/intact/">https://www.ebi.ac.uk/intact/</a>	(Kerrien, Aranda, et al., 2012)
<b>C</b>	HPRD	<a href="http://www.hprd.org/">http://www.hprd.org/</a>	(Keshava Prasad, Goel, et al., 2009)

<b>C</b>	String 9.1	<a href="https://string-db.org/">https://string-db.org/</a>	(Franceschini, Szklarczyk, et al., 2013)
<b>C</b>	TRANSFAC	<a href="http://genexplain.com/transfac/">http://genexplain.com/transfac/</a>	(Wingender, Chen, et al., 2000)
<b>C</b>	iHop	<a href="https://bio.tools/ihop">https://bio.tools/ihop</a>	(Hoffmann & Valencia, 2004)
<b>C</b>	PSICQUIC	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/webse rvices/psicquic/view/main.xhtml">http://www.ebi.ac.uk/Tools/webse rvices/psicquic/view/main.xhtml</a>	(Aranda, Blankenburg, et al., 2011)
<b>D</b>	miRTarBase	<a href="http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw /php/index.php">http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw /php/index.php</a>	(Hsu, Lin, et al., 2011)
<b>D</b>	TransmiR	<a href="http://www.cuilab.cn/transmir">http://www.cuilab.cn/transmir</a>	(J. Wang, Lu, et al., 2010)
<b>E</b>	CellDesigner	<a href="http://www.celldesigner.org/">http://www.celldesigner.org/</a>	-/-
<b>E</b>	Cytoscape	<a href="https://cytoscape.org/">https://cytoscape.org/</a>	-/-
<b>F</b>	Gencode	<a href="https://www.encodegenes.org/hu man/releases.html">https://www.encodegenes.org/hu man/releases.html</a>	(Harrow, Frankish, et al., 2012)
	PWMScan	<a href="https://ccg.epfl.ch/pwmscan/">https://ccg.epfl.ch/pwmscan/</a>	-/-
<b>G</b>	Galaxy	<a href="https://usegalaxy.org/">https://usegalaxy.org/</a>	(Afgan, Baker, et al., 2018)
<b>H</b>	GEO2R	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo /geo2r/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo /geo2r/</a>	-/-
<b>I</b>	bioDBnet	<a href="https://biodbnet-abcc.ncifcrf.gov/">https://biodbnet-abcc.ncifcrf.gov/</a>	(Mudunuri, Che, et al., 2009)
<b>I</b>	BioMart	<a href="http://www.ensembl.org/biomart/">http://www.ensembl.org/biomart/</a>	-/-
<b>J</b>	TRRUST	<a href="https://www.grnpedia.org/trrust/d ownloadnetwork.php">https://www.grnpedia.org/trrust/d ownloadnetwork.php</a>	(Han, Cho, et al., 2018)
<b>J</b>	TRANSFAC	<a href="http://gene-regulation.com/pub/databases.ht ml#transfac">http://gene-regulation.com/pub/databases.ht ml#transfac</a>	(Wingender, Dietze, et al., 1996)
<b>K</b>	R-Studio (Version 3.4.3)	<a href="https://rstudio.com">https://rstudio.com</a>	-/-
<b>L</b>	Reactome	<a href="https://reactome.org/">https://reactome.org/</a>	(Joshi-Tope, Gillespie, et al., 2004)
<b>L</b>	AmiGO	<a href="http://amigo-exp.geneontology.io/amigo">http://amigo-exp.geneontology.io/amigo</a>	-/-

<b>L</b>	KEGG	<a href="https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?pathway+hsa04350">https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?pathway+hsa04350</a>	-/-
<b>L</b>	dbEMT (Version 1)	<a href="http://dbemt.bioinfo-minzhao.org/download.cgi">http://dbemt.bioinfo-minzhao.org/download.cgi</a>	(M. Zhao, Kong, et al., 2015)
<b>L</b>	GSEA	<a href="http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/annotate.jsp">http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/annotate.jsp</a>	-/-
<b>M</b>	Venn-Diagramme	<a href="http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/">http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/</a>	-/-
<b>N</b>	ImageJ	<a href="http://rsbweb.nih.gov/ij">http://rsbweb.nih.gov/ij</a>	-/-

**(A)** Akquise von Transkriptomdaten, **(B)** Akquise von ChIP-seq-Daten, **(C)** Akquise von Protein-Protein- und Protein-Gen-Interaktionen, **(D)** Akquise von miRNA-mRNA-Interaktionen, **(E)** Darstellung der Interaktionsnetzwerke, **(F)** Akquise der annotierten humanen Gene, **(G)** Softwares zum Bearbeiten von Daten über genomische Positionen (ChIP-seq-Peak-Daten von *GTRD*, *GENCODE*-Daten der bekannten humanen Gene), **(H)** Analyse der differentiellen Genexpression von *GEO*-Transkriptomdaten, **(I)** Softwares zur Konvertierung von Array-IDs, Gen-Namen und Gen-IDs, **(J)** Akquise der bekannten Zielgene von E2F1, SMAD2, -3 und -4, **(K)** Programmierungsumgebung *R-Studio* für Datenverarbeitung und Berechnungen, **(L)** Akquise TGFβ- und EMT-assoziierter Signalwegfaktoren und GO-Begriffe, **(M)** Erstellung von Venn-Diagrammen, **(N)** Bildbearbeitungssoftware zum Auswerten der Invasivitäts-Assays



## II.2. Methoden

### II.2.1. RNA-Arbeitstechniken

#### II.2.1.a RNA-Extraktion aus Zelllysaten

Die Gesamt-RNA aus Zellen wurde mit Hilfe des Nucleospin Kit (Macherey-Nagel, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers isoliert. Dafür wurden die geernteten Zellen unter Zuhilfenahme von chaotropem Puffer und reduzierenden Agenzien (Mercaptoethanol) alkalisch lysiert, das Lysat durch eine Silica-Säule gefiltert und anschließend in 70%-igem Ethanol aufgenommen. Das Nukleinsäure-Gemisch wurde auf eine weitere Silica-Säule appliziert, um die restlichen Proteine, Lipide, Salze und Zelldetritus herauszuwaschen, bevor die DNA durch DNase verdaut wurde. Nach weiteren Waschschritten wurde die aufgereinigte, entsalzte RNA abschließend mit 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bei -80°C gelagert. Die Konzentration und Reinheit des RNA-Gemisches wurde spektroskopisch mithilfe eines Photometers (NanoDrop ND1000) bestimmt.

#### II.2.1.b Reverse Transkription

1 µg des isolierten RNA-Gemisches wurde mithilfe des First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) durch reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Durch Einsatz von Oligo(dT)-Primern (18 bp) wird ausschließlich mRNA transkribiert. Während die Reverse Transkriptase (RT) aus dem Moloney-Murine Leukämie Virus (M-MuLV) die RNA in cDNA transkribiert, baut sie erstere gleichzeitig durch ihre 3'-5'-Exoribonukleaseaktivität ab. Um den Abbau der RNA durch RNasen zu unterbinden, wurde Ribolock RNase-Inhibitor hinzugegeben.

Die Reaktion wurde wie folgt angesetzt:

5x RT-Puffer	4,0 µl
dNTP mix (10 mM pro dNTP)	2,0 µl
Oligo(dT) <sub>18</sub> Primer (2,5 µM)	1,0 µl
Ribolock RNase-Inhibitor	0,5 µl
M-MuLV Reverse Transkriptase	0,5 µl
RNA-Gemisch	1,0 µg
ddH <sub>2</sub> O	add 20,0 µl

Der Ansatz wurde im Thermocycler für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Transkriptase durch fünfminütige Inkubation bei 95°C inaktiviert. Die cDNA wurde anschließend in der PCR verwendet, um sequenzspezifische Bereiche von Transkripten zu amplifizieren.

#### II.2.1.c Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Absorption der Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm wurde im Photometer (Nanodrop ND1000) gemessen. Dabei entspricht eine Absorption von 1 einem DNA- beziehungsweise RNA-Gehalt von 50 µg/ml beziehungsweise 40 µg/ml. Da Proteine ein Absorptionsmaximum bei 280 nm besitzen, gibt das Verhältnis der Absorptionen  $A_{260}/A_{280}$  Aufschluss über die Reinheit der Nukleinsäure-Proben. Liegt das Verhältnis über 1,8, entspricht dies einer optimalen Reinheit.

### II.2.2. DNA-Arbeitstechniken

#### II.2.2.a Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Um Expressionsunterschiede bekannter Gene zwischen verschiedenen experimentellen Ansätzen sichtbar zu machen, werden in der PCR etwa 200 bp lange Transkript-spezifische Bereiche amplifiziert. Während die Amplifikation der in der Probe vorhandenen Transkripte zu in der Gelelektrophorese visuell detektierbaren Transkriptmengen führt, potenziert sie gleichzeitig die Signal-Differenz zwischen den Proben nach der Formel: Transkriptmenge T nach n PCR-Zyklen  $T(n) = 2^{n-2}$ . Zur Amplifizierung wurde der peqGOLD Hot Start-Mix (Peqlab) verwendet, der außer den spezifischen Primern und der Template-DNA alle nötigen Komponenten (Polymerase, dNTPs, Reaktionspuffer) enthält.

Ein repräsentativer PCR-Ansatz ist im Folgenden dargestellt:

2x peqGOLD Hot Start-Mix	10,0 µl
forward Primer (10 µM)	0,5 µl
reverse Primer (10 µM)	0,5 µl
cDNA (0,5 - 1µg)	1,0 µl
ddH <sub>2</sub> O	8,0 µl
Gesamt	20,0 µl

Die Reaktionen der PCR im Thermocycler setzen sich aus folgenden Schritten zusammen:

<b>1</b>	95°C	Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge	1 min
<b>2c</b>	95°C	Aufschmelzen der amplifizierten DNA-Fragmente	20 s
<b>3c</b>	( $T_m - 3$ )°C	Annealing: Bindung der Primer bei etwa 3 K unter der Primer-spezifischen Schmelztemperatur ( $T_m^*$ )	20 s
<b>4c</b>	72°C	Elongation beim Temperaturoptimum der eingesetzten Polymerase (hier taq-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i> )	30 s
<b>5</b>	72°C	Zeit, um unvollständig amplifizierte Bereiche zu vervollständigen	5 min
<b>6</b>	8°C	Kühlung für den Zeitraum bis zur weiteren Verwendung der DNA	∞

Die mit „c“ markierten Schritte gehören zum eigentlichen Zyklus, der je nach Transkriptmenge im Ausgangsmaterial 25- bis 40-mal durchlaufen wird.

\*Die  $T_m$  ist die Primer-spezifische Schmelztemperatur, bei der 50% der Primer die spezifische komplementäre DNA-Sequenz im Template binden. Um ein ausgewogenes Maß zwischen effektiver und spezifischer Primerbindung zu gewährleisten, wählt man eine Annealing-Temperatur etwa 2-3 K unterhalb der Schmelztemperatur  $T_m$ .

Bei jeder PCR wurde eine Leerkontrolle mit Wasser mitgeführt, um unspezifische Amplifikate beziehungsweise Verunreinigungen zu identifizieren. Die DNA-Fragmente wurden in der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht.

### II.2.2.b Agarose-Gelelektrophorese

In der Gelelektrophorese werden elektrisch geladene Makromoleküle im elektrischen Feld aufgetrennt, weil die Wanderungsgeschwindigkeit umgekehrt proportional zu ihrer Größe ist. Aufgrund des negativ geladenen Phosphat-Rückgrates der DNA lässt sich diese gut in einem 2%-igen (w/v) Agarosegel auftrennen und durch Zugabe von interkalierendem Ethidiumbromid (0,2 µg/ml) im UV-Bereich sichtbar machen. 50x TAE-Puffer (2 M Tris/Acetat, 150 mM EDTA, pH 8,0) wurde zu 1x TAE-Puffer verdünnt, mit Agarose versetzt, erwärmt und nach Zugabe von Ethidiumbromid im Schlitten auspolymerisieren gelassen. Ein mitgeführter DNA-Längenmarker diente zur Abschätzung der Fragmentgrößen. Die Detektion der aufgetrennten DNA erfolgte mithilfe einer UV-Dokumentationsanlage.

## II.2.3. Protein-Arbeitstechniken

### II.2.3.a Gesamtproteinextraktion aus Zelllysat

Die mit einem Zellschaber abgelösten Zellen wurden in PBS aufgenommen, abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min, 4°C) und anschließend das Pellet in eiskaltem Radio-Immun-Präzipitations-Assay-Puffer (RIPA), versetzt mit 5 µl Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche, Mannheim), 5 µl NaF (50 mM) und 10 µl Natriumorthovanadat (SOV, 1 mM, pH 9.0), resuspendiert und 30 Minuten lang bei 4°C im Drehrad inkubiert. Anschließend wurden die ungelösten Bestandteile bei 4°C und 13.000 rpm für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand mit den gelösten Proteinen wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

Zusammensetzung des RIPA-Puffers:	50 mM Tris/HCl pH 7,2
	150 mM NaCl
	0,1% (w/v) SDS
	1% Na-Desoxycholat
	1% Triton X-100

### II.2.3.b Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Konzentration des isolierten Gesamtproteins wurde mithilfe des Bradford-Assays (Bio-Rad, Deutschland) bestimmt. Dabei bilden die Proteine mit dem Farbstoff Coomassie-Brillantblau Komplexe. Da diese Komplexe ein anderes photometrisches Absorptionsmaximum (595 nm) besitzen als Coomassie allein, ist die Zunahme der Absorption bei 595 nm ein proportionales Maß für die Konzentration. Pro Ansatz wurde 1 µl der Proteinprobe in einem Gemisch aus 700 µl ddH<sub>2</sub>O, 99 µl PBS und 200 µl Bradford-Reagenz 1:1000 verdünnt und gevortext. Die Extinktion wurde nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur und nochmaligem Vortexen im Eppendorf BioPhotometer gemessen. Durch Verwendung einer vorher mit BSA erstellten Eichkurve wurde die Proteinkonzentration errechnet. Die Bestimmung erfolgte im Triplikat.

### II.2.3.c SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mithilfe einer eindimensionalen Natrium-Dodecyl-Sulfat(SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurden die denaturierten Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt. Je höher die Konzentration an Polyacrylamid, umso engermaschiger die Netzstruktur des Geles und umso langsamer wandern besonders große Proteine. Zur Gesamtprotein-Probe (50-100 µg in 21 µl) wurden 3 µl des reduzierenden Agens Dithiothreitol (10x DTT, 1 M) und 6 µl eines 5x nicht reduzierenden Sample Buffers (Pierce Biotechnology, USA) zugesetzt. Daraufhin wurden die Proben für 10 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend in das Gel geladen. Im oberen Teil des Geles befand sich ein 4%-iges Sammelgel zur Aufkonzentrierung der Proben. Hier wurde das Proteingemisch in SDS-haltigem Laufpuffer (25 mM Tris, 25 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS) bei einer Spannung von 70 V relativ größenunabhängig gestaucht, bevor es im 10%-igen Trenngel bei 100–140 V der Größe nach bis zur gewünschten Spreizung aufgetrennt wurde. Das an die Proteine bindende SDS im Laufpuffer bewirkt die zur Elektrophorese nötige stark negative Ladung der sonst heterogen geladenen Proteine.

<u>Sammelgel (4% Acrylamid)</u>		<u>Trenngel (10% Acrylamid)</u>	
ddH <sub>2</sub> O	6,4 ml	ddH <sub>2</sub> O	4,9 ml
0,5 M Tris-HCl-Puffer, pH 6,8	2,5 ml	1,5 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,8	2,5 ml
10% SDS	100 µl	10% SDS	100 µl
Acrylamid (40%)	1,0 ml	Acrylamid (40%)	2,5 ml
TEMED	11 µl	TEMED	6 µl
30% Ammoniumpersulfat	17 µl	30% Ammoniumpersulfat	17 µl

### II.2.3.d Western Blot und Immunodetektion

Für den Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond ECL, Amersham, Freiburg) wurde das Tank-blot-Verfahren mit Hilfe einer Trans-Blot-Kammer (Bio-Rad, München) verwendet. Nach der Äquilibration der Membran in 1x Transferpuffer (194 mM Glycin, 25 mM Tris/HCl, pH

8,3) erfolgte der Transfer der Proteine aus dem Gel bei 100 V und etwa 300-350 mA für ca. 60 Minuten. Anschließend wurde die Membran eine Stunde bei RT in 5%-iger Milch (5% (w/v) Milchkpulver gelöst in TBST: 1x TBS (20 mM Tris, 135 mM NaCl, pH 7,6) mit 0,1% Tween-20) zum Blockieren von unspezifischen Antikörper-Bindestellen auf einem Schüttler inkubiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Nach drei Waschschritten (je 5 min mit TBST) wurde die Membran für eine Stunde mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (in 5%-iger Milch in TBST) bei RT inkubiert. Abschließend wurde sie zweimal je 5 Minuten in TBST und einmal in TBS-Puffer gewaschen. Die Detektion spezifisch markierter Proteine erfolgte mit Hilfe der Chemolumineszenzreaktion der an den Sekundärantikörper gebundenen HRP, die mit dem ECL Plus Western Blotting Detection Kit (Amersham Biosciences, Freiburg) oder SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific) entsprechend den Angaben des Herstellers ausgeführt wurde. Die Chemolumineszenz wurde anfangs mit einem Chemolumineszenzfilm (Amersham Biosciences) detektiert und im Curix 60 (AGFA Health Care, Deutschland) entwickelt. Später erfolgte die Dokumentation mit dem ChemiDoc™ Touch Imaging System und die Auswertung und Aufarbeitung der Bilder mit der Image Lab Software (Version 5.0) von Bio-Rad.

## II.2.4. Zellbiologische Arbeitstechniken

### II.2.4.a Kultivierung von Zellen

Alle Zelllinien wurden bei 37°C in 5%-iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Das Kulturmedium (DMEM beziehungsweise RPMI, siehe II.1.7 Zelllinien) enthielt 4,5 g/l Glukose, 2 mM L-Glutamin und wurde mit 10% hitzeinaktiviertem fötalen Rinderserum (FBS), 1x MEM nicht-essentiellen Aminosäuren, 100 U/ml Penicillin, 100 µl/ml Streptomycin und 1,25 µg/ml Amphotericin B ergänzt (alle Zusätze: PAA, Pasching, Österreich). Passagiert wurden die Zellen, indem sie mit PBS gewaschen, trypsinisiert (Trypsin/EDTA, PAA, Pasching, Österreich), anschließend wieder in reichlich Medium aufgenommen und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt wurden. Die entsprechende Zellzahl wurde abschließend ausgesät.

### II.2.4.b Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden nach dem Trypsinieren 10 µl Zellsuspension auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Die Anzahl der Zellen in allen vier Feldern der Zählkammer wurde bestimmt, gemittelt und mit folgender Formel die Zellkonzentration berechnet:  $10^4 \cdot \text{mittlere Zellzahl} = \text{Anzahl Zellen pro ml}$ .

#### II.2.4.c Liganden- und Inhibitorbehandlung

Die Zelllinien RT-4 und MCF-7 wurden 48 Stunden vor dem Experiment mit den Liganden EGF, FGF2 und TGFβ (10 ng/ml; R&D Systems) behandelt. Die Zelllinien UM-UC-3 und MDA-MB231 wurden 24 Stunden vor dem Experiment mit den Inhibitoren für EGFR (Tyrophostin AG 1478), FGFR1 (PD161570) beziehungsweise TGFβR1/2 (SB431542, alle von Santa Cruz) behandelt (200 nM bis 3 µM).

#### II.2.4.d Transiente Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA

Für die Transfektion von humanen Zelllinien 70%-iger Konfluenz mit Plasmid-DNA wurde das Herstellerprotokoll von TurboFect™ (Fermentas) befolgt. Die Plasmid-DNA lagert sich während der 30-minütigen Inkubation bei RT an die kationischen Polymere des Transfektions-Agens. Dadurch wird die starke negative Ladung der DNA neutralisiert, diese lagert sich an die Zellmembran und wird von der Zelle aufgenommen.

#### II.2.4.e Herstellung stabiler Zelllinien mittels lentiviraler Transduktion

Zur Herstellung von Zelllinien mit stabiler Expression eines Transgenes wurden  $0,5-1 \times 10^5$  Zellen ausgezählt und in 200 µl antibiotikafreiem Medium aufgenommen. Anschließend wurden sie mit 5 ml Virusüberstand vermengt, ausplattiert und für 20 Minuten inkubiert. Der Virusüberstand (*high titer*) stammte von den die Viruspartikel produzierenden HEK-293T Wirtszellen. Diese wurden zuvor kotransfiziert (Kalziumphosphat-Methode) mit Plasmiden für die essentiellen Virusgene (VSV-pseudotypisiertes Oberflächenprotein im pMD2.G, Reverse Transkriptase und Integrase im psPAX2, beide von Addgene) und zusätzlich einem Lentivirus-spezifischen Plasmid mit dem Verpackungssignal und dem Transgen (*Mission shRNA*-Plasmide, Sigma). Abschließend wurde Nährmedium hinzugegeben und die Zellen für 72 Stunden inkubiert. Die Selektion der transgenen Zellen erfolgte durch puromycinhaltiges Nährmedium (2 µg/ml). Der Einfluss der Transduktion auf das Zielgen wurde nach Proteinaufreinigung im Western Blot beziehungsweise nach RNA-Isolation mittels PCR überprüft.

#### II.2.4.f Adenovirale Arbeitstechniken

##### **Anreicherung des Adenovirus**

Zur Herstellung adenoviraler Partikel wurde das rekombinierte Plasmid in die humane 293-Zelllinie (TurboFect™, Fermentas) transfiziert. Diese Zelllinie produziert das E1 Protein, welches zur Expression der späten adenoviralen Gene und damit für die virale Replikation benötigt wird. Nach 8 bis 10 Tagen setzt aufgrund des zytopathischen Effektes der Virusproduktion ein Abrunden der Zellen ein. Die Zellen wurden dann abgespült, zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, 4°C) und in 500 µl Medium resuspendiert. Die Isolierung des Virus aus den Zellen erfolgte durch Aufbrechen der Zellen in drei *freeze-thaw*-Zyklen: Einfrieren in flüssigem Stickstoff (1 min, -196°C) und Auftauen im Wasserbad bei 37°C. Anschließend wurde das Medium für 15 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert und der Überstand für die Infektion zuvor ausgesäter 293-Zellen benutzt. Dieser Vorgang wurde nach 6 bis 8 Tagen mit neuen Zellen wiederholt, bis für die Herstellung sogenannter *high titer* eine ausreichend große Menge an Viruspartikeln vorhanden war, um acht Zellkulturschalen von 15 cm Durchmesser zu infizieren. Durch den hohen Virustiter setzte bereits nach 2 bis 3 Tagen die Abrundung Zellen ein und sie wurden geerntet. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 1200 rpm wurde das Pellet in 2 ml PBS, versetzt mit 10% Glycerin (v/v), resuspendiert und zur Freisetzung der viralen Partikel wie zuvor beschrieben aufgebrochen. Nach erneuter Zentrifugation bei 4000 rpm für 15 Minuten wurde der Überstand als *high titer* für *in vitro*-Experimente bei -80°C gelagert.

##### **Adenovirale Transduktion von Zellen**

Für die Transduktion einer definierten Anzahl zuvor ausgesäter Zellen wurde der gewünschten MOI entsprechend viel *high titer* Adenovirus in 1 ml Nährmedium aufgenommen und anschließend auf die Zellen getropft. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde der Ansatz mit dem entsprechenden Volumen an Nährmedium aufgefüllt. RT-4- und MCF-7-Zellen wurden mit dem Ad.ER-E2F1-/Ad.GFP-Vektor in einer MOI von 5 transduziert, UM-UC-3- und MDA-MB231-Zellen mit dem Ad.sh.E2F1-/Ad.sh.ktrl-/Ad.GFP-Vektor in einer MOI von 10. Der Ad.GFP-Vektor diente 24 bis 36 Stunden nach der Transduktion als Kontrolle, indem unter dem Fluoreszenzmikroskop der Anteil transduzierter (grün fluoreszierender) Zellen



abgeschätzt wurde. 24 Stunden nach Transduktion mit dem Ad.ER-E2F1-Vektor wurde das Fusionsprotein aus murinem Östrogenrezeptor und humanem E2F1 (ER-E2F1) mit dem Liganden 4-Hydroxy-Tamoxifen (4-OHT, 0,02  $\mu$ M; Sigma) aktiviert (kerngängig gemacht) beziehungsweise als Kontrolle mit 70% Ethanol behandelt.

#### II.2.4.g Invasivitäts-Assay (Boyden-Chamber)

Zur Analyse des invasiven Potentials von Tumorzellen wurden Invasivitäts-Assays durchgeführt, in denen die Zellen entlang eines FBS-Gradienten durch ein die extrazelluläre Matrix imitierendes Matrigel (MG, 3,1 mg/ml Protein, Corning Matrigel Membranz, Thermo Fisher Scientific) und die poröse Membran der Zellkultur-Einsätze (Porengröße: 8,0  $\mu$ m) wandern können. Hierfür wurden Tumorzellen trypsinisiert, ausgezählt und in 1-3%-igem FBS Medium auf das MG in 6-Well Zellkultur-Einsätzen ausgesät und die Einsätze in 6-Well Zellkulturplatten eingehängt, die mit 30%-igem FBS-Medium befüllt wurden. Sind die Zellen in der Lage, das MG verdauend sich dem FBS-Gradienten entgegen gerichtet zur porösen Membran zu bewegen, sich anschließend durch die engen Poren zu bewegen um sich auf der anderen Seite der Membran abzusiedeln, können sie dort wie folgt detektiert werden: 24 bis 36 Stunden nach dem Aussäen der Zellen wird das MG mit den nicht migrierten Zellen entfernt und die migrierten Zellen durch DAPI (in PBS) angefärbt. Durch Auszählen der angefärbten Zellen auf repräsentativen Fluoreszenzaufnahmen mithilfe der Software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij>) wurde die Anzahl invasiver Zellen relativ zur Kontrolle bestimmt.

#### II.2.5. Konstruktion und Analyse des E2F1-Interaktionsnetzwerkes

Durch intensive Literaturrecherche zum Transkriptionsfaktor E2F1 und seiner Familie und zu weiteren tumorrelevanten Signalwegen wurde ein Protein-Protein-/Protein-Gen-Interaktionsnetzwerk erstellt, das aus 879 Knoten (Proteine, Proteinkomplexe, Gene und miRNAs) und 2278 Interaktionen zwischen diesen besteht. Über 500 Publikationen zu E2F1 und weitere etwa 300 über andere Signalwege wurden berücksichtigt. Zusätzlich wurden mithilfe von Datenbanken (*HPRD*, *String 9.1*, *IntAct*, *iHop*, *PSICQUIC*, *miRTarBase*, *TransmiR*, *TRANSFAC*) weitere Interaktionen identifiziert, durch entsprechende Literatur überprüft und hinzugefügt, um die Dichte der Interaktionen und regulierenden Motive

(FBL, FFL), besonders um E2F1 herum, zu erhöhen (Franceschini, Szklarczyk, et al., 2013; Aranda, Blankenburg, et al., 2011; Hsu, Lin, et al., 2011; J. Wang, Lu, et al., 2010; Keshava Prasad, Goel, et al., 2009; Hoffmann & Valencia, 2004; Wingender, Chen, et al., 2000). Schließlich wurden sämtliche in der *TRANSFAC*-Datenbank gelisteten, experimentell verifizierten Interaktionen von allen im Netzwerk vorhandenen Transkriptionsfaktoren zu Zielstrukturen im Netzwerk hinzugefügt. Sämtliche Faktoren und Interaktionen wurden mit der Software *CellDesigner* (Version 4.4) visualisiert.

## II.2.6. Akquisition von Daten aus bioinformatischen Datenbanken

### II.2.6.a ChIP-seq-Daten-Akquise

Die ChIP-seq-Datenbank *GTRD* erfasst Rohdaten aus öffentlich zugänglichen ChIP-seq-Experimenten und reanalysiert diese durch Alignment der sequenzierten Reads mittels *Bowtie2*. Die identifizierten ChIP-seq-Peaks werden daraufhin in Clustern und Metaclustern zusammengefasst, um nicht-redundante TFBS-Daten zu erstellen.

In der *GTRD*-Datenbank wurden folgende Parameter verwendet: Gene Transcription Regulation Database; Advanced search; Binding sites near the specified gene; Organism: Human (*Homo sapiens*); Gene symbol or ID: Any; Transcription factor: E2F1/SMAD2/SMAD3/SMAD4; Data set: meta clusters; Maximal gene distance: 5000 bp; Output type: Download file.

Die Daten vom *ChIP-Atlas* wurden unter Nutzung folgender Parameter heruntergeladen: Target Genes; 1. Choose Antigen: E2F1/SMAD2/SMAD3/SMAD4; 2. Choose Distance from TSS: 5k; download TSV. Der ChIP-Atlas greift unter anderem auf die *STRING*-Datenbank zurück. Er enthält Zielgene, die trotz des Fehlens von ChIP-seq-Bindestellen einen durch die *STRING*-Datenbank belegten hohen Interaktionsscore aufweisen.

#### II.2.6.b *In silico*-Identifizierung von TFBS anhand von Position Weight Matrices

Mithilfe der Software PWMScan auf dem Computational Cancer Genomics-Server wurde das Humangenom (Dez. 2013 GRCh38/hg38) auf potentielle Bindestellen für E2F1 (*JASPAR CORE 2018 vertebrates; E2F1 MA0024.3*) und SMAD2-4 (*SMAD2::SMAD3::SMAD4 MA0513.1; SMAD3 MA0795.1; Smad4 MA1153.1*) gescannt. Dabei ist die Bindestelle eines TF als Position Weight Matrix (PWM; MA...) hinterlegt, welche die relative Häufigkeit jeder Base an der jeweiligen Position der TFBS angibt. Im Gegensatz zu Konsensus-Sequenzen, die jede TFBS-Position nur mit der am häufigsten vertretenen Base besetzen, wird so mit einiger Unschärfe der biologischen Variabilität von TFBS Rechnung getragen. Als cut-off wurde ein p-value von  $10^{-5}$  (SMAD2-4) und  $10^{-4}$  (E2F1) verwendet. Für alle sonstigen Parameter wurden die defaults benutzt.

#### II.2.6.c Akquise der bekannten humanen Gene

Die bekannten humanen Gene und Transkripte wurden in Form einer gff3-Datei von der gencodegenes.org-Seite (Harrow, Frankish, et al., 2012) (GENCODE release 29, 10.2018) auf den Galaxy Server geladen. Hier wurden mithilfe der Funktion *Extract features* alle annotierten Gene extrahiert und diese Liste anschließend zum Vergleich mit anderen bed-Dateien ebenfalls ins bed-Format konvertiert. Das bed-Format wurde zur Repräsentation genomischer Intervalle wie Genpositionen (Chromosom, Start, Stop) eingeführt.

#### II.2.6.d Zuordnung der ChIP-seq-Peaks und PWM-BS zu bekannten humanen Genen

Die Liste der ChIP-seq-Peaks und die der PWM-BS wurden auf den Galaxy-Server geladen und mit Hilfe der Funktion *bedtools ClosestBed* wurden jedem ChIP-seq-Peak beziehungsweise jeder PWM-BS die upstream am nächsten gelegenen humanen Gene zugeordnet.

#### II.2.6.e Akquisition bekannter Zielgene von E2F1 und SMAD2-4 und von Transkriptomdaten zur Identifizierung E2F1- und SMAD2-4-regulierter Gene

Von den Datenbanken *TRRUST* und *TRANSFAC* wurden die bekannten, verifizierten Zielgene von E2F1 (n = 134), SMAD2 (n = 5), SMAD3 (n = 31) und SMAD4 (n = 26) heruntergeladen. Die Zielgene von SMAD2-4 wurden zu einer Liste (n = 42) zusammengefasst. Die E2F1-Zielgene beider Datenbanken wurden mit denen aus der E2F1-Map (n = 181) vereint. Die Zielgene der *TRRUST*- und *TRANSFAC*-Datenbanken sowie der E2F1-Map sind verifiziert und durch Pubmed-IDs belegt.

Um E2F1- und TGFβ-regulierte Gene zu identifizieren, wurde in der *ArrayExpress*-Datenbank nach E2F1- beziehungsweise TGFβ-abhängigen Transkriptomdaten recherchiert. Verwendet wurden folgende GEO-Transkriptomdaten von Krebszelllinien:

- GSE39136: Transkriptomdaten 30 Stunden nach ER-E2F1-Transduktion und sechs Stunden nach ER-E2F1-Aktivierung mit 4-OHT in der Osteosarkom-Zelllinie U2OS (Affymetrix Human Genome U133A 2.0 Array; GSM956673-76 versus GSM956679-82),
- Transkriptomdaten 48 Stunden nach ER-E2F1-Transduktion und 24 Stunden nach ER-E2F1-Aktivierung mit 4-OHT in der Blasenkrebszelllinie T24 (internes Affymetrix Human Transcriptome Array HTA 2.0),
- GSE45945: Transkriptomdaten 24 Stunden nach Stimulierung der Zelllinie HepG2 eines hepatozellulären Karzinoms mit TGFβ (Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array; GSM1120116-18 versus GSM1120131-33),
- GSE17708: Transkriptomdaten 24 Stunden nach Stimulierung der Zelllinie A549 eines Lungenkarzinoms mit TGFβ (Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array; GSM442026-28 versus GSM442046-48).

Die Affymetrix Probeset-IDs der jeweiligen Microarray-Plattformen wurden mithilfe von *bioDBnet*, *BioMart* und von *NCBI* in die jeweiligen Gennamen und Gen-IDs konvertiert. Die signifikant differentiell exprimierten Gene der Experimente wurden mithilfe von *GEO2R* des *NCBI*-Servers ermittelt. Diese stellen potentielle Zielgene von E2F1 beziehungsweise TGFβ/SMAD2-4 dar. Filterkriterien waren die Expressionsänderung (Fold Change,  $|FC| > \sqrt{2}$ ) und der p-value der False Discovery Rate ( $FDR < 0,05$ ).

#### II.2.6.f Expressions-Korrelations-Analyse von Patientendaten in R

Die Transkriptomdaten von Patienten der Blasenkrebs- (BLCA) und Brustkrebskohorte (BRCA) von der *TCGA*-Datenbank wurden in *R-Studio* geladen. Alle Faktoren mit einem Median von „0“ und diejenigen mit einer Varianz nahe „0“ (*nearZeroVar*, *caret*-Package) wurden verworfen. Mit Hilfe des Packages *Hmisc* wurde eine Spearman-Korrelationsanalyse aller in den Patientendaten enthaltenen Transkripte zu E2F1, SMAD2, -3 beziehungsweise -4 durchgeführt. Für SMAD2-4 wurde das Extremum der Korrelationswerte (positiv oder negativ) der SMAD2, -3 und -4 verwendet. Die Packages *survival*, *survminer*, *dplyr*, *survMisc* und *ggplot2* wurden hierfür verwendet.

#### II.2.6.g Identifizierung TGFβ-abhängiger und EMT-relevanter Faktoren durch Gene Ontology-Begriffe und mithilfe von Signalwegdatenbanken

Der Einfluss von E2F1 auf das Wirken von TGFβ kann nicht nur über die direkte Regulation von TGFβ/SMAD2-4-Zielgenen erfolgen, sondern möglicherweise auch über die Regulation von am TGFβ-Signalweg beteiligten Faktoren, wie zum Beispiel TGFβ und die SMADs selbst, oder SMAD-Inhibitoren. Am TGFβ-Signalweg beteiligte Faktoren wurden durch einen Abgleich der zugehörigen Gene Ontology-Begriffe (GO) identifiziert. Da wir uns in erster Linie für das Zusammenspiel beider Faktoren in Bezug auf die EMT interessierten, wurden anschließend EMT-relevante Gene identifiziert, die durch beide Faktoren reguliert werden können.

Von den Datenbanken *Reactome*, *AmiGO* und *KEGG* wurden Listen aller mit TGFβ-assoziierten GO-Begriffe sowie die dazugehörigen Faktoren heruntergeladen und zu einer Liste von TGFβ-abhängigen Faktoren vereint (Tabelle 1).

Von den Datenbanken *AmiGO* (*GO:0001837*), *GSEA* (*Hallmark Epithelial Mesenchymal Transition*) und *dbEMT database* wurden die entsprechenden EMT-assoziierten Faktoren heruntergeladen und zu einer Liste von EMT-relevanten Faktoren vereint.

**Tabelle 1: Liste der verwendeten TGF $\beta$ -assoziierten GO-Begriffe und ihrer Quellen**

GO-ID	GO-Begriff	Quelle
GO:0005024	TGF $\beta$ -activated receptor activity	(A)
GO:0005025	TGF $\beta$ receptor activity, type I	(A)
GO:0005026	TGF $\beta$ receptor activity, type II	(A)
GO:0005114	type II TGF $\beta$ receptor binding	(A)
GO:0005160	TGF $\beta$ receptor binding	(A)
GO:0007179	TGF $\beta$ receptor signaling pathway	(B)
GO:0007181	TGF $\beta$ receptor complex assembly	(B)
GO:0007183	SMAD protein complex assembly	(A)
GO:0010862	positive regulation of pathway-restricted SMAD protein phosphorylation	(A)
GO:0010990	regulation of SMAD protein complex assembly	(A)
GO:0010991	negative regulation of SMAD protein complex assembly	(A)
GO:0017015	regulation of TGF $\beta$ receptor signaling pathway	(B)
GO:0030511	positive regulation of TGF $\beta$ receptor signaling pathway	(B)
GO:0030512	negative regulation of TGF $\beta$ receptor signaling pathway	(B)
GO:0030616	TGF $\beta$ receptor, common-partner cytoplasmic mediator activity	(A)
GO:0032909	regulation of TGF $\beta$ 2 production	(A)
GO:0032912	negative regulation of TGF $\beta$ 2 production	(A)
GO:0032915	positive regulation of TGF $\beta$ 2 production	(A)
GO:0034713	type I TGF $\beta$ receptor binding	(A)
GO:0034714	type III TGF $\beta$ receptor binding	(A)
GO:0035583	sequestering of TGF $\beta$ in extracellular matrix	(B)
GO:0038009	regulation of signal transduction by receptor internalization	(A)
GO:0046332	SMAD binding	(A)
GO:0050431	TGF $\beta$ binding	(A)
GO:0060389	pathway-restricted SMAD protein phosphorylation	(A)
GO:0060391	positive regulation of SMAD protein signal transduction	(A)
GO:0060393	regulation of pathway-restricted SMAD protein phosphorylation	(A)

GO:0060394	negative regulation of pathway-restricted SMAD protein phosphorylation	(A)
GO:0070123	TGF $\beta$ receptor activity, type III	(A)
GO:0070410	co-SMAD binding	(A)
GO:0070411	I-SMAD binding	(A)
GO:0070412	R-SMAD binding	(A)
GO:0071141	SMAD protein complex	(A)
GO:0071144	heteromeric SMAD protein complex	(A)
GO:0071559	response to TGF $\beta$	(B)
GO:0071560	cellular response to TGF $\beta$ stimulus	(B)
GO:0090010	TGF $\beta$ receptor signaling pathway involved in primitive streak formation	(B)
GO:1903845	negative regulation of cellular response to TGF $\beta$ stimulus	(B)
GO:1905313	TGF $\beta$ receptor signaling pathway involved in heart development	(B)
hsa04350	TGF $\beta$ signaling pathway	(C)

Quellen: (A) *Reactome*, (B) *AmiGO*, (C) *KEGG*

#### II.2.6.h Cox-Regressionsanalyse in *R*

Die Transkriptomdaten von Krebspatienten (BLCA, BRCA) wurden von der *TCGA*-Datenbank heruntergeladen, die Überlebensdaten extrahiert und mithilfe der Programmiersprache *R* in *R-Studio* mit den Expressionsdaten kombiniert. Mithilfe von *R* wurde eine Cox-Regressionsanalyse über alle Transkripte durchgeführt, die eine Abschätzung ihres Einflusses auf das Überleben der Patienten darstellt. Der Cox-Koeffizient  $k$  der betrachteten Faktoren gibt den Einfluss auf das Sterberisiko von Patienten relativ zum Basalrisiko an. Ein Faktor mit  $k < 0$  senkt das Sterberisiko, einer mit  $k > 0$  erhöht dieses. Die Programm-Pakete *survival*, *survminer*, *dplyr*, *survMisc* und *ggplot2* wurden hierfür verwendet.

## II.2.6.i Zusammenfassende Analyse der Daten mithilfe der multi-objektiven Optimierungsfunktion ‚Desirability Function‘

Mithilfe des *desiR*-Packages in **R** wurden die zuvor genannten, den einzelnen Genen zugeordneten Parameter in multi-objektiven Funktionen zusammengefasst und analysiert. Die individuellen Ausprägungen der einzelnen Parameter wurden dabei gewichtet und ihnen wurde ein cut-off zugewiesen. Den Parametern selbst wurde eine relative Gewichtung untereinander zugeordnet, um den Einfluss des einen oder des anderen auf den Funktionswert hervorzuheben. Der *desiR*-Algorithmus berechnet ein gewichtetes Produkt aus den gewichteten und mit cut-offs versehenen Ausprägungen der Parameter und gibt eine Rangliste derjenigen Gene aus, die alle Filter passieren. Dabei wurden fehlende Einträge für Parameter durch neutrale Werte ersetzt (Tabelle 2). Des Weiteren wurden folgende cut-offs und Substitutionen definiert:

Tabelle 2:

Parameter	Erlaubte Werte	Fehlende Werte
ChIP-seq-BS:	0 / 1	na → 0
ChIP-seq-BS-Distanz (d):	$d \in [-2000; +200]$ bp um die TSS	na → 1000.000,1
logFC (fc):	$fc \leq -0,5 / fc \geq 0,5$	na → 0
FDR (logFC):	$p < 0,05$	na → 1
Expressions-Korrelation (c):	$c \leq -0,2 / c \geq 0,2$	na → 0
p-value (Korrelation):	$p < 0,001$	na → 1
Cox-Koeffizient (k):	$k \leq -0,2 / k \geq 0,2$	na → 0
p-value (Cox):	$p < 0,05$	na → 1

Als Beispiel sei der Parameter PWM-BS genannt, der durch zwei Charakteristika definiert wird: den Abstand zur TSS und den PWM-Score, ein Maß für die Güte der Bindestelle. Ein steigender Abstand der PWM-BS zur TSS soll sich negativ auf den Rang des Genes auswirken und einen cut-off bei  $d = -2001$  bp beziehungsweise  $d = +201$  bp haben. Der Score  $s_{PWM}$  der PWM-BS soll sich positiv auf den Rang auswirken und einen cut-off bei  $s_{PWM} = 999$  haben. Insgesamt soll der Score doppelt so viel Einfluss haben wie die Distanz. Man definiert nun *i*) eine Funktion, deren Funktionswert mit steigendem Abstand der PWM-BS von der TSS sinkt und bei  $d < -2000$  bp beziehungsweise  $d > +200$  bp den Wert



Null annimmt, *ii*) eine Funktion, deren Wert mit abnehmendem PWM-Score sinkt und bei  $s_{\text{PWM}} < 1000$  den Wert Null annimmt, und *iii*) weist bei der Berechnung des Produktes beider Funktionswerte dem PWM-Score ein Gewicht von 1, der PWM-Distanz eines von 0,5 zu. Alle betrachteten Charakteristika müssen Funktionswerte  $> 0$  annehmen, damit das jeweilige Gen die Filter passiert und gelistet wird.

## III. Ergebnisse

### III.1. Das E2F1-Interaktom

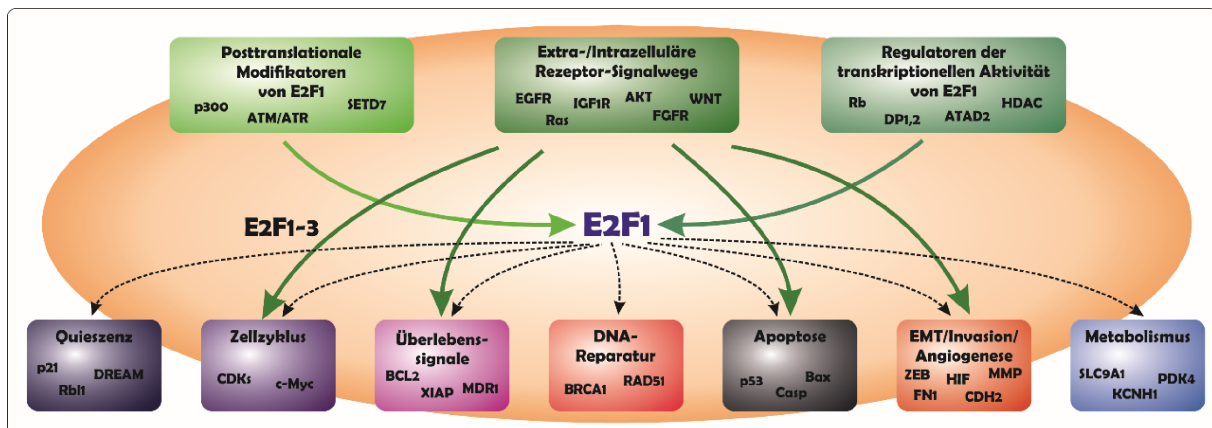
Die E2F-Familie von Transkriptionsfaktoren ist in ein komplexes Netzwerk aus Protein-Protein- und Protein-Gen-Interaktionen eingebunden und ist dadurch Teil vieler zellulärer Prozesse. Das gilt wie bereits beschrieben vor allem für den am besten charakterisierten Vertreter der Familie, E2F1. Die Aktivität von E2F1 wird reguliert durch eine Vielzahl von Faktoren. Die einen aktivieren beziehungsweise reprimieren den E2F1-Promotor, die anderen binden an das Protein und beeinflussen dessen Aktivität und durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Acetylierung, Sumoylierung oder Ubiquitinierung die Bindung von Kofaktoren. Der E2F1-Repressor Rb zum Beispiel konkurriert mit Transkriptions-Initiationsfaktoren (TFIIH, TBP) um C-terminale Bindedomänen von E2F1. Zudem stellt die positive Autoregulation von E2F1 einen Schalter dar, der die Akkumulation von E2F1 während des G1/S-Übergangs gewährleistet. Dem kontextabhängigen Modell von Trimarchi (Jeffrey M. Trimarchi & Lees, 2002) beziehungsweise La Thangue (La Thangue, 2003) nach, definiert in gesunden Zellen das Proteinlevel von E2F1 seine Funktion: pro-apoptotisch oder anti-apoptotisch/pro-survival. Demnach führen hohe E2F1-Level in der Zelle, wie sie nach Induktion durch DNA-Schäden auftreten, zur Induktion der Apoptose. Vergleichsweise geringe Level induzieren den G1/S-Übergang. Die Zielgen-Spezifität von E2F1 wird vermutlich durch die Interaktion mit zahlreichen Kofaktoren beeinflusst (Freedman, Chang, et al., 2009). Weil die E2F1-Aktivität in ein hoch komplexes regulatorisches Netzwerk eingebunden ist, ist deren Feinabstimmung von großer Bedeutung für die Integration der Zelle in den Gesamtorganismus.

#### III.1.1. Modellierung des E2F1-Interaktions-Netzwerkes zur E2F1-Map

Um ein Modell der komplexen Interaktionen um E2F1 zu gewinnen, die die Feinabstimmung der E2F1-Aktivität steuern, wurde durch Literaturrecherche ein Protein-Protein-/Protein-Gen-Interaktionsnetzwerk erstellt. Dieses Netzwerk basiert auf der Recherche von über 500 Publikationen (Stand März 2016) zur E2F-Familie und deren Interaktionen mit Proteinen, Genen und miRNAs. Die zusammengetragenen Interaktionen

stellen enzymatische Reaktionen (Phosphorylierung, Acetylierung, Ubiquitinierung u. a.), Übergänge zwischen molekularen Zuständen (inaktiv/aktiv, unphosphoryliert/phosphoryliert, Gen/Protein), Komplexbildung oder Dissoziation von Proteinkomplexen sowie allgemein positive beziehungsweise negative Einflüsse auf Interaktionen dar. Die Interaktionen sind ungefiltert nach Zelltyp oder Assoziation mit einer Krankheit, um ein möglichst komplettes Bild der Regulationen zu bekommen. Wo eine Interaktion mit anderen Signalwegen bekannt oder ersichtlich war – entweder upstream von E2F1 über Rezeptoren oder downstream über Zielgene von E2F1 – wurden Signalwegkaskaden ins Netzwerk mitaufgenommen (zum Beispiel VEGFR, EGFR, p53, c-Myc). Zusätzlich wurden etwa 300 weitere Publikationen zu Signalwegen hinzugezogen, die nicht direkt mit E2F assoziiert sind, aber wichtige zelluläre Funktionen ausüben. Weitere Protein-Protein- und Protein-Gen-Interaktionen wurden mithilfe von Interaktionsdatenbanken (*IntAct*, *Cognoscente*, *String 9.0*) hinzugefügt, um die Dichte der Interaktionen und damit der regulierenden Loops, besonders um E2F1 herum, zu erhöhen. Diese zusätzlichen Interaktionen wurden durch Literaturrecherche validiert. Schließlich wurden sämtliche in der *TRANSFAC*-Datenbank gelisteten, experimentell verifizierten Interaktionen von allen im Netzwerk vorhandenen Transkriptionsfaktoren zu Zielstrukturen im Netzwerk hinzugefügt. Sämtliche Faktoren und Interaktionen wurden mit der Software *CellDesigner* (Version 4.4) visualisiert.

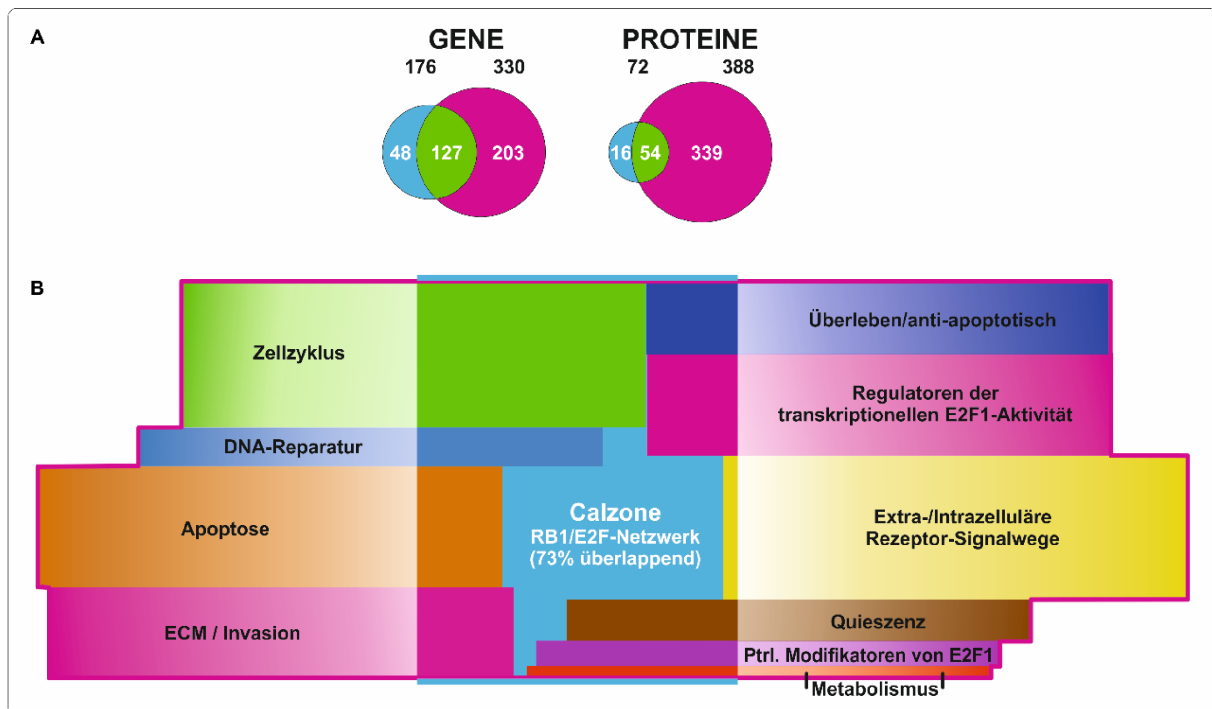
Das Netzwerk enthält 879 Knoten, die Proteine, Proteinkomplexe, Gene beziehungsweise miRNAs darstellen, und 2278 Interaktionen zwischen diesen. MiRNA-Interaktionen aus verifizierten *miRTarBase*-Interaktionen wurden zusätzlich zu dem in *Cytoscape* analysierten Netzwerk eingefügt. Alle Reaktionen und Interaktionen des Netzwerkes sind mit den jeweiligen Literaturreferenzen und gegebenenfalls Kommentaren zum jeweiligen experimentellen oder zellulären Kontext der Publikationen versehen. Alle Faktoren wurden mit ihren offiziellen Gennamen, *HUGO*-, *Entrez*- und *UniProt*-IDs versehen. Die E2F1-Map ist mithilfe von *NaviCell* (Kuperstein, Cohen, et al., 2013) im *CellDesigner*-Format als interaktive und erweiterbare Online-Ressource verfügbar. Abbildung 7 stellt die E2F1-Map schematisch mit ihren verschiedenen Modulen und exemplarischen Vertretern dar.



**Abbildung 6: Schema der E2F1-Map.**

Das modularisierte E2F1-Netzwerk enthält drei Kompartimente, die an der Regulation von E2F1 beteiligte Faktoren beinhalten: (i) Posttranslationale Modifikatoren von E2F1 ( $n = 24$ ); (ii) Extra-/Intrazelluläre Rezeptorsignalwege ( $n = 113$ ); (iii) Regulatoren der transkriptionellen Aktivität von E2F1 ( $n = 66$ ). Des Weiteren wurden sieben funktionale Kompartimente implementiert: (i) Quieszenz ( $n = 29$ ); (ii) Zellzyklus ( $n = 145$ ); (iii) Überlebenssignale (Survival) ( $n = 52$ ); (iv) DNA-Reparatur ( $n = 33$ ); (v) Apoptose ( $n = 89$ ); (vi) EMT/Invasion/Angiogenese ( $n = 69$ ); (vii) Metabolismus ( $n = 11$ ), wobei  $n$  die Anzahl der Faktoren in jedem Kompartiment angibt. Die interaktive E2F1-Map wird unter [https://navicell.curie.fr/pages/maps\\_e2f1.html](https://navicell.curie.fr/pages/maps_e2f1.html) visualisiert.

Vorlage für die im Rahmen dieser Dissertationsarbeit generierte E2F1-Map war das Interaktionsnetzwerk von Calzone et al., das die E2F-Familie im Kontext der Zellzyklusregulation darstellt (Calzone, Gelay, et al., 2008). Ergänzend zu den aus dieser Publikation bekannten Zellzyklus-relevanten Faktoren, die ebenfalls in das hier neu erstellte E2F1-Interaktionsnetzwerk eingeflossen sind, geht die aktuelle E2F1-Map weit über die Rolle der E2Fs im Zellzyklus hinaus und erfasst speziell die ambivalente Funktion (Apoptose vs. Tumorprogression) von E2F1. Die aktuelle Interaktionskarte stellt damit eine wesentliche Erweiterung des Netzwerkes von Calzone et al. dar und ermöglicht erstmalig eine umfassende Übersicht über die aktuell bekannten beziehungsweise bis dato publizierten Zusammenhänge. Ein Vergleich der E2F1-Map mit der von Calzone et al. stellt die Anzahl gemeinsamer und unitärer Gene und Proteine in beiden Netzwerken (Abb. 7A) und deren Zugehörigkeit zu bestimmten zellulären Prozessen dar (Abb. 7B).



**Abbildung 7: Vergleichende Venn-Diagramme der E2F1-Map mit dem Rb/E2F-Netzwerk von Calzone et al.**

**(A)** Anzahl gleicher und unitärer Gene und Proteine zwischen Calzone et al. (blau) und der E2F1-Map (purpur). **(B)** Überlappungen der Kompartimente der E2F1-Map mit der von Calzone et al. (blau markiertes Rechteck in der Mitte). Das Diagramm zeigt, dass 73% der Komponenten des Rb/E2F-Netzwerkes von Calzone et al. in der E2F1-Map enthalten sind. Die E2F1-Map ist 2,8-mal umfangreicher als die von Calzone et al. und berücksichtigt eine Vielzahl zellulärer Prozesse. Alle im E2F1-Netzwerk enthaltenen Faktoren wurden bestimmten Kompartimenten zugeordnet, die nach Art eines Venn-Diagrammes im Verhältnis zur Anzahl ihrer gemeinsamen Faktoren mit dem Netzwerk von Calzone überlappen (Khan, Marquardt, et al., 2017).

Das E2F-Netzwerk wurde zur besseren Übersichtlichkeit in die nachfolgend beschriebenen regulatorischen und funktionellen Module gegliedert. Die regulatorischen Module enthalten Moleküle, die die Funktion und die transkriptionelle Aktivität von E2F1 beeinflussen. Die funktionellen umfassen Faktoren, die mit zellulären Prozessen wie Apoptose, ECM/Invasion etc. assoziiert sind. Dabei wurden die einzelnen Faktoren und Interaktionspartner denjenigen Kompartimenten zugeordnet, zu denen sie laut der jeweiligen Publikation assoziiert sind. Die zellulären Prozesse Transkription und Translation wurden der Übersichtlichkeit halber zu einer einzelnen Reaktion Gen →

Protein zusammengefasst. Effekte auf mRNAs (zum Beispiel deren Inhibierung durch miRNAs) wurden daher als direkte Effekte auf die Genaktivität dargestellt.

Die drei transkriptionell aktivierenden Vertreter der E2F-Familie, E2F1-3, die zudem eine überaus hohe Sequenzhomologie besitzen, üben generell sehr ähnliche Funktionen im Zellzyklus aus, indem sie dieselben Zellzyklusgene aktivieren. Darüber hinaus legen Ergebnisse mit Knockout-Mäusen nahe, dass die drei Faktoren auch unterschiedliche Aktivitäten besitzen. Weil aus der Literatur oft nicht genau hervorging beziehungsweise nicht genauer untersucht wurde, um welchen der drei Faktoren es sich handelt, wurden sie in der vorliegenden Interaktionskarte was ihre Rolle im Zellzyklus betrifft als „E2F1-3“ bezeichnet. War aus der Literatur hingegen ersichtlich, dass es sich speziell um Funktionen von E2F1 handelt, besonders im Kontext von Angiogenese, Apoptose, DNA-Reparatur und EMT, wurde dies eindeutig im Netzwerk dargestellt.

Das Modul **Extra-/intrazelluläre Rezeptor-Signalwege** beinhaltet zahlreiche zelluläre Rezeptoren, deren Liganden und nachgeordnete Signaltransmitter-Moleküle, die extrazelluläre Signale ins Zellinnere leiten und in eine zelluläre Reaktion übersetzen. Besonderes Augenmerk wurde auf die Signalwege gelegt, die bekanntermaßen mit E2F interagieren. Beispiele hierfür sind TP53, FLT4, KDL und HMMR (Meier, Spitschak, et al., 2014; Engelmann, Mayoli-Nüssle, et al., 2013; Massip, Arcondéguy, et al., 2013). Des Weiteren wurden Krebs-relevante Signalwege mitaufgenommen wie der der Erb-b2 Receptor Tyrosine Kinase 2 (ERBB2/Her2), des Estrogen Receptor 1 und 2 (ESR1/2), des Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR), der WNT-Rezeptoren und Integrinen, zahlreichen Wachstumsfaktoren, Apoptose-induzierenden Rezeptoren (zum Beispiel TNF/TRAIL) und Überlebens-Faktoren wie beispielsweise IGF1R, Ras, AKT und ERK. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden für einige Rezeptorfamilien Stellvertreter verwendet (zum Beispiel ‚FGF‘ (Fibroblast Growth Factor) für FGF1-23, ‚FGFR‘ für FGFR1-4, ‚ITGA‘ und ‚ITGB‘ (Integrin) für die verschiedenen alpha- und beta-Integrine). Das für die bioinformatische Analyse in *Cytoscape* konvertierte Netzwerk beinhaltet alle Mitglieder der jeweiligen Proteinfamilien.

Ein hohes E2F1-Protein-Level hat nicht zwangsläufig eine hohe transkriptionelle Aktivität des Transkriptionsfaktors zur Folge, da letztere vom Retinoblastomprotein gehemmt wird. Um die Effekte auf Proteinexpression und Proteinaktivität voneinander zu trennen, wurden zwei separate Module eingeführt: Eines mit Faktoren, die durch posttranslationale Modifikationen die Proteinstabilität von E2F1 und somit dessen Protein-Level beeinflussen, das andere beinhaltet Faktoren, die zum Beispiel durch Histon-Modifikation die Affinität und Selektivität von E2F1 auf die jeweiligen Zielgene regulieren.

**Posttranslationale Modifikatoren von E2F1:** Dieses Modul beinhaltet Faktoren, die nachweislich die Proteinstabilität von E2F1 regulieren. Dazu gehören die Kinasen ATM, ATR, CHEK1 und -2, die nach DNA-Schädigung aktiviert werden, E2F1 phosphorylieren und dadurch stabilisieren können. Auch durch Azetylierung via Azetyltransferasen (EP300, KAT2B/PCAF) und Methylierung über Methyltransferasen (DNMT1 und SETD7) kann sowohl die Protein-Stabilität von E2F1 als auch dessen Affinität zu Zielpromotoren moduliert werden.

**Regulatoren der (Bindungs-)Affinität und Spezifität von E2F1:** In dieses Modul wurden Proteine, die nicht durch kovalente posttranslationale Modifikationen von E2F1, sondern durch direkte Bindung an den Transkriptionsfaktor dessen Aktivität beeinflussen, wie für die Pocket-Proteine und Dimerisierungsfaktoren TPDP1 und -2 gezeigt wurde. Epigenetische Faktoren wie ATAD2 und HDACs beeinflussen die Chromatin-Zugänglichkeit und die Affinität von E2F1 zum Zielgen-Promoter.

Das **Quieszenz-**Modul umfasst Faktoren, die der Zellteilung entgegenwirken. Prominente Vertreter sind die zyklinabhängigen Kinaseinhibitoren (CKI) p21, p14/ARF und Komplexe, die die Transkription in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus kurzfristig (Zellzyklus-Arrest bei Checkpoints) oder in der G0-Phase langfristig hemmen. Das geschieht zusammen mit dem SWI/SNF-Komplex, der den transkriptionell aktivierenden Rb-E2F1-Komplex inhibiert, oder dem DREAM-Komplex (MuvB/LIN-Heteromer) und dem transkriptionell inhibierenden Rb1/2-E2F4/5 Komplex.

**Zellzyklus-Modul:** Dieses Kompartiment beinhaltet Zykline und zyklinabhängige Kinasen (CDKs), die nach externer Stimulation durch Wachstumsfaktoren den Zellzyklus induzieren. Des Weiteren sind c-Myc sowie für die DNA-Synthese relevante Zielgene von „E2F1-3“ enthalten. Auch die Expression und Regulation von „E2F1-3“ durch Rb als

zentraler Zellzyklusregulator sind hier verortet. Da Rb zwei unterschiedlich regulierte Bindedomänen für Proteine der E2F-Familie besitzt, eine speziell für E2F1, eine andere weniger spezifisch für E2F1, -2 oder -3a, ist der Komplex hier zusammen mit TFDP1/2 als Tetramer dargestellt, obwohl er in der Zelle als Trimer vorkommt.

Das **Survival-Modul** beinhaltet Faktoren wie BCL2, BCL2L1 und -2, MDM2, die XIAP-Proteine und die MYB-Familie, welche induzierte pro-apoptotische Signale wie die Dimerisierung von BID und BAX hemmen. Zum anderen enthält es Proteine, welche die Zelle vor Zytostatika oder Chemotherapeutika schützen und der Induktion von DNA-Schäden und pro-apoptotischen Signalen zuvorkommen. Bekannte Vertreter hierfür sind die Multi-Drug-Transporter MDR1/ABCB1, -A5 und -G2.

In das **DNA-Reparatur-Modul** wurden DNA-Schäden erkennende und reparierende Faktoren eingepflegt, wie BRCA1, TOPBP1, DDB1 und -2, RAD51 und GADD45A, die zum Teil von E2F1 transaktiviert werden und bei DNA-Schäden auch in Komplexen mit E2F1 vorliegen.

Das **Apoptose-Modul** umfasst Faktoren, die das zelluläre Apoptoseprogramm aktivieren. Dazu gehören Vertreter der p53-Familie (p53, p63, p73) und Inhibitoren der anti-apoptotisch wirkenden BCL-Familie (BID, BAK1, BAX, BOK) sowie ausführende Caspasen (3, -6, und -9).

Das Kompartiment **EMT/Invasion/Angiogenese** ist eine Ansammlung von Faktoren, die nachgewiesenermaßen zum großen Teil durch E2F1 induziert werden und mit der Aggressivität, Invasivität und der epithelial-mesenchymalen-Transition von Zellen assoziiert sind. Dies sind Faktoren wie ZEB1 (Zinc Finger E-box Binding Homeobox) und -2, SNAI1 (Snail Family Transcriptional Repressor 1) und -2, TWIST1 (Twist Family bHLH Transcription Factor 1) und Zytoskelett-Moleküle wie Vimentin, E-Cadherin (CDH1) und N-Cadherin (CDH2). Des Weiteren beinhaltet es Faktoren, die Teil der extrazellulären Matrix sind beziehungsweise diese modulieren. Zu nennen sind hier vor allem ADAM-/MMP-Metallopeptidasen, L1CAM (L1 Cell Adhesion Molecule), Fibronectin, der Aktinin-beta-Catenin-E-Cadherin-Komplex und angiogene Faktoren wie ANGPT1 und -2, HIF1A (Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha), VHL (von Hippel-Lindau Tumor Suppressor) und EDN1 (Endothelin) und -2.

Im **Metabolismus-Modul** sind „E2F1-3“-Zielgene eingruppiert, die metabolische Funktionen in der Zelle ausüben, wie die Phospho-Fruktokinase PFKFB2, die Methionin-



Adenosyltransferase MAT2A, die Carboxylesterase CES1, die Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase PDK4, die Zyklooxygenase PTGS2. Hier wurden auch Faktoren berücksichtigt, die sich funktionell keinem der anderen Kompartimente zuordnen lassen. Dazu gehören Ionenkanäle, Stofftransporter (KCNH1 – Potassium Voltage-gated Channel Subfamily H Member 1, SLC9A1 – Solute Carrier Family 9 Member A1) oder die SSR4 (Signal Sequence Receptor Subunit 4)-Untereinheit eines Translokons durch die Membran des endoplasmatischen Retikulums. Dies ist insofern relevant, da es in jüngster Zeit Hinweise darauf gab, dass E2F1 auch Zielstrukturen im zellulären Metabolom regulieren kann (Giralt, Denechaud, et al., 2018; Denechaud, Fajas, & Giralt, 2017; Lai, Giralt, et al., 2017). Ein weiteres Modul stellt das der **miRNAs** dar, bestehend aus den miRNAs, die experimentell validierte Zielstrukturen (*miRTarBase*) im Netzwerk besitzen. Dieser Teil der E2F1-Map ist aus Gründen der Lesbarkeit des Interaktionsnetzwerkes nicht in *CellDesigner* abgebildet, ist jedoch Teil des zur Analyse benutzten Netzwerkes in *Cytoscape*.

### III.1.2. Systembiologische Analyse der E2F1-Map

Im parallelen Projektteil dieses BMBF-geförderten interdisziplinären Verbundprojektes (Doktorarbeit Faiz M. Khan zum Thema *Analyse von großen Interaktionsnetzwerken*), wurde die erstellte E2F1-Map zuerst anhand verschiedener Netzwerk-Parameter charakterisiert. Diese dienten zusammen mit biologischen Parametern dazu, aus dem Gesamtnetzwerk diejenigen Faktoren und Interaktionen zu extrahieren, die für die Ausbildung eines bestimmten Phänotyps maßgeblich verantwortlich sind. In unserem Fall war dies der epithelial-mesenchymale Übergang (EMT) von wenig E2F1-exprimierenden, gering invasiven zu E2F1-getriebenen, hoch invasiven Zelllinien aus humanen Blasen- und Brusttumoren. Mit dem extrahierten Kernnetzwerk wurden von den Systembiologen (Department of Systems Biology and Bioinformatics, University of Rostock) Boole'sche Simulationen durchgeführt, die die Invasivität der Zellen in Abhängigkeit von der Aktivität einzelner Netzwerkkomponenten darstellt. Dadurch wurden die Komponenten identifiziert, die hauptsächlich für die Invasivität verantwortlich sind und dadurch geeignete Ziele für eine potentielle Therapie darstellen können.

Die der Analyse zugrunde liegenden Netzwerk-Parameter waren der „Node Degree“, der die Anzahl aller mit einem Knoten verbundenen Interaktionspartner beschreibt, und die „Betweenness Centrality“, einem Maß für die Beteiligung und die zentrale Bedeutung eines Knotens für alle realisierbaren Wege durch das Netzwerk. Des Weiteren mussten alle berücksichtigten Knoten Teil eines Feedback-Loops (FBL) aus drei Knoten des Netzwerkes sein. Die in die Analyse eingeflossenen biologischen Parameter waren die Netzwerk-Nähe eines Knotens zu einem Gen, welches mit EMT assoziiert ist (Lamouille, Xu, & Derynck, 2014). Die sogenannte Gen-Priorisierung erfolgt mithilfe eines Random-Walk-Algorithmus, der ein Maß dafür darstellt, wie oft man auf zufälligem Weg von einem Knoten aus auf einen EMT-assoziierten Faktor trifft. Weitere Parameter waren die Zugehörigkeit der Faktoren eines FBL zu Krebs-assoziierten Genen (Disease-Related Genes) und die differenzielle Expression eines Knotens zwischen der wenig invasiven (RT-4 Blasen- und MCF-7 Brustkrebszelllinie) und der E2F1-abhängigen, hoch invasiven Zelllinie (UM-UC-3 beziehungsweise MDA-MB231) aus humanen Blasen- und Brusttumoren (E-MTAB-2706 (Klijn, Durinck, et al., 2015)).

Alle in die Analyse eingeflossenen biologischen und Netzwerk-Parameter wurden über den jeweiligen FBL gemittelt und normiert (Gl. 1). Anschließend wurden die FBL anhand der Summe ihrer Werte (Score) in einer Rangfolge geordnet. Für eine möglichst objektive Analyse haben wir den Anteil der einzelnen Parameter am jeweiligen FBL-Score gewichtet ( $w_i$ ) und insgesamt 13 Szenarien analysiert, in denen die Gewichtung der Parameter unterschiedlich war. Schließlich wurde das Pareto-Set mit den zehn höchsten Rängen aus allen Szenarien ausgewählt und aus deren Kombination das Kernnetzwerk rekonstruiert. Die Pareto-Optimierung wird eingesetzt, wenn eine zu optimierende Zielfunktion durch mehrere Kriterien beeinflusst wird. Ein einfaches Beispiel hierfür ist ein möglichst stabiler, dabei aber möglichst leichter Baukran. Da sich beide Kriterien gegenseitig negativ beeinflussen, kann keines der beiden Kriterien optimiert werden, ohne zu Lasten des anderen zu gehen. Bei der Pareto-Optimierung ist ein Kompromiss aus allen Kriterien gefragt, der die optimierte Zielfunktion beschreibt. Das Pareto-Set besteht aus denjenigen FBL, die nicht durch andere FBL dominiert werden, während es die Zielfunktion optimiert.

Gleichung 1 zeigt die anhand mehrerer Parameter zu optimierende Funktion (multi objective function)  $F(M_{jk})$  für jeden FBL  $M_j$  ( $j = 1, \dots, m$ ) und jedes Szenario  $k$  ( $k = 1, \dots, 13$ ), in der die  $w_{zk}$  ( $z = 1, \dots, 4$ ) die vier Gewichtungen zum jeweiligen Szenario darstellen:

$$F(M_{jk}) = \frac{w_{1k}}{2} \frac{\langle ND \rangle_j}{\max(ND)} + \frac{w_{1k}}{2} \frac{\langle BC \rangle_j}{\max(BC)} + w_{2k} \frac{\langle DP \rangle_j}{\max(DP)} + w_{3k} \frac{\langle GP \rangle_j}{\max(GP)} + w_{4k} \frac{\langle |FC| \rangle_j}{\max(FC)} \quad \text{Gl. 1}$$

Des Weiteren: ND – Node Degree, BC – Betweenness Centrality, DP – Disease Pathway, GP – Gen-Priorisierung, FC – Fold Change (differenzielle Expression). Die FBL mit dem höchsten Score  $F(M_{jk})$  wurden zu einem Kernnetzwerk kombiniert.

Die Kernnetzwerke der Blasen- und Brustkrebs-Zelllinien beinhalten sowohl gleiche als auch tumorspezifische Faktoren. Bestimmte EMT-assoziierte Transkriptionsfaktoren (SNAIL1 und 2, TWIST1, CTNNB1) und bekannte Tumorsuppressorgene wie p53 oder Rb und Onkogene wie c-Myc, EGFR, AKT1, BCL2 und MDM2 kommen in beiden Netzwerken vor. SMAD2-4, einige Untereinheiten der Proteinphosphatase 2 sowie FGFR1 und ein NFκB-FBL sind unitär im Blasenkarzinom-Netzwerk vorhanden. GSK3B (Glycogen Synthase Kinase 3 beta), FLT4, FN1, NCOA3 (Nuclear Receptor Coactivator 3) und ein TNFα (Tumor Necrosis Factor alpha)-FBL treten nur im Brustkrebs-Netzwerk auf.

Den Input stellt ein Vektor mit den perturbierbaren Aktivitäten der Rezeptoren upstream der restlichen Netzwerkfaktoren dar. Der Output wurde als Funktion „EMT“ (EMT = 0, ..., 3; EMT = 0 für epitheliale Zellen, EMT = 3 für hoch invasive mesenchymale Zellen) definiert, deren Wert vom Signalfluss des Input-Vektors durch die Netzwerkkomponenten abhängig ist. Für jede Interaktion des Kernnetzwerkes wurden basierend auf der Literaturrecherche Boole'sche Regeln aufgestellt, die den Signalfluss bestimmen. Anschließend wurde der Einfluss der Aktivität jeder Input-Komponente auf das Kernnetzwerk und die EMT-Funktion in allen denkbaren Kombinationen simuliert (für weitere Details wird auf die Doktorarbeit von Faiz M. Khan „An integrative workflow to study large-scale biochemical networks“ verwiesen).

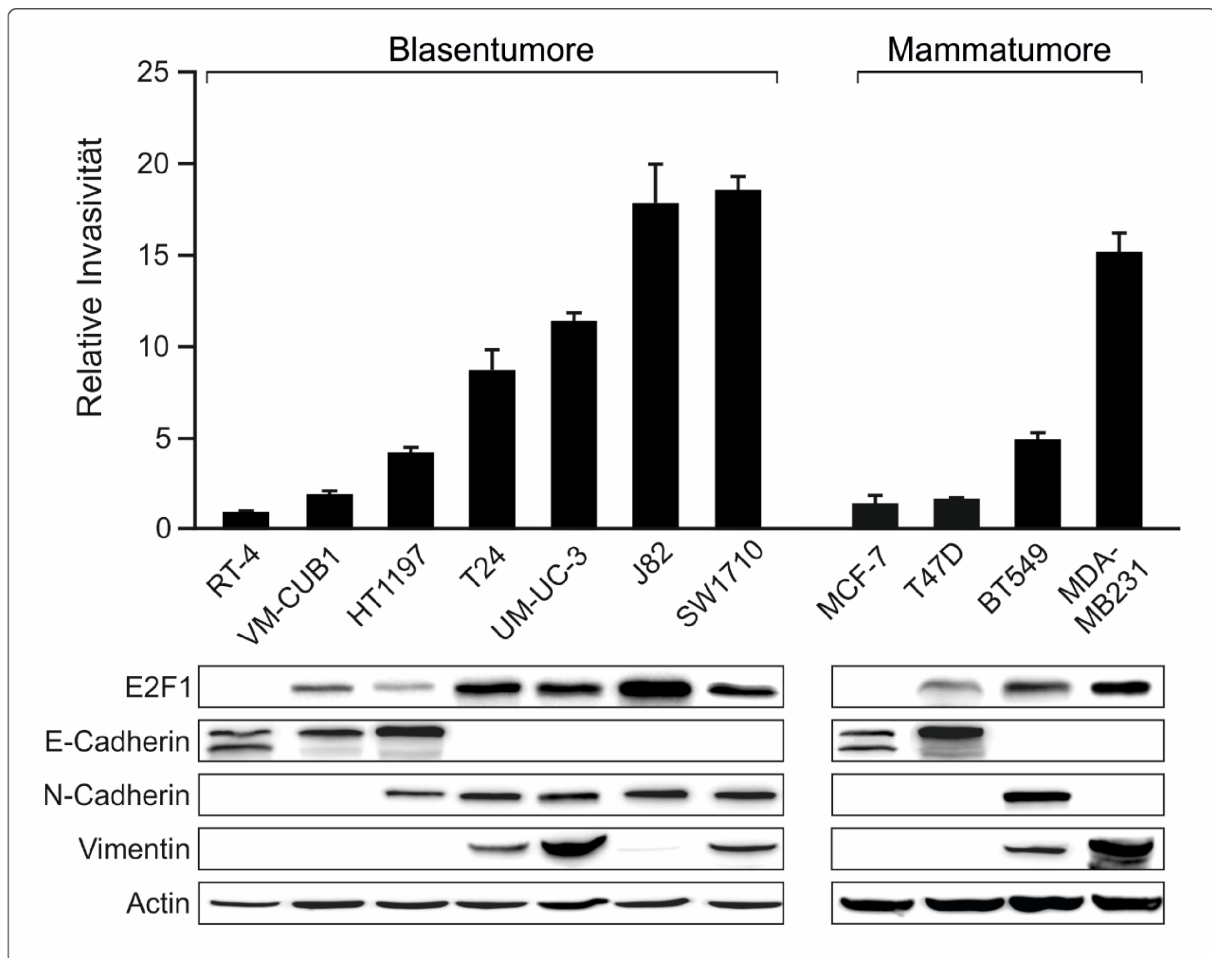
Die Computersimulationen ergaben, dass für die Invasivität im Blasenkrebsmodell sowohl die hohe Aktivität des Transkriptionsfaktors E2F1 als auch die FGFR1- und TGFβ-Signalwege verantwortlich sind. Auch im Brustkrebsmodell sind E2F1 und der TGFβ-Signalweg ausschlaggebend für die Invasivität der Tumorzellen. Im Vergleich zum Blasenkarzinom weisen die hoch aggressiven Brustkrebszellen anstelle des FGFR1-Signalweges eine hohe Aktivität des EGF-Rezeptor-Signalweges auf.

### III.1.3. Validierung der Ergebnisse der *in silico*-Simulationen in Tumorzelllinien

Nach den *in silico*-Vorhersagen sind Zellen mit hoher E2F1-Expression und aktivierten TGFβ- und EGFR-Signalwegen (Beispiel MDA-MB-231-Brustkrebsmodell) beziehungsweise aktivierten TGFβ- und FGFR1-Signalwegen (Beispiel UM-UC-3- Blasenkrebsmodell) hoch aggressiv (EMT-Score = 3). Durch Hemmung/Deaktivierung jedes einzelnen dieser Faktoren wird die Zellinvasivität schrittweise reduziert und bei gleichzeitiger Blockade aller drei Faktoren konvertiert die Zellen *in silico* in nicht-invasive Zellen (EMT-Score = 0). Die Ergebnisse der Computersimulationen wurden anschließend experimentell in verschiedenen Zellkultursystemen überprüft.

#### III.1.3.a Nachweis der Korrelation zwischen der E2F1 Expression und der Invasivität in humanen Brust- und Blasenkarzinomzelllinien

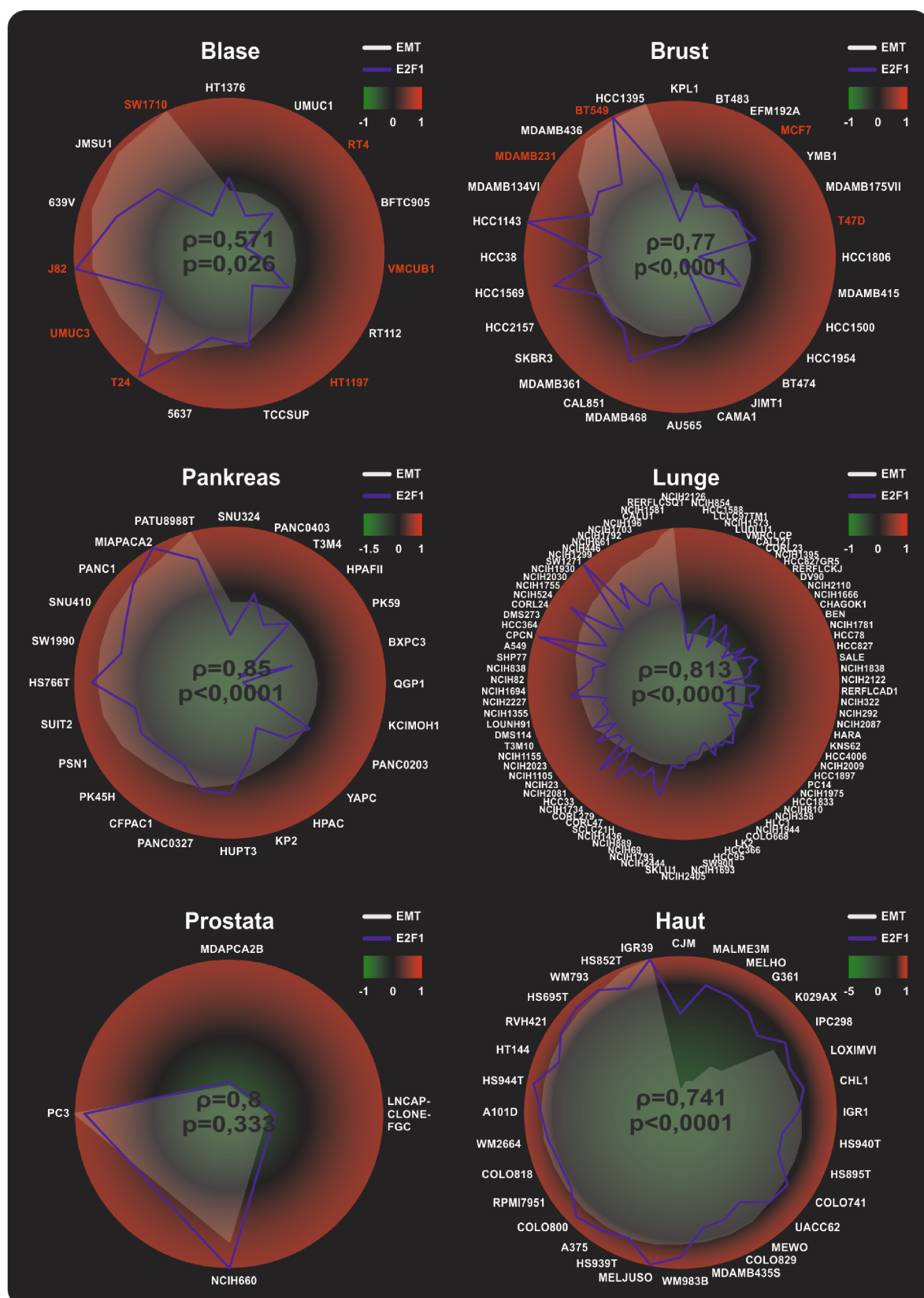
Jüngste klinische Studien weisen darauf hin, dass in hoch malignen Blasen- und Mammatumoren der Transkriptionsfaktor E2F1 stark exprimiert ist (Rennhack & Andrechek, 2015; Vera, Schmitz, et al., 2013; Lee, Leem, et al., 2010; Desmedt, Piette, et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde daraufhin die Expression von E2F1 in einer Reihe von wenig bis hoch aggressiven humanen Blasen- und Brustkrebszelllinien im Western Blot untersucht. Zusätzlich wurde mittels funktioneller Assays überprüft, inwieweit die E2F1-Expression mit dem invasiven Potential der Zellen korreliert. Danach weisen Zelllinien mit hoher Invasivität (Abb. 8, oben) die stärksten E2F1-Proteinbanden auf (Abb. 8, unten). Darüber hinaus korreliert die Expression von EMT-Markern mit der Invasivität beziehungsweise mit der E2F1-Expression der Zelllinien: in den weniger aggressiven Zelllinien RT-4, VM-CUB1, HT1197, MCF-7 und T47D ist der epitheliale Marker E-Cadherin stark und die mesenchymalen Marker N-Cadherin und Vimentin nicht oder höchstens schwach exprimiert. Dieses Verhältnis kehrt sich mit zunehmender Invasivität der aus Blasentumoren etablierten Zelllinien T24, UM-UC-3, J82, SW1710 sowie der Mammakarzinomzellen BT549 und MDA-MB231 um. Bis auf MDA-MB231, die kein N-Cadherin, und J82, die kaum Vimentin exprimieren, zeigt sich in den Zelllinien eine klare Korrelation zwischen ihrer Invasivität und den Expressionen von E2F1 und der EMT-Marker (Abb. 8).



**Abbildung 8: Invasives Potential und Expression von E2F1 und EMT-Markern in humanen Blasen- und Brustkrebs-Zelllinien**

Invasionsassays und Western Blots zeigen das invasive Potential und die Expression von E2F1 und den dargestellten EMT-Markern in einer Reihe von Blasen- und Brustkrebszellen. RT-4 dienten als Referenz. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler der Mittelwerte dar (Khan, Marquardt, et al., 2017).

Zusätzlich zu den vorliegenden Zelllinien wurden die Expressionsdaten von E2F1, E-Cadherin, N-Cadherin und Vimentin einer größeren Anzahl von Zelllinien weiterer hoch aggressiver Tumoren aus der *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE-Datenbank, <http://www.broadinstitute.org/ccle>) für verschiedene Gewebetypen (unter anderen Blase- und Brustkrebs) analysiert. Dabei bestätigte sich die Korrelation zwischen der Expression von E2F1 und dem Verhältnis der mesenchymalen Marker N-Cadherin und Vimentin zum epithelialen Marker E-Cadherin. Dieses Verhältnis wird in Abbildung 9 mit „EMT“ bezeichnet. Ein Ansteigen dieses Quotienten korreliert mit dem Anstieg der E2F1-Expression in den Tumorzelllinien der verschiedenen Gewebetypen (Abb. 9).



**Abbildung 9: Korrelation zwischen der Expression von E2F1 und der EMT-Marker E-Cadherin, N-Cadherin und Vimentin in Tumorzelllinien verschiedener Ursprungsgewebe aus der CCLE-Datenbank.**

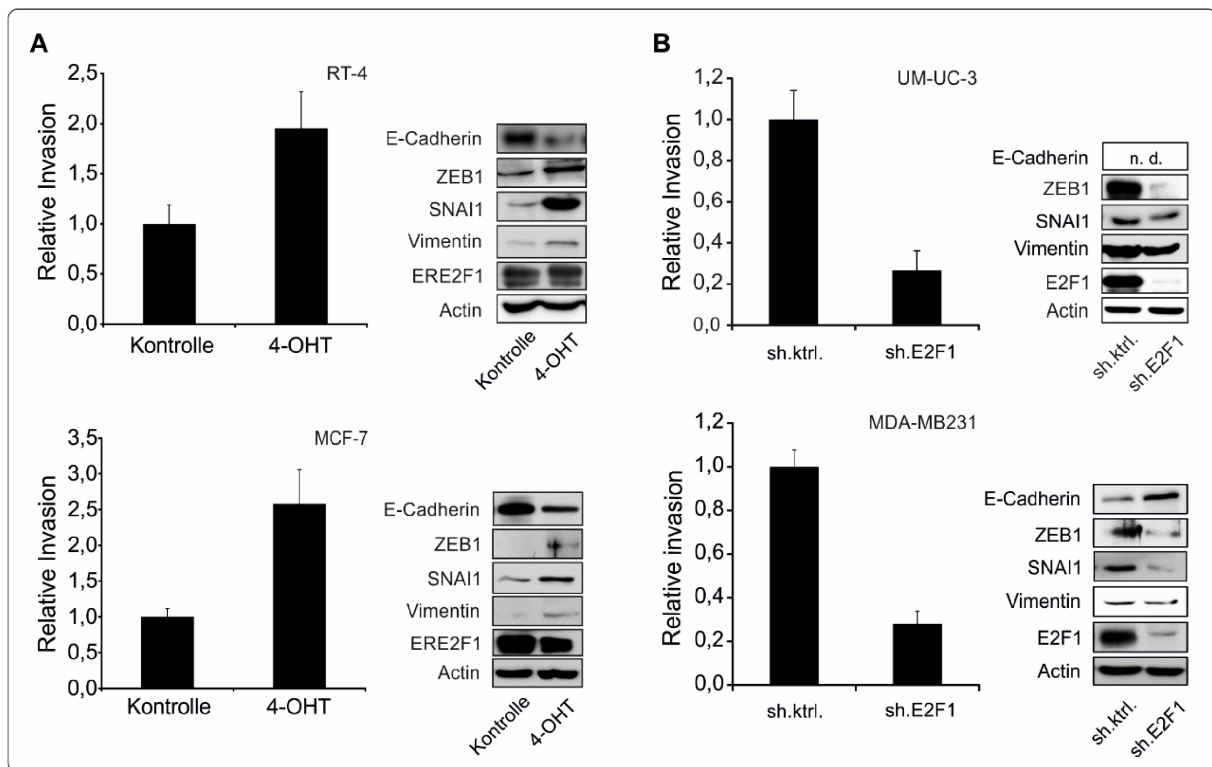
E2F1-Level in Zelllinien von Blasen-, Brust-, Pankreas-, Lungen-, Prostata- und Hauttumoren korrelieren mit dem EMT-Status, definiert als Quotient "EMT" =  $(CDH2+VIM)/(2 \times CDH1)$ ,  $\rho$  - Spearman-Korrelation,  $p$  –  $p$ -value des zweiseitigen t-Tests. Dargestellt sind normalisierte, Median-zentrierte mRNA-Expressionsdaten aus der CCLE-Datenbank. Die rot markierten Zelllinien wurden für die *in vitro*-Experimente der vorliegenden Arbeit verwendet. Abbildung nach (Khan, Marquardt, et al., 2017).

**III.1.3.b Regulierung von EMT-Markern und des invasiven Potentials von humanen Tumorzelllinien durch E2F1**

Wie im vorherigen Kapitel gezeigt, korrelieren die EMT-Marker-Expression von Tumorzelllinien und deren Invasivität mit dem Expressionslevel von E2F1. Im Folgenden wurde untersucht, ob die ektope Expression von E2F1 in wenig aggressiven beziehungsweise der Knockdown in hoch aggressiven Tumorzelllinien einen Einfluss auf deren invasives Potential hat.

Nach adenoviraler (Ad) Überexpression von ER-E2F1, einem Fusionsprotein aus der murinen Östrogenrezeptor-Ligandenbindungsdomäne und humanem E2F1, und 4-OHT-induzierter Aktivierung von E2F1 durch nukleäre Translokation in RT-4 und MCF-7, steigt deren invasives Potential (Anzahl migrierender Zellen) um 100% beziehungsweise 150% an. Dabei korreliert die Invasivität der Zellen nach E2F1-Aktivierung mit der Expression der entsprechenden EMT-Marker. Western Blots der ER-E2F1 überexprimierenden Zelllinien (4-OHT) zeigen, dass die Expression der EMT-Marker mit der Aktivität von E2F1 einhergeht. In beiden Zelllinien kommt es zur Abnahme von E-Cadherin, während die mesenchymalen Marker Vimentin, ZEB1 und SNAI1 hochreguliert werden (Abb. 10A). Derselbe Zusammenhang zwischen der Expression von E2F1, der von EMT-Markern und der Invasivität der Zelllinien zeigt sich nach Inhibition der E2F1-Expression durch einen shE2F1-Ansatz in den invasiven Zelllinien UM-UC-3 und MDA-MB231, in denen die Abnahme von E2F1 zum Anstieg von E-Cadherin (MDA-MB231) und zur Reduktion mesenchymaler Marker führt (Abb. 10B).

Daraus ist zu schlussfolgern, dass E2F1 direkt oder indirekt zahlreiche EMT-Marker reguliert und dadurch Einfluss auf die Invasivität von Zellen ausübt.



**Abbildung 10: Beeinflussung des invasiven Potentials humaner Tumorzelllinien durch Überexpression/Aktivierung versus Knockdown von E2F1.**

Invasivitäts-Assays und Western Blots zeigen die Abhängigkeit der Invasivität und der Expression von EMT-Markern von der E2F1-Expression. **(A)** Die wenig invasiven Zelllinien wurden mit einem ER-E2F1 exprimierenden Ad-Vektor transduziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen in Boyden-Kammern ausplattiert und mit 4-OHT beziehungsweise Ethanol als Kontrolle aktiviert (links) und parallel für den Proteinnachweis im Western Blot geerntet (rechts). **(B)** Hoch invasive Zelllinien wurden mit Ad-sh.E2F1 oder einem sh-Kontroll-Vektor infiziert (sh.ktrl.). Die Invasivität der Zellen wurde nach 72 Stunden mittels Boyden-Chamber Assay bestimmt (links). Immunoblots mit Actin als Ladekontrolle (rechts). Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler der Mittelwerte dar (Khan, Marquardt, et al., 2017).

### III.1.3.c Gewebespezifischer Einfluss von Rezeptor-Signalwegen auf die Invasivität von Krebszelllinien

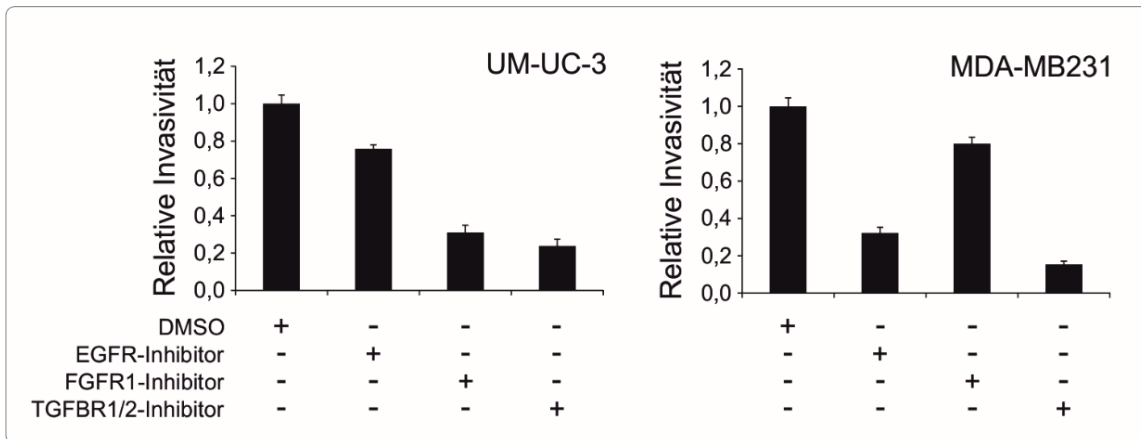
Die Multi-Level-Computer-Simulationen aggressiv wachsender Tumoren stellen modellhaft den Übergang einer wenig invasiven (RT-4 und MCF-7) zu einer hoch invasiven Zelle (UM-UC-3 und MDA-MB231) dar und das jeweilige Kernnetzwerk diejenigen Faktoren, die daran entscheidend beteiligt sind. Im *in silico*-Modell ist die Blasenkrebszelle am invasivsten (EMT = 3, Beispiel UM-UC-3), wenn sowohl der FGFR1- als auch der TGF $\beta$ R1/2-Signalweg aktiv sind und hohe Konzentrationen von E2F1



vorhanden sind. Schaltet man diese drei Faktoren nacheinander aus, reduziert sich der EMT-Status (d. h. die Invasivität) der Zelllinie schrittweise von 3 auf 0, hin zum wenig invasiven Status der Ausgangszelle (Beispiel RT-4). Im Brustkrebssimulationsmodell verhält es sich ähnlich, nur dass hier nicht FGFR1, sondern stattdessen EGFR zusammen mit E2F1 und TGFβR1/2 den höchsten Invasivitätsgrad der Zelle, d. h. den mesenchymalen Status (EMT = 3), bedingen. In diesem Fall führt die simulierte sukzessive Inhibition dieser Faktoren in hoch aggressiven MDA-MB231-Zellen zur schrittweisen Reduktion des EMT-Status auf 0 (Beispiel MCF-7).

Der durch die *in silico*-Analysen vorhergesagte Einfluss von E2F1 auf das invasive Wachstum der Zellen beider Tumormodelle wurde in III.1.3.b experimentell bestätigt. Um nun den simulierten Einfluss der Rezeptor-Signalwege TGFβR1/2 (das Zusammenspiel beider Rezeptoren TGFβR1 und -2 ist für den Signalweg essentiell) und FGFR1 für Blasenkrebs sowie TGFβR1/2 und EGFR für Brustkrebs auf das invasive Potential der Zellen zu bestimmen, wurden chemische Inhibitoren gegen die jeweiligen Rezeptoren eingesetzt (s. Material und Methoden). Hierbei wollten wir wissen, ob *in vitro* auch der jeweils andere Rezeptor-Signalweg – EGFR im Blasenkrebsmodell beziehungsweise FGFR1 im Brustkrebsmodell – Einfluss auf die Invasivität der Zellen hat und die *in silico* Vorhersagen „unvollständig“ sind.

Abbildung 11 zeigt, dass das invasive Potential von beiden aggressiven Zelllinien durch chemische Hemmung der vorhergesagten Oberflächenrezeptoren effektiv reduziert werden kann. Dabei wird die relative Invasivität beider Tumorzelltypen durch Behandlung mit dem TGFβR1/2-Inhibitor um etwa 85% reduziert. Der EGFR-Inhibitor hat bei MDA-MB231 eine Reduktion von ca. 70% zur Folge. Im Vergleich dazu reduziert sich die Anzahl invasiv wachsender Zellen nach Hemmung von EGFR bei UM-UC-3 nur geringfügig (ca. 25%). Ähnlich sieht es für Blasenkrebs aus, wo die Blockade des für diesen Zelltyp als essentiell vorhergesagten FGFR1-Signalweges die Invasivität von UM-UC-3-Zellen um ca. 70% hemmt, während der FGFR1-Inhibitor bei MDA-MB231-Brustkrebszellen ähnlich ineffektiv (ca. 20%) ist wie der EGFR-Inhibitor bei UM-UC-3.

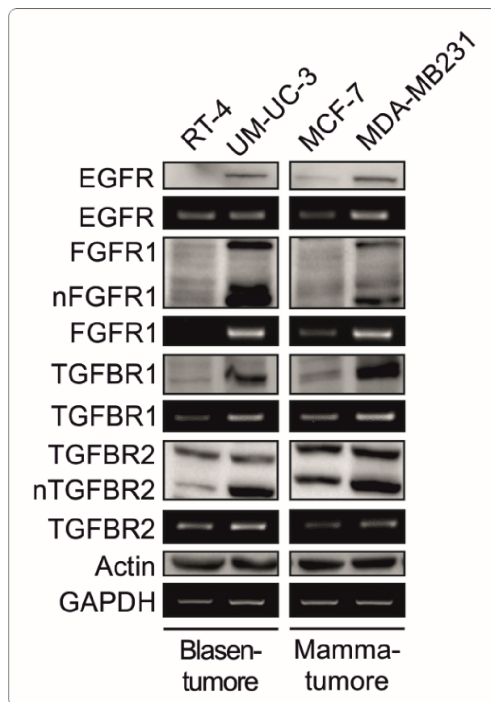


**Abbildung 11: Effekte unterschiedlicher chemischer Rezeptor-Inhibitoren auf die Invasivität von aggressiven Blasen- und Brustkrebszelllinien**

Dargestellt sind die gewebespezifischen Effekte nach Inhibition unterschiedlicher Rezeptorsignalwege auf die Invasivität aggressiver Blasen- und Brustkrebszellen. Der TGF $\beta$ R-Inhibitor supprimiert in beiden Zelllinien effektiv deren Invasivität. Der FGFR1-Inhibitor ist nur effektiv in UM-UC-3, der EGFR-Inhibitor nur in MDA-MB231. Die relative Invasivität wurde auf die Kontrollzellen (mit DMSO behandelt) normalisiert. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler der Mittelwerte dar. Abbildung nach (Khan, Marquardt, et al., 2017).

Diese Ergebnisse zeigen sehr deutlich, dass die für beide Tumorentitäten vorhergesagten Rezeptor-Kombinationen aus dem Kernnetzwerk maßgeblich für den EMT-Status der Zellen verantwortlich sind. Der laut Computersimulation nur für einen der beiden Tumortypen wichtige Rezeptor-Signalweg (FGFR1 beim Blasentumor versus EGFR bei Brustkrebs) hat beim jeweils anderen keinen nennenswerten Einfluss auf dessen Invasivität.

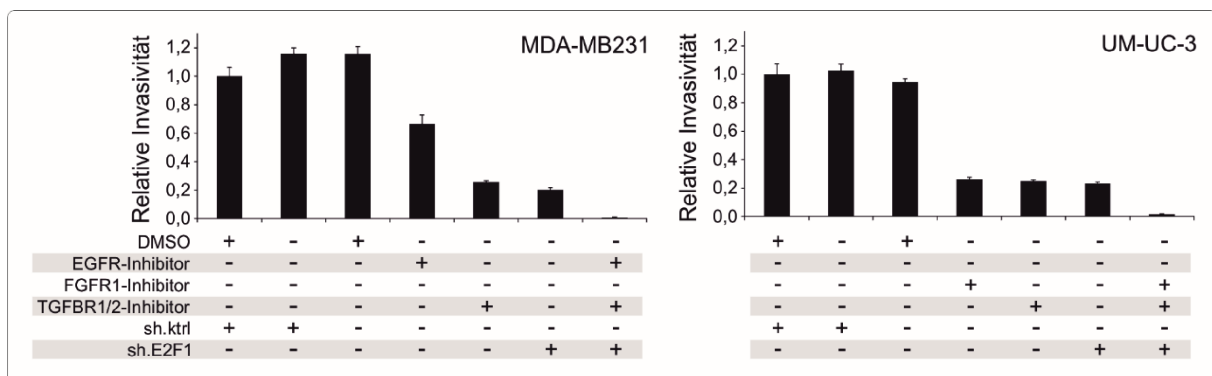
Um zu überprüfen, ob dieser Unterschied zwischen Blasen- und Brustkrebszellen auf eine gewebespezifische Expression der Oberflächenrezeptoren zurückzuführen ist, wurden mRNA und Proteine isoliert und zum Nachweis der Rezeptoren PCR und Western Blot-Analysen durchgeführt. Wie in Abbildung 12 dargestellt, sind in den invasiven Zelllinien beider Tumortypen alle vier Rezeptoren stärker exprimiert als in den wenig invasiven. Trotz dieses Befundes haben die Signalwege in den verschiedenen Geweben unterschiedlichen Einfluss auf das invasive Verhalten der Zelllinien.



**Abbildung 12: Expression der Oberflächenrezeptoren in den verschiedenen Zelllinien.**

Western Blots und PCRs zeigen die Expressionslevel der untersuchten Rezeptoren in den vier Zelllinien. EGFR, FGFR1 und TGF $\beta$ R1 sind verglichen mit den wenig invasiven Zelllinien in den hoch invasiven stark exprimiert. Das Expressionslevel des kompletten TGF $\beta$ R2 ist innerhalb eines Gewebetyps nicht unterschiedlich. Nur die nukleäre Fraktion (nTGF $\beta$ R2) wird in beiden aggressiven Zelllinien verstärkt exprimiert (Khan, Marquardt, et al., 2017).

Anschließend wurde in den aggressiven Vertretern beider Tumortypen die chemische Hemmung der Rezeptoren mit dem Knockdown von E2F1 kombiniert und die relative Invasivität der Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen (siehe Abb. 13) untersucht.

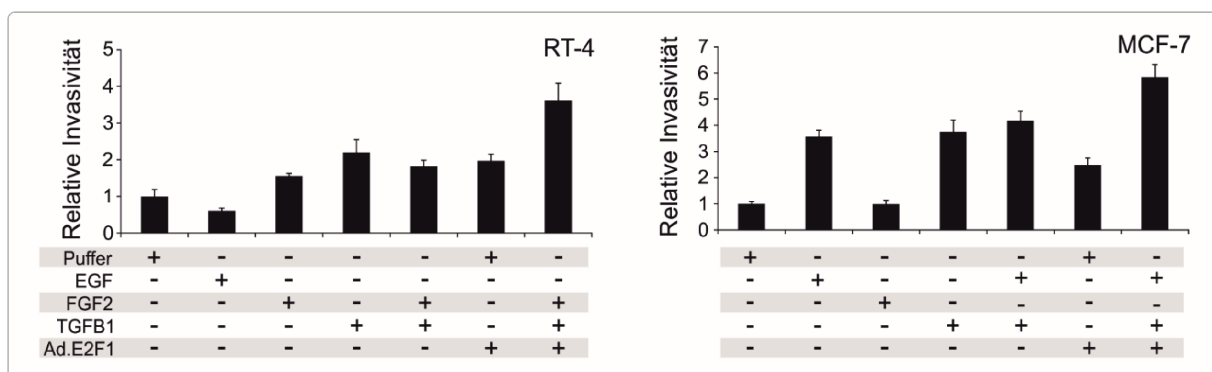


**Abbildung 13: Effekt der Inhibition der EGFR-, FGFR1-, TGF $\beta$ R- und E2F1-Signalwege auf die Invasivität von mesenchymalen Blasen- und Brustkrebszelllinien.**

Das invasive Potential von MDA-MB231 und UM-UC-3 Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Inhibitoren und/oder einer E2F1-spezifischen shRNA beziehungsweise Kontroll-shRNA (sh.ktrl). Die Invasivität wurde relativ zu Kontrollzellen berechnet. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler der Mittelwerte dar. Abbildung nach (Khan, Marquardt, et al., 2017).

Das invasive Verhalten der Zelllinien MDA-MB231 und UM-UC-3 wurde durch Knockdown von E2F1 massiv inhibiert (80% bei MDA-MB231, 75% bei UM-UC-3). Die kombinierte Hemmung aller drei EMT-relevanten Faktoren (EGFR, TGF $\beta$ R1/2, E2F1 bei MDA-M231 versus FGFR1, TGF $\beta$ R1/2, E2F1 bei UM-UC-3) hat eine Abnahme des invasiven Potentials um bis zu 99% zur Folge.

Ebenfalls untersucht wurde, ob sich wenig invasive (epitheliale) Zelllinien zu invasiven (mesenchymalen) Zellen transformieren lassen, wenn die entsprechenden Signalwege zusammen mit E2F1 aktiviert werden. Zu diesem Zweck wurden die epithelialen Vertreter beider Tumormodelle mit den entsprechenden, die Rezeptor-Signalwege aktivierenden Liganden in Anwesenheit von E2F1 stimuliert (Überexpression von E2F1, siehe Material und Methoden). Daraufhin wurden Invasivitäts-Assays mit den modifizierten Zellen durchgeführt (Abb. 14).



**Abbildung 14: Effekt der Aktivierung der EGFR-, FGFR1-, TGF $\beta$ R- und E2F1-Signalwege auf die Invasivität von epithelialen Blasen- und Brustkrebszelllinien.**

Die Stimulation der Zelllinien mit den genannten Liganden der relevanten Signalwege und/oder die Überexpression von ER-E2F1 in den epithelialen Zelllinien führt zur Steigerung ihres Invasiven Verhaltens. Die Zellen wurden 24 Stunden in Wachstumsfaktoren enthaltendem Medium (10 ng/ml EGF, FGF2, TGF $\beta$ , oder beides) vorinkubiert beziehungsweise mit adenoviralem Vektor für die ER-E2F1-Expression transduziert, bevor sie in Boyden-Kammern ausgesät und mit 4-OHT aktiviert wurden. Die Invasivität wurde relativ zu Kontrollzellen (mit PBS-Puffer behandelt) berechnet. Fehlerbalken stellen den Standardfehler der Mittelwerte dar. Abbildung nach (Khan, Marquardt, et al., 2017).

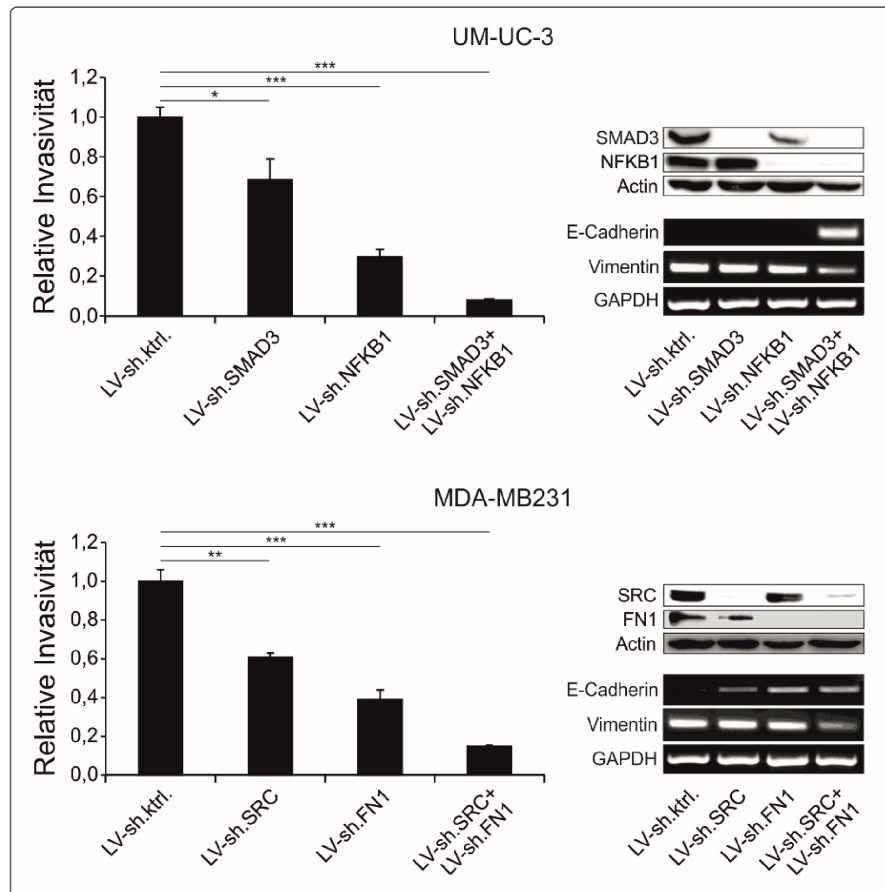
Auch in Abbildung 14 ist der gewebespezifische Charakter der Liganden-Stimulierung zu erkennen sowie der schon unter III.1.3.b (Abb. 10A) gezeigte potenzierende Einfluss von E2F1 auf die Invasivität der beiden wenig invasiven Zelllinien. Der Wachstumsfaktor EGF, Ligand des EGF-Rezeptors, hat ausschließlich auf die Invasivität der Brustkrebszelllinie MCF-7 einen positiven Einfluss. Nach Behandlung der Tumorzellen mit dem Liganden des FGF-Rezeptors 1 FGF2 hingegen konnte eine invasivitätssteigernde Wirkung nur bei der Blasenkrebslinie RT-4 detektiert werden. Wie im *in silico*-Modell vorhergesagt, wird die Invasivität beider Zelllinien durch TGFB1 im Vergleich zur Kontrolle signifikant gesteigert. Darüber hinaus führt die Kombination beider Liganden (TGFB1+FGF2 bei RT-4) und (TGFB1+EGF bei MCF-7) nicht zur weiteren Zunahme invasiv wachsender Zellen, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass sich eine Art Sättigungseffekt einstellt. Die Invasivität kann jedoch durch Überexpression von E2F1 in beiden Modellen deutlich erhöht werden, in RT-4 3,5- und in MCF-7 6-fach. Das heißt, epitheliale Zellen eines Gewebetyps sprechen auf dieselben Rezeptor-Signale an, die zuvor in den mesenchymalen Zellen (UM-UC-3, MDA-MB231) inhibiert wurden und die für deren Invasivität maßgeblich verantwortlich sind.

Zusammengefasst war es uns durch die bioinformatische Analyse eines komplexen E2F1-Interaktionsnetzwerkes möglich, die rezeptormediierten Signalwege (molekularen Signaturen) zu identifizieren, die in den beiden *in vitro*-Modellsystemen den invasiven Phänotyp von hoch E2F1-exprimierenden Zellen bestimmen.

Im nächsten Schritt wollten wir untersuchen, über welche intrazellulären Faktoren dieser Effekt vermittelt wird. Diese Faktoren könnten als diagnostische beziehungsweise prognostische Biomarker und somit als Indikatoren einer beginnenden Tumorprogression (Krebsprävention) dienen oder sind unter Umständen geeignete Ziele für einen gentherapeutischen Ansatz.

In unserem *in silico*-Modell konnten durch Perturbation aller Kombinationen von zwei Faktoren des Kernnetzwerkes Vorhersagen über deren Einfluss auf die Invasivität getroffen werden. Diese sollten durch Doppelknockdown der Faktorpaare *in vitro* validiert werden. Für das Blasenkrebsmodell wurden die Kombinationen i) ZEB1 und einer der Faktoren SNAI1, TWIST1 oder NFκB, ii) SMAD3 zusammen mit TWIST1 oder NFκB, oder iii) ZEB1 und Überexpression von CDH1 vorhergesagt. Für das Brustkrebsmodell wurden

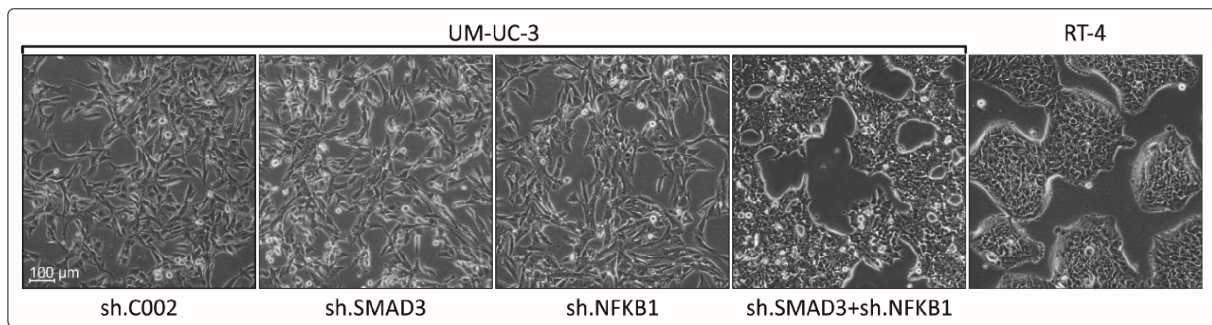
folgende Perturbations-Kombinationen errechnet: Doppelknockdown beziehungsweise im Fall von CDH1 die Überexpression einer beliebigen Kombination der Faktoren SRC/FN1/SNAI1/SNAI2/CDH1. Da ein Knockdown der bekannten EMT-Marker SNAI1, SNAI2, TWIST1 und ZEB1 in der Literatur bereits vielfach beschrieben wurde, erschienen uns die Kombinationen von SMAD3 und NFκB in UM-UC-3 beziehungsweise SRC und FN1 in MDA-MB231 am interessantesten. Um den Einfluss von Einzel- und Doppelknockdown auf das invasive Verhalten der Zellen zu untersuchen, wurden erneut Boyden-Chamber Invasivitäts-Assays durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen stabil mit lentiviralem Vektor transduziert, der die für einen bestimmten Faktor spezifische shRNA exprimiert. Die auf diese Weise dauerhaft modifizierten Zellen wurden hinsichtlich der Effizienz des jeweiligen Gen-Knockdowns mittels PCR und Western Blot-Analysen überprüft (Abb. 15, rechts). Danach weisen alle hergestellten Knockoutzelllinien eine starke Abnahme beziehungsweise den Verlust des jeweiligen Genproduktes auf. Abbildung 15 zeigt die relative Invasivität der Zellen nach Einzel- und Doppelknockdown im Vergleich zu den mit einem sh-Kontrollkonstrukt transduzierten Zellen. Während SMAD3- oder NFκB-depletierte UM-UC-3 Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe ein stark vermindertes invasives Potential aufweisen, ist dieses in SMAD3+NFκB1-Knockdown-Zellen fast vollständig inhibiert (Abb. 15, links oben). Dasselbe gilt für MDA-MB231-Zellen, deren Invasivität am stärksten durch Doppel-Knockdown von SRC+FN1 reduziert wird (Abb. 15, unten links).



**Abbildung 15: Invasivität der aggressiven Zelllinien nach Knockdown der identifizierten Netzwerk-Faktoren.**

Durch *in silico*-Simulationen wurden die effektivsten Kombinationen für einen Doppel-Knockdown zur Reversion des mesenchymalen Phänotyps identifiziert. Die Validierung der *in silico* Knockout-Simulationen erfolgte durch Invasivitäts-Assays stabil SMAD3-, NFκB-, SRC-, oder FN1-shRNA-exprimierender Zellen. Der Knockdown wurde mittels PCR und Western Blot verifiziert. Die Zellinvasivität wurde relativ zu Kontrollzellen (LV-sh.ktrl) berechnet. Fehlerbalken stellen den Standardfehler der Mittelwerte dar. Student t-Test: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  (Khan, Marquardt, et al., 2017).

Darüber hinaus wurden die modifizierten Zelllinien auf morphologische Veränderungen hin untersucht. Danach weisen UMUC3-LV-sh.SMAD3+NFKB1-Zellen eine mit wenig invasiven RT-4 Zellen vergleichbare epitheliale Morphologie auf (Abb. 16). Das bedeutet, dass beide Faktoren für die EMT der Zellen verantwortlich sind und somit Indikatoren für invasives Wachstum darstellen. Umgekehrt lässt sich der aggressive Phänotyp im Sinne einer therapeutischen Intervention durch Inhibition beider Faktoren in einen prä-invasiven Zustand (sogenannte mesenchymal-epitheliale Transition, MET) reversieren.



**Abbildung 16: Morphologie von mesenchymalen UM-UC-3 und epithelialen RT-4 Blasenkrebszellen.**

Phasenkontrastbilder von UM-UC-3 und RT-4 im Vergleich. Ursprünglich mesenchymale UM-UC-3-Zellen zeigen nach stabilem Knockdown von SMAD3 und NFκB im Vergleich zu sh.C002-Kontrollzellen eine epitheliale Morphologie.

#### III.1.4. Analyse von Brust- und Blasenkrebs-Patientendaten der TCGA-Datenbank

Um zu testen, ob die beiden identifizierten Signaturen – hohe E2F1-, FGFR1-, TGFBR1/2-beziehungsweise E2F1-, EGFR-, TGFBR1/2-Expression – nur in unseren Zellmodellen zwischen hoch und wenig invasiven Zelllinien differenzieren können und damit kaum eine klinisch translatierbare Aussagekraft besitzen, haben wir Expressionsdaten und klinische Daten großer Patientenkohorten der TCGA-Datenbank (<http://xena.ucsc.edu>) aus beiden Gewebearten (TCGA bladder cancer:  $n = 426$ , TCGA breast cancer:  $n = 1218$ ) analysiert. Dazu haben wir die Patienten eingeteilt in eine Gruppe mit der entsprechenden Signatur (Expression aller drei Faktoren über dem Median) und eine Gruppe mit entgegengesetztem Expressionsmuster (Signatur\*-Gruppe mit Expressionswerten unterhalb des Medians für alle drei Faktoren der Signatur). Nach Gleichung Gl. 1 wurde die Qualität der Klassifizierung berechnet. Die Ergebnisse zeigen, dass wir durch die per Simulation vorhergesagten Signaturen in der Lage sind, auch Patienten in frühe und fortgeschrittene Tumorstadien von Blasenkrebs (Stage II vs. IV) beziehungsweise wenig aggressive und aggressive Stadien von Brustkrebs (Luminal A und B vs. Basal und Her2) zu klassifizieren (Abb. 17).



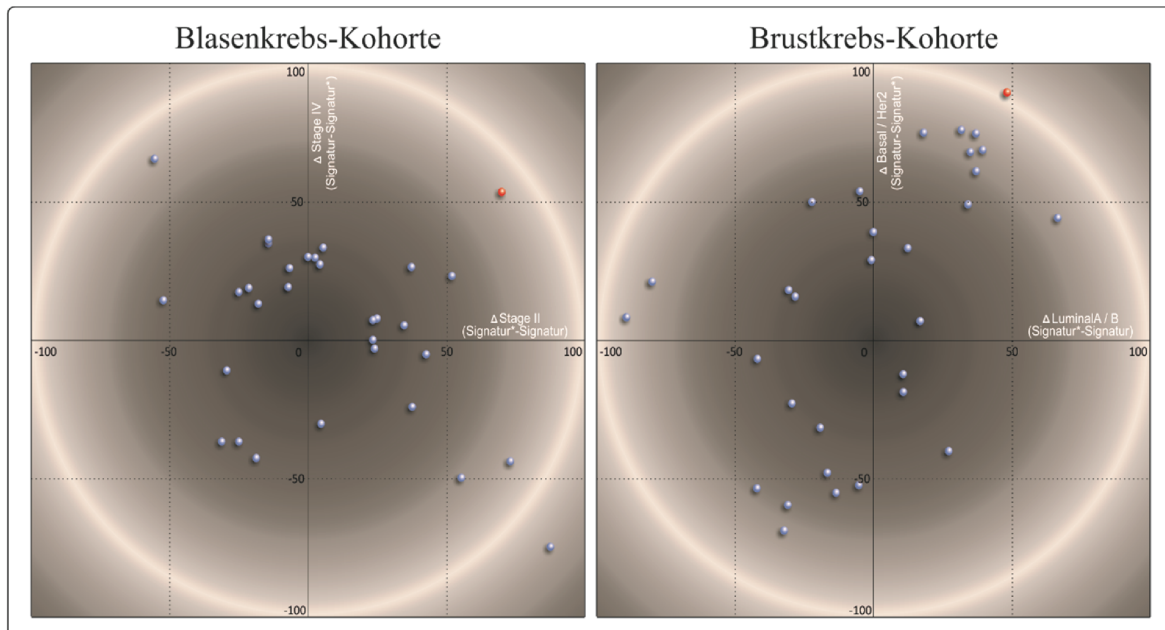
$$\Delta_{as} = 100 \times \frac{P_s - P_{s^*}}{P_s^{total}} \quad \left| \begin{array}{l} \text{aggressiver} \\ \text{Stage} \end{array} \right. \quad \Delta_{ns} = 100 \times \frac{P_{s^*} - P_s}{P_s^{total}} \quad \left| \begin{array}{l} \text{wenig aggressiver} \\ \text{Stage} \end{array} \right.$$

**Gl. 2**

mit  $P_s$  = Anzahl Patienten mit Signatur,  $P_{s^*}$  = Anzahl Patienten mit Signatur\*,  
 $P_s^{total}$  = Summe Patienten mit Signatur und Signatur\*, wobei für eine gute Klassifizierung gelte:  
 $\Delta_{as} \rightarrow 100 \%$  und  $\Delta_{ns} \rightarrow 100 \%$

Dass die beiden identifizierten Signaturen die Patienten nicht zufälligerweise gut klassifizieren, zeigt ein Vergleich mit 30 zufällig generierten Signaturen. Dazu wurden beliebigen Kombinationen aus drei Faktoren des jeweiligen Kernnetzwerkes (ohne die drei Faktoren der spezifischen Signatur) wahlweise hohe oder niedrige Expressionswerte für die Signatur-Gruppe und entgegengesetzte für die Signatur\*-Gruppe zugeordnet. Die Qualität der jeweiligen Klassifikation durch diese zufälligen Signaturen wurde gegenüber einer Gleichverteilung der Patienten (Chi-Quadrat-Test) berechnet (Abb. 17).

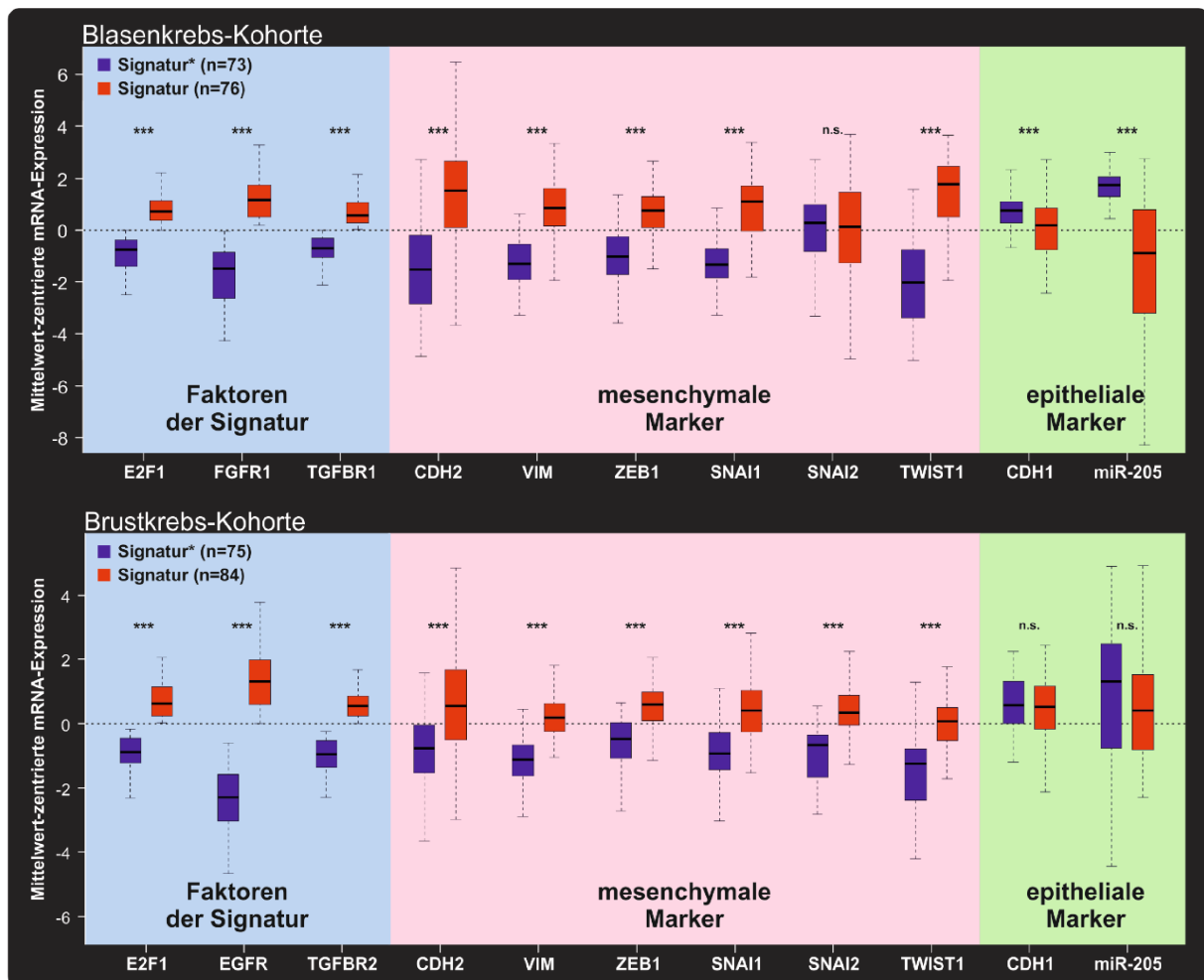
Für die Kohorte von Blasenkrebspatienten sticht die *in silico* vorhergesagte und *in vitro* getestete Signatur unter den 31 Signaturen als diejenige heraus, die als einzige in der Lage ist, die Patienten in frühe und späte Stadien zu klassifizieren ( $p = 3,67 \cdot 10^{-9}$  gegenüber einer Gleichverteilung). Für die Kohorte der Brustkrebspatientinnen ist die vorhergesagte Signatur gegenüber allen zufälligen Signaturen die signifikanteste ( $p = 7,16 \cdot 10^{-19}$ ), während hier auch andere Signaturen in der Lage sind, die Patienten gut in weniger und hoch aggressive Brustkrebsstadien einzuteilen ( $p > 7,19 \cdot 10^{-15}$ ).



**Abbildung 17: Validierung der molekularen Signaturen in Blasen- und Brustkrebs-Kohorten aus der TCGA-Datenbank.**

Die Blasenkrebs-Patienten wurden anhand ihrer Zugehörigkeit zum frühen (Stage II) versus fortgeschrittenen (Stage IV) Tumorstadium selektiert. In beiden Gruppen wurde die Differenz zwischen der Anzahl an Patienten mit (zufälliger) Signatur gegenüber der mit (zufälliger) Signatur\* berechnet und normalisiert (siehe Gl. 1). Die Brustkrebs-Patienten wurden anhand der PAM50-Signatur (The Cancer Genome Atlas Network, 2012) in eine Gruppe mit wenig aggressiven (Luminal A und B) und eine Gruppe mit hoch aggressiven (Basal und Her2) Tumoren eingeteilt. Anschließend wurden die Patientenzahlen mit (zufälliger) Signatur beziehungsweise (zufälliger) Signatur\* verglichen, wie für die Blasenkrebs-Kohorte beschrieben. Signaturen in der oberen rechten beziehungsweise unteren linken Ecke der Scatter Plots sind gute Klassifizierer. Die Signaturen aus unseren Analysen sind in Rot dargestellt, die zufällig generierten in Blau. Abbildung nach (Khan, Marquardt, et al., 2017).

Da wie experimentell gezeigt, eine erhöhte Expression der EMT-Marker mit einem gesteigerten invasiven Potential der Tumorzellen einhergeht, wurde die Expression von ausgewählten EMT-Markern in den jeweiligen Patienten-Populationen verglichen. Abbildung 18 zeigt die durchweg höhere Expression von mesenchymalen und niedrigere Expression von epithelialen Markern in der Signatur-Gruppe im Vergleich zur Signatur\*-Gruppe, was Aufschluss über den EMT-Status der Tumoren der beiden Subpopulationen gibt.



**Abbildung 18: Expression mesenchymaler und epithelialer Marker beider Tumor-entitäten in Patienten-Kohorten der TCGA-Datenbank.**

Mittelwert-zentrierte Expressionsprofile in Patienten-Kohorten, welche anhand der Expression der Signatur-Faktoren klassifiziert wurden. Blauer Hintergrund: Expression der Faktoren der molekularen Signatur, roter Hintergrund: Expression mesenchymaler Marker, grüner Hintergrund: Expression epithelialer Marker. Statistische Signifikanz nach Student t-Test: \*\*\*  $p < 0,005$ ; n.s. - nicht signifikant. Abbildung nach (Khan, Marquardt, et al., 2017).

## III.2. Das Koregulom von E2F1 und TGFβ

Wie in Kapitel III.1.3 experimentell gezeigt wurde, können E2F1 und verschiedene Rezeptor-Signalwege wie EGFR, FGFR1 und TGFBR ähnliche Effekte auf die Invasivität von Tumorzellen ausüben. Weitere Untersuchungen sollten zeigen, ob die EMT-induzierende Wirkung auf parallelen, voneinander unabhängigen Signalwegen basiert, oder ob diese miteinander interagieren. Vorstellbar ist zum Beispiel, dass E2F1 die Expression von Faktoren der anderen Rezeptor-Signalwege beeinflusst und dadurch deren Aktivität downstream vom jeweiligen Rezeptor steuert. Bekannt ist, dass E2F1 an Promotoren mehrerer Oberflächen-Rezeptoren wie EGFR und PDGFB (Engelmann, Mayoli-Nüssle, et al., 2013; Alla, Engelmann, et al., 2010) und Signalüberträger wie SMAD4 binden kann und deren Expression induziert. Von den drei in dieser Arbeit im Zusammenhang mit E2F1 untersuchten Rezeptor-Signalwegen TGFBR1/2, EGFR und FGFR1 haben wir uns zunächst für die Untersuchung von Signalweg-Interaktionen mit TGFβ1 entschieden. Der kanonische, über SMAD2/3/4 gesteuerte TGFβ-Signalweg ist ähnlich wie E2F1 ein treibender Faktor für hoch aggressiven Brustkrebs und weist zudem wie E2F1 ein stark Zellkontext-abhängiges ambivalentes Verhalten auf (Lamouille, Xu, & Derynck, 2014). Von besonderem Interesse sind aufgrund unserer Ergebnisse (siehe III.1.3) TGFβ1-induzierte Zielgene, die auch durch E2F1 reguliert werden.

Die Bindung von TGFβ an dessen Rezeptoren aktiviert SMAD2 und 3, die daraufhin dimerisieren und SMAD4 binden können. Dieser im Folgenden als SMAD2-4 oder SMADs bezeichnete Komplex führt nach Translokation in den Zellkern zur Transaktivierung TGFβ-abhängiger Zielgene.

In der vorliegenden Arbeit wurden anhand von Chromatin-Immunpräzipitations (ChIP)-Daten, der *in silico*-Sequenzsuche von TFBS und der Expressions-Korrelations-Analyse potentielle gemeinsame Zielgene von E2F1 und SMAD2, -3, und -4 (SMAD2-4) identifiziert. Zusätzlich wurde untersucht, ob Faktoren aus dem TGFβ-Signalweg, die nicht direkte Zielgene von SMAD2-4 sind, mögliche Zielstrukturen von E2F1 sind.

Zur Identifizierung funktioneller Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen hat sich die ChIP-seq-Methode etabliert, bei der durch Immunpräzipitation (IP) des Transkriptionsfaktors und anschließende Sequenzierung der gebundenen Chromatinabschnitte die genomische Bindestelle nachgewiesen wird. Um unabhängig vom zellulären Kontext ein umfassendes

Bild der E2F1- und SMAD-Bindestellen an kodierenden Sequenzen zu erhalten, wurden ChIP-seq-Daten aus verschiedenen Datenbanken genutzt. GTRD und ChIP-Atlas bereiten die Rohdaten öffentlich zugänglicher ChIP-seq-Ergebnisse standardisiert auf, um sie untereinander vergleichbar zu machen. Man erhält somit ein umfassendes ChIP-seq-basiertes potentiell Regulum für einen speziellen TF.

Des Weiteren wurde das Humangenom auf die Position Weight Matrix (PWM) des jeweiligen TF gescannt, um potentielle TFBS zu identifizieren. Die alleinige Suche nach sequenzbasierten TFBS ergibt wegen der Bindung von TF an nicht-Konsensus-Sequenzen oder an Kofaktoren viele falsch negative und aufgrund der degenerierten TFBS auch nicht-funktionale, falsch positive Resultate (Cao, Rabinovich, et al., 2011; Bieda, Xu, et al., 2006). Zusätzlich zu den identifizierten TFBS aus der ChIP-seq- und der PWM-Analyse diente die Expressions-Korrelation eines Genes in Transkriptomdaten von E2F1-perturbierten beziehungsweise TGF $\beta$ -induzierten experimentellen Ansätzen als Indiz für eine Regulation des Genes durch die untersuchten TF E2F1 beziehungsweise SMAD2-4.

### III.2.1. Screening bekannter und potentieller Zielgene von E2F1 und SMAD2-4 mithilfe von ChIP-seq-Daten

Von der ChIP-Atlas-Datenbank wurden die offiziellen Gennamen von E2F1-, SMAD2-, SMAD3- und SMAD4-Zielgenen, die bis zu 5 kb upstream der Transkriptions-Startstelle (TSS) eine ChIP-seq-Bindestelle aufweisen, heruntergeladen. Zusätzlich wurden von der GTRD-Datenbank die genomischen Positionen der ChIP-seq-Peaks (meta clusters) bis 5 kb upstream der TSS der potentiellen Zielgene heruntergeladen. Mithilfe des Algorithmus *bedtools ClosestBed* des *Galaxy*-Servers wurden den ChIP-seq-Peaks die jeweils am nächsten gelegenen Gene (*GENCODEv29*, hg38) zugeordnet. Die Abstände der ChIP-seq-Peaks von der jeweiligen TSS wurden im Verlauf der weiteren Analyse durch Festlegung eines Promotorintervalls von [-2000/+200] bp um die TSS gefiltert. Die auf diese Weise erhaltenen Gennamen und Gen-IDs wurden daraufhin mit denen aus der *ChIP-Atlas*-Datenbank kombiniert. Es zeigte sich, dass jeweils nur ca. 1% der Gene aus der *ChIP-Atlas*-Datenbank nicht in den umfangreichen Datensätzen der *GTRD*-Datenbank enthalten ist. Der Abgleich der Gene mit E2F1- beziehungsweise SMAD2-4-ChIP-seq-BS ergab 12455

Gene, für die ChIP-seq-BS beider TF innerhalb des definierten Promotors nachgewiesen wurden (Abb. 19A links, Abb. 20A, Tabelle 4).

Die aus der Literatur bekannten Zielgene von E2F1 wurden der E2F1-Map, und wie die Zielgene von SMAD2, -3 und -4 der *TRANSFAC*- und der *TRRUST*-Datenbank entnommen und zu einer Liste zusammengefügt. Der Abgleich mit den ChIP-seq-Daten zeigte, dass die meisten bekannten Zielgene von E2F1 (74,4%) und SMAD2-4 (59,5%) ChIP-seq-Bindestellen des jeweiligen TF aufweisen, es jedoch auch Zielgene ohne eine solche zu geben scheint beziehungsweise eine entsprechende Bindung bisher nicht nachgewiesen wurde (Tabelle 3).

### III.2.2. Sequenzbasierte Suche von TFBS im Humangenom durch PWM

Die durch die Software *PWMScan* identifizierten TFBS im Humangenom (Dez. 2013, hg38) wurden wie zuvor beschrieben mithilfe des *Galaxy*-Servers bekannten Genen zugeordnet. Dabei wurde für SMAD2-4 diejenige TFBS mit dem höchsten PWM-Score, die am nächsten zur TSS gelegen ist, verwendet. Da dieser Ansatz bekannte Zielgene nur zu einem Anteil von 14,7% (E2F1) beziehungsweise 19% (SMAD2-4) (Tabelle 3) identifiziert, werden sie in den weitergehenden Analysen außer Acht gelassen. Immerhin wurde bei 88,6% der bekannten E2F1-Zielgene, die eine PWM besitzen, auch eine ChIP-seq-BS identifiziert. Bei SMAD2-4-Zielgenen mit identifizierter PWM trifft dies für 87,5% zu. Die Überschneidung mit den 12485 Genen, die ChIP-seq-BS sowohl für E2F1 als auch für SMAD2-4 enthalten beziehungsweise gemeinsame bekannte Zielgene sind, zeigt, dass 293 (2,4%) von diesen Genen ebenfalls PWM-BS beider Faktoren innerhalb des Intervalls [-2000, +200] um die TSS aufweisen (Tabelle 4).

Tabelle 3	E2F1	SMAD2-4	E2F1	SMAD2-4
bekannte Zielgene	238	42	%	%
mit ChIP-seq-BS	177	25	74,4	59,5
mit PWM-BS	35	8	14,7	19,0
mit ChIP-seq- & PWM-BS	31	7	13,0	16,7
mit ChIP-seq- & PWM-BS von E2F1 & SMAD2-4	5	1	2,1	2,4

### III.2.3. Identifizierung von E2F1- und SMAD2-4-regulierten Genen in humanen Zelllinien mit Hilfe von Transkriptomdaten

Um E2F1- und TGF $\beta$ -regulierte Gene zu identifizieren, wurden wie in II.2.6.e beschrieben Transkriptomdaten von jeweils zwei Mikroarrays nach E2F1-Überexpression beziehungsweise TGF $\beta$ -Aktivierung auf ihre differentielle Expression hin ausgewertet. Abbildung 19B (links) zeigt Volcano-Plots der differentiell exprimierten Gene der vier Mikroarrays mit  $\log_2FC$  (Fold Change, x-Achse) und  $-\log_{10}FDR$  (False Discovery Rate, y-Achse). Rot markiert sind die signifikant differentiell exprimierten Gene mit  $|\log_2FC| > 0,5$  ( $FDR < 0,05$ ), grün markiert sind bekannte Zielgene von E2F1 beziehungsweise SMAD2-4. Aus den Daten wird ersichtlich, dass die Fold Changes zwischen den Arrays sehr unterschiedliche Amplituden (x-Achsen) aufweisen und besonders in den TGF $\beta$ -Arrays vergleichsweise gering ausfallen. Dadurch ist die Anzahl der signifikant differentiell exprimierten Gene in den TGF $\beta$ -Arrays geringer (siehe Histogramme in Abbildung 19B rechts und Venn-Diagramme in 19C), wobei der minimale  $|\log_2FC|$  auf 0,5 festgesetzt wurde, um auch geringe Expressionsänderungen nach TGF $\beta$ -Stimulation zu detektieren. Die roten Linien beschränken das Intervall  $\log_2FC \in [-0,5; 0,5]$ . Die differentiell exprimierten Gene werden im Folgenden „Responder“ genannt (Tabelle 4). Die Verknüpfung der ChIP-seq-Daten mit der differentiellen Expression stellt ein Filterkriterium dar, um falsch Positive aus der ChIP-seq-Analyse herauszufiltern. Gleichzeitig fallen durch die beschränkte Datenlage an geeigneten Transkriptomdaten falsch Negative heraus.

### III.2.4. Zuordnung der potentiellen Zielgene zu TGF $\beta$ -assoziierten Signalwegkaskaden

Die an TGF $\beta$ -Signalwegkaskaden beteiligten Faktoren wurden von den *Reactome*-, *AmiGO*- und der *KEGG*-Datenbanken heruntergeladen (siehe II.2.6.g). Die Überschneidung der in TGF $\beta$ -Signalwege involvierten Faktoren mit bekannten und potentiellen Zielgenen von E2F1 beziehungsweise SMAD2-4 ist in Abbildung 19C (unten) und in Tabelle 4 dargestellt. Insgesamt 60,7% der TGF $\beta$ -Signalweg-Faktoren besitzen eine ChIP-seq-BS für oder sind bekannte Zielgene von E2F1. 49,4% der TGF $\beta$ -Signalweg-Faktoren besitzen eine ChIP-seq-BS für oder sind bekannte Zielgene von SMAD2-4 (Abb. 19C, Tabelle 4). E2F1-Zielgene sind zum Beispiel TGF $\beta$ , TGF $\beta$ R2, SMAD2, einige BMP-Liganden sowie die negativen Regulatoren SMAD7, SKIL, INHBA und dessen ACVR-Rezeptor (Tabelle 6, Anhang). Unter den 33 gemeinsam regulierten Faktoren sind TGF $\beta$  selbst, BMP2, die negativen Regulatoren SMAD7, ARRB2, SKIL, BAMBI sowie SERPINE1 und THBS1.

### III.2.5. Überlappung der potentiellen Zielgene mit bekannten EMT-Markern und EMT-assoziierten Faktoren

Bekannte EMT-Marker und EMT-assoziierte Faktoren wurden wie zuvor aus den Datenbanken *AmiGO*, *GSEA* und *dbEMT* heruntergeladen (siehe II.2.6.g). Die Überschneidung dieser Faktoren mit den bekannten und potentiellen Zielgenen von E2F1 und SMAD2-4 ist in Abbildung 19C (unten) und in Tabelle 4 dargestellt. Dabei besitzen insgesamt 61,3% der EMT-Faktoren eine ChIP-seq-BS für oder sind bekannte Zielgene von E2F1. Insgesamt 48% der EMT-Faktoren weisen eine ChIP-seq-BS für SMAD2-4 auf oder sind als deren Zielgene bekannt (Abb. 19C, Tabelle 4). Unter Einbeziehung der Microarray-Daten, die signifikant weniger Responder für TGF $\beta$  als für E2F1 ergaben, stellt sich ein deutlicher Unterschied zwischen dem Anteil E2F1-regulierter (etwa 47% im TGF $\beta$  Signalweg und 42% der EMT-Faktoren) und dem TGF $\beta$ /SMAD2-4-regulierter potentieller Zielgene (nur 11,6% der TGF $\beta$ - beziehungsweise 10,6% der EMT-Faktoren) dar (Tabelle 4). Unter den 95 EMT-assoziierten Faktoren, die potentiell durch beide Signalwege reguliert werden, sind zum Beispiel TGF $\beta$ , VEGFA, CXCL1, FN1, THBS1, ITGA5, SNAI2, SERPINE1 und -2, TERT und auch FGFR1 und EGFR (Abb. 19D, Tabelle 6, Anhang).



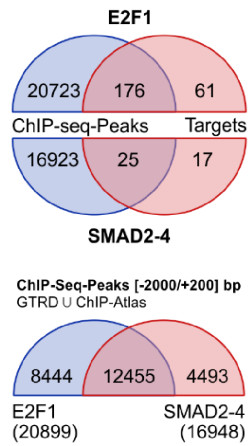
Tabelle 4

	<b>E2F1</b>	<b>SMAD2-4</b>	<b>E2F1 <math>\cap</math> SMAD2-4</b>
Bekannte und Gene mit ChIP-seq-BS	20960	16965	12485
Bekannte und Responder mit ChIP-seq-BS	8163	1172	726
Bekannte und Gene mit ChIP-seq-BS in TGF $\beta$ -pw (405)	246	200	168
Bekannte und Responder mit ChIP-seq-BS in TGF $\beta$ -pw	190	47	33
Bekannte und Gene mit ChIP-seq-BS in EMT-pw (1382)	847	664	547
Bekannte und Responder mit ChIP-seq-BS in EMT-pw	580	146	95

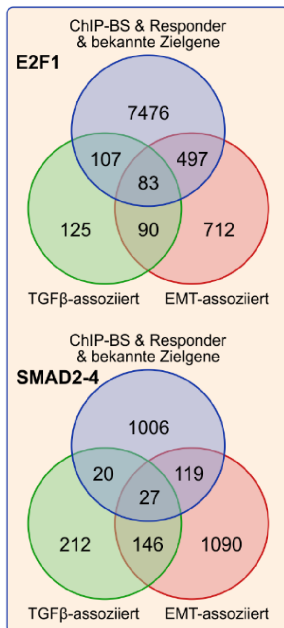
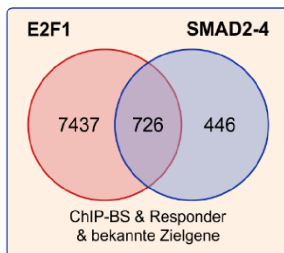
**Abbildung 19: Bioinformatische Analyse der potentiellen Zielgene von E2F1 und TGF $\beta$ /SMAD2-4 anhand von ChIP-seq- und Transkriptomdaten.**

**(A)** Venn-Diagramme der bereits verifizierten Zielgene von E2F1 beziehungsweise SMAD2-4 (targets) und der Gene mit ChIP-seq-BS von E2F1 beziehungsweise SMAD2-4 (oben). Venn-Diagramm, welches den Anteil an Genen mit ChIP-seq-BS beider Signalwege darstellt (unten). **(B)** Volcano-Plots der vier Microarray-Studien an E2F1-überexprimierenden beziehungsweise TGF $\beta$ -stimulierten Zellen (links). Rot markiert sind signifikant differentiell exprimierte Gene ( $\log_2FC > 0,5$ ,  $FDR < 0,05$ ), grün markiert sind bekannte Zielgene von E2F1 beziehungsweise SMAD2-4. Histogramm aller Gene mit  $FDR < 0,05$  (rechts). **(C)** Venn-Diagramme der in den Microarrays differentiell regulierten Gene, die zudem die jeweilige ChIP-seq-BS besitzen (inkl. aller bekannten Zielgene). *Oben:* gemeinsame Zielgene von E2F1 und TGF $\beta$ /SMAD2-4. *Unten:* Zielgene (oben E2F1-Responder, unten TGF $\beta$ -Responder), die TGF $\beta$ - beziehungsweise EMT-assoziert sind. **(D)** Venn-Diagramm der gemeinsamen EMT-assozierten Zielgene von E2F1 und TGF $\beta$ /SMAD2-4.

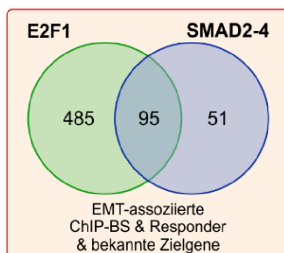
A



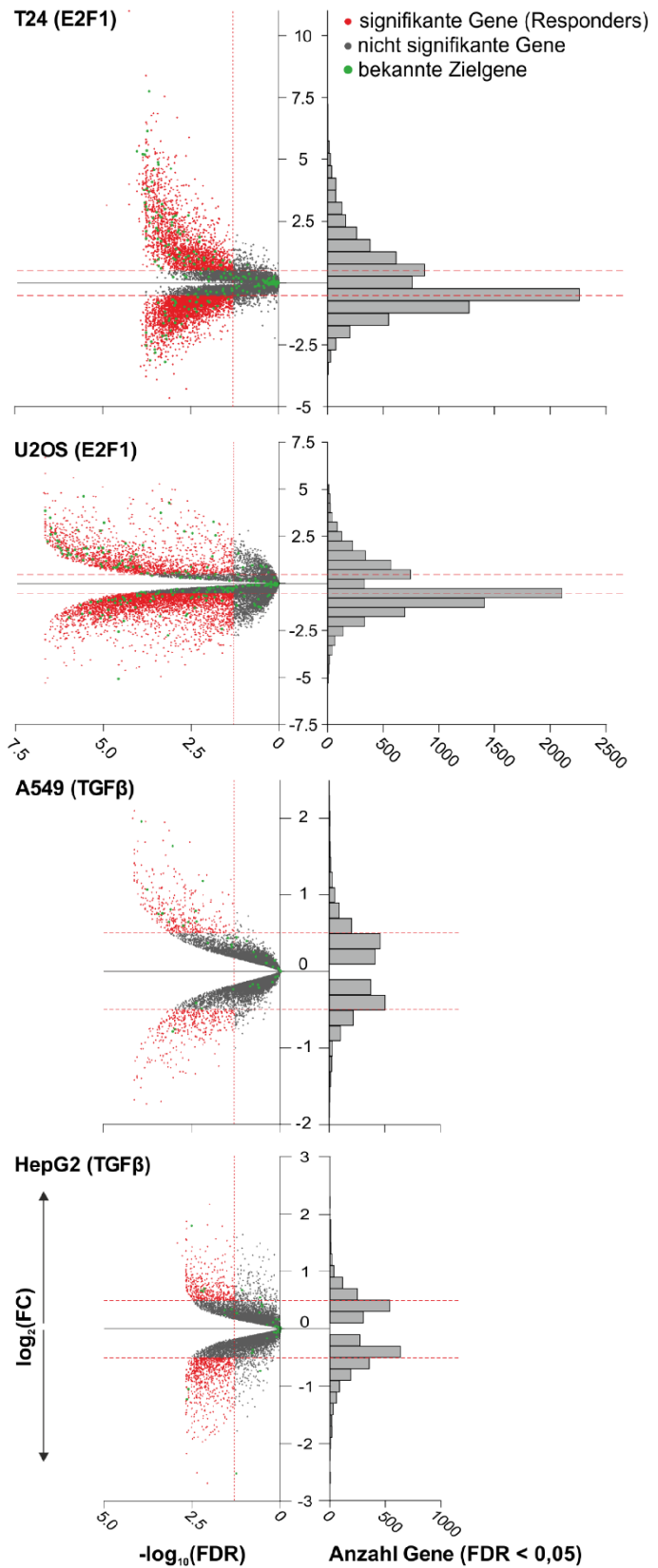
C



D



B



### III.2.6. Korrelations-Analyse von Expressionsdaten der TCGA-Datenbank

Anschließend wurden die Expressions-Korrelationen  $k$  sämtlicher aus den Patienten- und Expressionsdaten der Blasen- und Brustkrebs-Datensätze der TCGA-Datenbank erhaltenen Gene mit E2F1 und SMAD2, -3 und -4 mithilfe der Programmiersprache **R** berechnet. Für SMAD2-4 wurde das Extremum der drei Korrelationswerte verwendet. Als kritischer Wert für eine (positive beziehungsweise negative) Korrelation wurde ein minimaler Absolutwert von  $|p_s| = 0,2$  ( $p\text{-value} < 0,001$ ) angenommen. Bekannte Zielgene von E2F1 und TGF $\beta$  sind in den verwendeten Datensätzen über die gesamte Korrelationsspanne  $p \in (-1/1]$  vertreten. Für die Berechnung der Korrelation wurde die nichtparametrische Spearman-Methode benutzt, weil diese nicht durch Ausreißer in den Expressionswerten beeinflusst wird. Da Zielgene in der Regel von mehreren TF reguliert werden, hängt die Expressions-Korrelation zu einem spezifischen TF auch von der Aktivität der anderen TF ab. Die Expressions-Korrelation stellt unter bestimmten Annahmen ein Maß für die Stärke des Einflusses eines TF auf seine Zielgene dar.

Mithilfe einer Cox-Regressions-Analyse in **R** wurden diejenigen mit E2F1 beziehungsweise SMAD2-4 korrelierten Gene identifiziert, die einen signifikanten Einfluss auf die Überlebensprognose von Patienten haben ( $p\text{-value} < 0,05$ ,  $|k| > 0,2$ ) und somit entweder treibende Kräfte der Tumoren oder wenigstens potentielle Biomarker darstellen (Tabelle 5).

Tabelle 5

<b>Bekannte Gene und Responder mit ChIP-seq-BS und signifikantem Einfluss auf die Überlebensprognose in Patienten aus der</b>	<b>E2F1</b>	<b>SMAD2-4</b>	<b>gemeinsam</b>
BLCA-Kohorte	1252	112	83
BRCA-Kohorte	1697	177	135

### III.2.7. Zusammenfassung und Auswertung der gesammelten Daten mithilfe einer multi-objektiven Optimierungsfunktion

Mithilfe des *desiR*-Packages in **R** wurden folgende der zuvor beschriebenen, den einzelnen Genen zugeordneten Parameter in einer multi-objektiven Funktion („Desirability-Funktion“) zusammengefasst und analysiert:

i) ChIP-seq-BS innerhalb [-2000/+200] bp um die TSS, ii) Responder, iii) Expressions-Korrelation in Patienten, iv) signifikanter Einfluss auf die Überlebensprognose von Patienten. In vier verschiedenen Szenarien wurde den Parametern eine unterschiedliche Gewichtung zugewiesen, um das Augenmerk auf verschiedene Aspekte zu legen. Die Desirability-Funktion ordnet alle Gene anhand der Erfüllung der einzelnen Parameter:

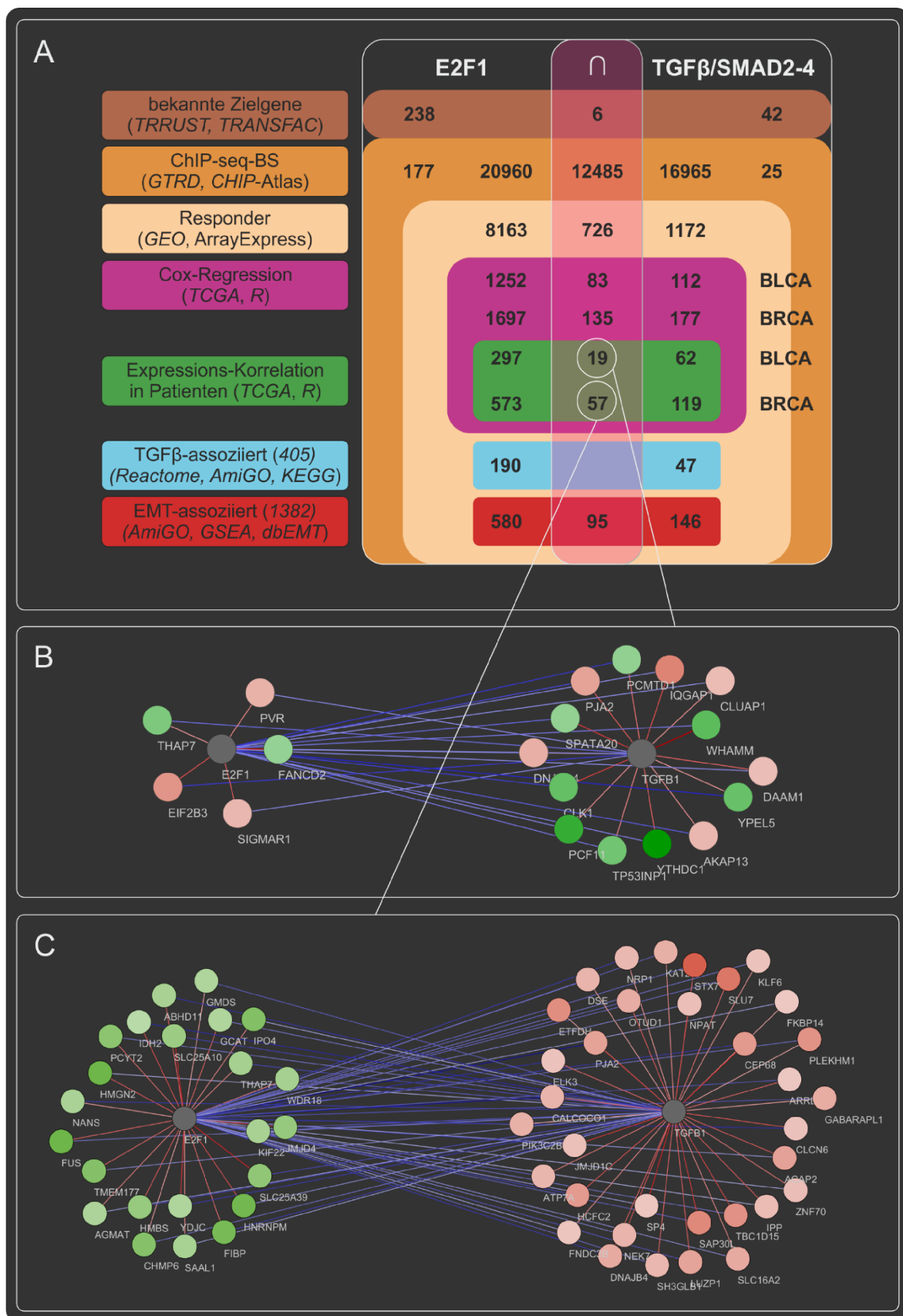
- a) Im ersten Szenario wurden nur E2F1-Zielgene berücksichtigt, die das ChIP-BS- und das Responder-Kriterium erfüllen und a1) zum TGFβ-Signalweg beziehungsweise a2) zu den EMT-relevanten Faktoren zählen. Diese Listen beinhalten E2F1-Zielgene, die den TGFβ-Signalweg beeinflussen beziehungsweise die für die EMT relevant sind.
- b) Im zweiten Szenario wurden nur E2F1-Zielgene berücksichtigt, die das ChIP-BS- und das Responder-Kriterium erfüllen und zusätzlich signifikanten Einfluss auf das Überleben von Patienten haben. Diese Liste beinhaltet klinisch relevante E2F1-Zielgene und potentielle Biomarker.
- c) Im dritten Szenario wurden alle Gene gefiltert, die zusätzlich zu ChIP-seq-BS von E2F1 und SMAD2-4 auch Responder in wenigstens jeweils einem der beiden verwendeten Mikroarrays sind. Diese Liste stellt den Pool der gemeinsamen Zielgene von E2F1 und TGFβ dar. Des Weiteren wurde diese Liste mit den EMT-relevanten Faktoren abgeglichen, um diejenigen zu identifizieren, die durch beide Signalwege, E2F1 und TGFβ, gemeinsam reguliert werden können.
- d) Im vierten Szenario wurden alle Responder gefiltert, die zusätzlich zu beiden ChIP-seq-BS auch in Patientendaten (BLCA beziehungsweise BRCA) mit der Expression beider TF korrelieren und signifikanten Einfluss auf deren Überlebensprognose haben. Diese putativen Zielgene sind besonders relevant, weil sie in Patienten mit schlechter Überlebensprognose potentiell E2F1- und SMAD2-4-abhängig exprimiert werden und somit relevante Zielgene für eine mögliche pharmazeutische oder gentherapeutische Intervention darstellen.

Die Genlisten sind in Tabelle 6 im Anhang dargestellt.

Die Listen aus den Szenarien a) und b) der potentiell E2F1-regulierten Gene sollen Grundlage für die weitere experimentelle Charakterisierung der Rolle von E2F1 in der EMT und im Zusammenhang mit bekanntermaßen TGF $\beta$ -getriebenen Tumorerkrankungen wie zum Beispiel Brustkrebs darstellen. Die Gen-Liste aus Szenario c) stellt den Patientendaten-unabhängigen gemeinsamen Pool der Faktoren dar, die sowohl durch E2F1 als auch durch TGF $\beta$  reguliert werden. Durch das Filtern mithilfe der Expressions-Korrelation und der Cox-Regression in Patienten, wird diese Liste Tumortyp-spezifisch und viele der Faktoren fallen heraus (vergleiche Tabelle 4 und -5).

Die anhand der beschriebenen Kriterien in Szenario d) identifizierten Faktoren werden potentiell sowohl von E2F1 als auch von TGF $\beta$  reguliert. Eine im Gegensatz zur entweder E2F1-oder-TGF $\beta$ -Regulation mögliche Koregulation durch beide Faktoren ist vorstellbar. Eine weitergehende experimentelle Untersuchung dieses Sachverhaltes ist jedoch notwendig, um eine Koregulation von gemeinsamen Zielgenen zu verifizieren.

Die Faktoren der Liste aus Szenario d) sollten auf ihre Rolle im Zusammenhang mit der EMT und Tumor-Invasivität hin untersucht werden, um die Mechanismen aufzuklären, die die Ursachen der schlechten Überlebensprognose von Patienten darstellen. Unter den Faktoren befinden sich bekannte und in diesem Kontext soweit noch unbekannte Biomarker. Diese stellen potentielle Ziele für Therapieansätze dar, weil E2F1 direkt sich aufgrund seiner mannigfaltigen anderen Funktionen nicht als Therapieziel eignet.



**Abbildung 20: Bioinformatischer Workflow und Ergebnisse.**

**(A)** Dargestellt ist der bioinformatische Workflow in Form eines Venn-Diagrammes mit den schrittweise verwendeten Softwares und Datenbanken zur Identifizierung von

Faktoren, die gemeinsam durch E2F1 und TGF $\beta$  reguliert werden und die Überlebensprognose von Blasen- (BLCA) und Brustkrebspatienten (BRCA) beeinflussen. Zuerst wurden Gene mit ChIP-seq-BS herausgefiltert. Danach wurden diese auf ihre differentielle Expression in Microarray-Daten untersucht und anschließend mit TGF $\beta$ - und EMT-assoziierten Faktoren abgeglichen. Danach folgten eine Cox-Regression der Faktoren und die Analyse der Expressions-Korrelation in TCGA-Patientendaten (BLCA, BRCA). Von den 238 verifizierten Zielgenen von E2F1 beziehungsweise 42 von SMAD2-4, besitzen 177 beziehungsweise 25 ChIP-seq-BS des jeweiligen TF. Zentral ist die Überlappung gemeinsamer Faktoren dargestellt. **(B)** Genregulationsnetzwerk (GRN) der 19 Faktoren in Blasenkrebspatienten, die nach den Filterkriterien übrig bleiben. **(C)** GRN aus 57 herausgefilterten Faktoren in Brustkrebspatienten. Die Farbe der Knoten gibt an, wie stark die Expression eines Faktors sich positiv (grün) beziehungsweise negativ (rot) auf die Überlebensprognose auswirkt. Die Farbe der Kanten gibt die Stärke und Richtung der Korrelation (rot – positiv, blau – negativ korreliert) zu E2F1 und TGF $\beta$  an. Auffallend ist, dass im BRCA sämtliche positiv zu E2F1 korrelierten Gene einen positiven Einfluss auf die Überlebensprognose haben und die negativ korrelierten einen negativen. Für TGF $\beta$  gilt das Gegenteil. Zur Darstellung der GRN wurde Cytoscape verwendet.

## IV. Diskussion

Das Verständnis der Mechanismen, durch welche der Primärtumor sein metastasierendes Potential entwickelt, ist von grundlegender Bedeutung für die Früherkennung und die Krebstherapie. Anhand von Biomarkern wird heute versucht, frühzeitig die krebsspezifischen Veränderungen im Stoffwechsel beziehungsweise in Signalwegen des Tumors zu erkennen, die wenig später metastasierende Eigenschaften nach sich ziehen können (Lee, Leem, et al., 2010). Es gibt Ansätze, auch ohne bestehende Tumordiagnose in sogenannten ‚liquid biopsies‘ Blut auf die darin enthaltenen Bestandteile zu untersuchen, von denen einige Anzeichen für eine Krebserkrankung liefern können (Mazumder, Datta, et al., 2019; Kaiser, 2018; W. Yang, Han, et al., 2018). Unter den Tumor-Biomarkern findet man Proteine, miRNAs (Hartz, Engelmann, et al., 2016), extrazelluläre Vesikel (Navarro-Tableros, Gomez, et al., 2018), zelluläre Oberflächenproteine und andere (zirkulierende) Bestandteile. Dabei ist unerheblich, ob diese Marker in der Probe überrepräsentierte Tumoreffektoren (zum Beispiel Onkogene), fehlende Tumorsuppressoren, Tumor-Metabolismus-Marker oder nicht-funktionelle Moleküle (zum Beispiel non-coding RNAs oder auch ‚Junk-RNAs‘) sind. Durch das Wissen um deren normale Expressionslevel und die bloße Assoziierung ihrer Deregulierung mit bestimmten Erkrankungen sollen diese frühzeitig erkannt werden. Die Auswertung einer großen Zahl von Proben aus gesunden und erkrankten Patienten durch bioinformatische Methoden, statistische Auswertung sowie durch die Netzwerkanalyse ist ein wichtiges Hilfsmittel bei der Identifizierung von Biomarkern und zur Aufklärung von molekularen Zusammenhängen. Bei der Analyse und Vorhersage von Therapieerfolgen bei Chemo-, Radio- oder Immuntherapie spielen bioinformatische Analysen eine immer wichtigere Rolle, zumal durch die an Proben tausender Patienten angewandten Hochdurchsatz-Methoden eine immense Datenlandschaft generiert wird. Durch das Next-Generation Sequencing können Patienten-spezifische Mutationen identifiziert und mit einer Krankheit assoziiert werden. Dadurch wird es möglich, eine für jeden Patienten maßgeschneiderte Therapie („precision medicine“) zu entwickeln beziehungsweise Patienten anhand ihres jeweiligen genetischen Status einer spezifischen Therapie zuzuführen.



## IV.1. Beispiele systembiologischer und bioinformatischer Arbeiten

Die computergestützte Analyse von biologischen Vorgängen durch die Bioinformatik und die Systembiologie hat vielfältige Formen angenommen. Zum einen wird versucht, mit Hilfe von künstlicher Intelligenz oder von machine learning-Algorithmen Muster in großen Mengen von zum Beispiel Expressions- oder Mutationsdaten zu erkennen. Diese Muster lassen auf bestimmte Zusammenhänge innerhalb der Daten schließen und können dadurch entweder Hinweise auf zugrundeliegende Mechanismen geben oder versetzen uns in die Lage, ganz ohne Einblick in die Mechanismen, Patienten besser in Subpopulationen verschiedener Therapieansätze einzuteilen (Horn, Glauche, et al., 2013).

Auf der anderen Seite wird in kleinen Netzwerkmodellen das Zusammenspiel von wenigen Interaktionspartnern simuliert. Durch die präzise, jedoch sehr aufwändige mathematische Modellierung von biologischen Vorgängen, zum Beispiel mit Hilfe von Differentialgleichungen (DGL), ist es möglich, fundamentale Prinzipien und das detaillierte deterministische Verhalten von biologischen Regulationsmechanismen zu untersuchen. Das gestattet uns, nicht intuitives Verhalten von Systemen vorauszusagen und Eigenschaften der Systeme, wie stabile Zustände, Oszillationen und ihre Reaktion in Bezug auf äußere Störungen, zu bestimmen (Lambusch, Waltemath, et al., 2018; Tsai, Choi, et al., 2008; Ebenhöf & Heinrich, 2001, 2003). Die Netzwerkanalyse mittels diskreter (zum Beispiel Boole'scher) Modelle ist durch den Verzicht von kinetischen Parametern auf umfangreichere Netzwerke anwendbar, hat dadurch aber Beschränkungen in ihrer Analyse- und Aussagekraft. Hier ist es schwierig, dynamisches Verhalten wie Feedback- und Feedforward-Signale und exakte konzentrationsabhängige („thresholds“) Vorgänge zu implementieren. Probabilistische Modelle mit stochastischen Methoden berücksichtigen die Unschärfe molekularer Zusammenhänge beziehungsweise unsere Unkenntnis der genauen molekularen Mechanismen und geben einen Ergebnisraum mit entsprechenden Wahrscheinlichkeiten für das eine oder das andere Resultat an. Unter Zuhilfenahme von biologisch sinnvollen Randbedingungen, Erhaltungsgrößen oder Methoden wie der Metabolischen Kontrolltheorie, der Flux-Balance-Analyse und der Chemical Reaction Networks werden Modelle weiter an ihr biologisches Vorbild angepasst (Khan, Marquardt, et al., 2017; Miliadis-Argeitis, Oliveira, et al., 2016; de Hijas-Liste, Klipp, et al., 2014; Khan, Schmitz, et al., 2014; Liebermeister & Klipp, 2006; Klipp, Heinrich, & Holzhütter, 2002). Durch Agenten-basierte Modellierung ist die Simulation

ganzer Zellverbände, Gewebe oder Organe möglich (Barros de Andrade e Sousa, Kühn, et al., 2016). Seit einigen Jahren gibt es auch Ansätze, durch die Nutzung hybrider Netzwerke, je nach Fragestellung, die Vorteile der einen Modelle zu nutzen und ihre Nachteile durch andere Modelle zu umgehen (Khan, Marquardt, et al., 2017; Khan, Schmitz, et al., 2014).

Ein Beispiel für die Modellierung von biologischen Prozessen im Zusammenhang mit E2F1 ist die Identifizierung einer molekularen Signatur von E2F1-abhängigen Faktoren, die für die Chemoresistenz von Tumorzellen verantwortlich ist (Vera, Schmitz, et al., 2013). Hierbei wurden experimentelle Daten in die kinetische Modellierung des Zusammenspiels von einem Dutzend pro- und anti-apoptotischen Entitäten, zellulären Rezeptoren und einer miRNA integriert.

Weitere medizinische Forschungsfelder, in denen die systembiologische Modellierung von Regulationsnetzwerken wichtige Erkenntnisse liefert, sind zum Beispiel die transkriptionsfaktorabhängige Reprogrammierung von Gewebe- zu pluripotenten Zellen (iPC), (Akberdin, Omelyanchuk, et al., 2018; Yachie-Kinoshita, Onishi, et al., 2018; H. Xu, Ang, et al., 2014) und die mathematische Modellierung der Dynamik von heterogenen Tumorphpopulationen aus Stamm-, Vorläufer- und differenzierten Zellen. Tumorstammzellen (CSC) wird eine essentielle Rolle bei der Entstehung von aggressiven, chemo- und radioresistenten, immun-evasiven Tumoren verschiedener Gewebe und deren beschleunigter Rezidivbildung zugeschrieben. Ziel ist es, die Faktoren zu identifizieren, die einen Angriffspunkt für mögliche Therapien darstellen können (Marquardt, Solanki, et al., 2018; Agliano, Calvo, & Box, 2017). Diese Art der „personalisierten“ Krebstherapie führt dazu, dass der einzelne Patient gezielter behandelt werden kann und unnötige Nebenwirkungen verhindert werden können.

Die heutigen Hochdurchsatz-Technologien versetzen uns in die Lage, die Patientenspezifischen genetischen und epigenetischen Aberrationen sowie gestörte molekulare Signalwege zu identifizieren. Deren funktionelle Bedeutung zu ergründen, um beispielsweise einen Einblick in die verschiedenen Aspekte der Tumorentstehung, -progression und -metastasierung zu erhalten, kann aber nur mit der Hilfe bioinformatisch geprägter, interdisziplinärer Fächer wie der Systembiologie erreicht werden (Alvarez, Shen, et al., 2016; Krogan, Lippman, et al., 2015; Steinway, Zañudo, et al., 2014; Korf, 2013; Kreeger & Lauffenburger, 2010; Aderem, 2005). Die Einblicke in die grundlegenden

Mechanismen biologischer Funktionsweisen können auf größere Zusammenhänge übertragen werden. So kann die Systembiologie Aussagen über die Rolle von Faktoren innerhalb eines Systems machen und Vorhersagen über den Einfluss von „Störungen“ treffen oder Ansatzpunkte identifizieren, aufgetretene Störungen zu beheben. Zudem können durch geeignete mathematische Modelle die Wirksamkeit von Medikamenten, die Dosis und die Dauer ihrer Anwendung prognostiziert werden (Fassoni, Baldow, et al., 2018; Filipp, 2017; Horn, Glauche, et al., 2013; Korcsmáros, 2013; Glauche, Horn, et al., 2012; Roeder, Horn, et al., 2006).

#### IV.2. Die kombinierte Netzwerkanalyse als Werkzeug für die Identifizierung tumorrelevanter Mechanismen/Signaturen – E2F1 als EMT-induzierender Faktor

Das Erstellen von Signal- und Stoffwechselnetzwerken aus bekannten Interaktionen und die anschließende Analyse der fehlerhaften Signal- oder Stoffflüsse mithilfe von Expressions- oder Mutationsdaten einzelner Patienten stellt heutzutage nicht nur ein wichtiges Hilfsmittel für die Identifizierung der Störungen in Netzwerken dar, sondern gibt gleichzeitig die möglichen Parameter für eine Therapie in die Hand (drug targets, Faktoren verantwortlich für die Immunevasion, etc.) (Jalili, Gebhardt, et al., 2018; W. Zhang, Bojorquez-Gomez, et al., 2018; Barros de Andrade e Sousa, Kühn, et al., 2016; Lubitz, Welkenhuysen, et al., 2015; Matsuoka, Matsumae, et al., 2013; Caron, Ghosh, et al., 2010; Oda, Matsuoka, et al., 2005).

Es gibt verschiedene Methoden, Interaktionsnetzwerke zu erstellen. Die einen stützen sich auf biologische und bioinformatische Datenbanken und Text-mining-Algorithmen, andere ausschließlich auf Literaturrecherche (Lubitz, Welkenhuysen, et al., 2015; Oda, Matsuoka, et al., 2005). Wieder andere erstellen Interaktionsnetzwerke anhand von Expressions-Korrelationsdaten (Dorel, Klinger, et al., 2018; H. Yang, Zhang, et al., 2017; J. Gao, Aksoy, et al., 2013). Ausschlaggebend für die Wahl der Informationsquellen sind zum einen der Zweck des Netzwerkes, zum anderen die Präzision und Qualität der Interaktionen und der handhabbare Umfang des Netzwerkes. Des Weiteren sind auf Text-mining und Korrelationen basierende Netzwerke häufig ungerichtete Graphen, oder

zumindest gilt das für den Anteil an Interaktionen, deren Richtung und Vorzeichen in Datenbanken nicht hinterlegt und mittels Text-mining nicht identifizierbar ist. ChIP-seq-Datenbanken machen zum Beispiel keine Aussage über den Einfluss der Bindung eines TF auf die Aktivität des Zielgenes. Für viele Analysen sind jedoch gerichtete Graphen unumgänglich, so dass hier auf die Literatur zurückgegriffen werden muss. Darüber hinaus sind bestimmte molekulare Vorgänge, posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Azetylierung und Transportvorgänge zwischen Kompartimenten allein durch das Text-mining schwer zu erfassen. Eine weitere Einschränkung von Korrelations-Netzwerken ist, dass sie keine Kausalität abbilden. Hier muss auf zusätzliche Informationen, zum Beispiel über TFBS, zurückgegriffen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde basierend auf Literaturrecherche und unterstützt von biologischen Datenbanken ein Interaktionsnetzwerk um den tumorrelevanten Transkriptionsfaktor E2F1 erstellt. Dieses wurde anschließend im Hinblick auf die an der metastasierungsfördernden Funktion von E2F1 beteiligten Faktoren durch Kooperationspartner des Lehrstuhls für Systembiologie und Bioinformatik der Universität Rostock (Dissertation Faiz M. Khan) auf ein Kernnetzwerk reduziert und dieses daraufhin analysiert. Die Vorhersagen der *in silico*-Simulationen wurden im Anschluss durch zell- und molekularbiologische Experimente und anhand von Patientendaten verifiziert.

E2F1 wurde in den 1990-er Jahren zuerst als Zellzyklusregulator identifiziert, der zu Beginn der G1-Phase zahlreiche Gene für die DNA-Synthese in der S-Phase transaktiviert (Ref.). Daraufgehend wurde gezeigt, dass die erhöhte Expression von E2F1 in gesunden Zellen und frühen Tumorstadien über pro-apoptotische E2F1-Zielgene die Apoptose einleitet (Stiewe & Pützer, 2000). Diese tumorsuppressive Wirkung von E2F1 verhindert eine durch seine proliferative Funktion hervorgerufene unkontrollierte Zellvermehrung. In Tumorzellen höheren Stadiums hingegen scheint die Tumorsuppressorfunktion inhibiert zu werden. Unsere Arbeitsgruppe konnte als erste den funktionellen Nachweis erbringen, dass E2F1 abhängig vom zellulären Kontext über die Aktivierung tumorprogressions-relevanter Gene zur Metastasierung von Melanomzellen führt (Alla, Engelmann, et al., 2010). Viele aktuelle Studien bringen inzwischen E2F1 mit der Ausbildung aggressiver, chemoresistenter Tumoren in Verbindung (Hollern, Swiatnicki, et al., 2019; Andrechek, 2015; Knoll, Fürst, et al., 2014; Meier, Spitschak, et al., 2014; Engelmann, Mayoli-Nüssle, et al., 2013; Alla, Kowtharapu, et al., 2012; Lee, Leem, et al., 2010).

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde gezeigt, dass EMT-auslösende Faktoren und EMT-Marker in humanen Blasen- und Brustkrebszelllinien E2F1-abhängig exprimiert werden (Abb. 10). Überdies wurde anhand von Invasivitäts-Assays nachgewiesen, dass nicht nur die Expression von EMT-Markern mit der von E2F1 korreliert, sondern damit auch das invasive Potential der Zellen (Abb. 8, Abb. 10). Ferner wurde diese Expressionskorrelation durch die Analyse einer großen Zahl von humanen Tumorzelllinien der *CCL*E-Datenbank auf andere Tumorentitäten erweitert (Abb. 9).

Um zu verstehen, durch welche Mechanismen E2F1 vom Tumorsuppressor- zum Onkogen wird, wurde ein auf dem heutigen Wissensstand basierendes umfassendes Protein-Protein- und Protein-Gen-Interaktionsnetzwerk aus transkriptionellen, posttranskriptionellen und posttranslationalen Reaktionen erstellt (Abb. 7 und [https://navicell.curie.fr/pages/maps\\_e2f1.html](https://navicell.curie.fr/pages/maps_e2f1.html)), in dessen Mittelpunkt die verschiedenen Interaktionen von E2F1 stehen. Dieses Netzwerk besteht aus 879 Entitäten (Genen, Proteinen, Komplexen) und 2278 Interaktionen zwischen diesen, welche die E2F1-Regulation auch mit anderen tumorrelevanten Signalwegen verbinden. Dabei wurde durch umfangreiche Literaturrecherche das von Calzone et al. erstellte Netzwerk der Zellzyklusregulation durch die E2F-Familie (Calzone, Gelay, et al., 2008) unter anderem um die Tumorprogressions-relevanten pro- und anti-apoptotischen, angiogenen und EMT-induzierenden Funktionen von E2F1 zu einem etwa dreimal so umfangreichen Interaktionsnetzwerk erweitert (Abb. 7 und 8). Das Netzwerk stellt ein Abbild der bekannten Funktionen und regulatorischen Interaktionen von E2F1 zunächst unabhängig vom zellulären Kontext dar. Anschließend wurde das komplexe Interaktionsnetzwerk im Hinblick auf potentielle BLCA- und BRCA-relevante EMT-Faktoren gefiltert beziehungsweise kondensiert (Doktorarbeit Faiz M. Khan, SBI, Rostock). Dadurch sollten Einblicke in die Regulation von E2F1 selbst erhalten werden sowie in dessen Verknüpfung zu anderen tumorrelevanten Signalwegen.

Dieser Netzwerkanalyse lag eine Kombination aus *i)* Reduktion des Gesamtnetzwerkes zu einem Kernnetzwerk und *ii)* der Booleschen Simulation dieses Kernnetzwerkes zugrunde. Ersteres wurde mithilfe von biologischen und Netzwerk-Parametern erreicht, die evaluiert und gewichtet in eine multiparametrische Funktion einfließen und dadurch die für die jeweilige Tumorentität treibenden Interaktionen herausfilterte. Durch die anschließende

Simulierung des Kernnetzwerkes aus treibenden Interaktionen mithilfe von Booleschen Regeln, wurden die EMT-auslösenden Faktoren identifiziert.

Im weiteren Verlauf meiner Dissertation wurden die auf der von mir generierten E2F1-Map basierenden computergestützten Vorhersagen der Systembiologen experimentell an humanen Tumorzelllinien und anhand von Patientendaten der TCGA-Datenbank validiert. Dabei wurde gezeigt, dass E2F1 zusammen mit den identifizierten tumorspezifischen Signalwegen die Invasivität der verwendeten Zelllinien reguliert. Durch Überexpression von E2F1 und gleichzeitige Stimulation der TGF $\beta$ - und FGFR1- (Blase) beziehungsweise TGF $\beta$ - und EGFR-Signalwege (Brust) in wenig aggressiven Zelllinien konnte deren invasives Potential im Vergleich zur alleinigen Stimulation eines der Signalwege beziehungsweise alleiniger Überexpression von E2F1 maximal gesteigert werden (Abb. 14). Dem entsprechend wurde der größte inhibierende Effekt auf den jeweils aggressiven Zellphänotyp ausgeübt, wenn die komplette Tumor-Signatur gehemmt wurde. Die Invasivität dieser Zelllinien wurde durch kombinierte Inhibition der jeweiligen Signalwege und den Knockdown von E2F1 drastisch reduziert (Abb. 13). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Studien, die hohe E2F1- (Lee, Leem, et al., 2010), TGF $\beta$ R1- (Medici, Hay, & Goodenough, 2006) oder FGFR1-Level (Tomlinson, Baxter, et al., 2012) unabhängig voneinander mit einer gesteigerten Invasivität von Blasentumoren assoziieren. Ebenso weisen Studien an Brustkrebs eine unabhängige Korrelation von hohen E2F1- (Rizwani, Schaal, et al., 2014), TGF $\beta$ R2- (Dhasarathy, Phadke, et al., 2011) beziehungsweise EGFR-Levels (Bhargava, Gerald, et al., 2005) und invasiven Tumorphänotypen nach. Überraschenderweise spielen andere Signalwegrezeptoren der Kernnetzwerke in den beiden untersuchten Entitäten keine signifikante Rolle für die EMT. Vor allem der ebenfalls im Kernnetzwerk des Blasentumors enthaltene EGFR-Signalweg und der FGFR1-Signalweg im Brusttumormodell hatten keinen nennenswerten Einfluss auf die Invasivität der jeweiligen Zelllinien (Abb. 14, Abb. 11). Dass dieser nicht vorhandene Einfluss nicht auf die fehlende Expression der jeweiligen Rezeptoren zurückgeht, konnte durch Western Blots nachgewiesen werden (Abb. 12). Diese Signalwege tragen tumorspezifisch zur Ausbildung der EMT bei, was von einer unterschiedlichen Signalweiterleitung durch die nachgeschalteten Moleküle abhängen kann. Im einen Fall werden durch den molekularen Zustand der Zellen EMT-auslösende Faktoren aktiviert, im anderen nicht.

Die Übertragung dieser Ergebnisse auf den Patienten würde bedeuten, dass sich in E2F1-vermittelten muskelinvasiven Blasen Tumoren gegen EGFR gerichtete Therapien als ineffektiv erweisen müssten. Auch diese Erkenntnisse stehen im Einklang mit klinischen Studien, von denen die Mehrheit keinen nennenswerten Vorteil einer kombinierten Therapie mit zusätzlichen EGFR-RTK-Inhibitoren gegenüber der Standardtherapie nachweisen konnte (Mooso, Vinall, et al., 2015). Aus bisher unbekannten Gründen zeigen sich Patienten mit muskelinvasivem Blasen tumor unter Chemotherapie resistent gegenüber EGFR-Inhibitoren, und das, obwohl in Urothelkarzinomen EGFR exprimiert wird. Das Fehlen von aktivierenden, jedoch RTK-sensitiven Mutationen in den Exonen 19 bis 21 der EGFR-Kinasedomäne in diesen Patienten mag zur Resistenz gegenüber EGFR-Inhibitoren beitragen (Chaux, Cohen, et al., 2012). FGFR1-Mutationen treten hingegen häufig im Blasenkrebs auf und haben die rasche Progression dieser Erkrankung zur Folge (Helsten, Elkin, et al., 2016). In vorklinischen Studien sprechen diese Patienten jedoch in der Regel gut auf FGFR-Inhibitoren an (Guagnano, Kauffmann, et al., 2012).

Auf der anderen Seite ist bekannt, dass der FGFR-Signalweg die normale Entwicklung der Brustdrüsen reguliert und die Überexpression von FGFR1 mit der Progression von Brustkrebs einhergeht (Jang, Kim, et al., 2012). Eine jüngere Studie mit einem vorklinischen Brusttumormodell zeigte, dass eine FGFR1-Inhibitor-Behandlung zuerst zur raschen Regression des Tumors führt, es aber schließlich zum Auftreten von Rezidiven kommt (Holdman, Welte, et al., 2015). Diese Rezidive zeigten erhöhte EGFR-Level, die die FGFR1-Inhibition kompensierten. Aufgrund der sehr heterogenen Natur von Mammatumoren ist es vorstellbar, dass FGFR-Inhibitoren nur in bestimmten Patientenpopulationen einen nachhaltigen Effekt zeigen. Es bleibt außerdem abzuwarten, in welchem Maße FGFR-Inhibitoren die Behandlung von metastasierenden Mammakarzinomen verbessern kann (Katoh & Nakagama, 2014).

In jedem Fall unterstützen die hier gewonnenen Erkenntnisse das Vorgehen, Patienten anhand von molekularen Markern zu klassifizieren und sie unterschiedlichen Therapieansätzen zuzuordnen, um dadurch den Therapieerfolg zu verbessern und das Auftreten von Therapie-Resistenzen und -Nebenwirkungen zu minimieren.

Dass auch die Kombination aus den jeweils identifizierten Faktoren (die sogenannte molekulare Signatur aus E2F1, TGF $\beta$ R1/2 und EGFR beziehungsweise FGFR1) eine Aussage über die Prognose von Patienten zulässt, wurde anhand von Patientendaten des TCGA-

Atlas gezeigt. Die bekannten EMT-Marker sind in Patienten mit hoher Expression der jeweiligen Signatur entsprechend höher exprimiert als in Patienten mit niedrig exprimierter Signatur (Abb. 18). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die beiden Signaturen Patienten gut in frühe beziehungsweise fortgeschrittene Tumorstadien klassifizieren können. Ein Vergleich mit 30 zufälligen Signaturen zeigte die dominante Performanz der identifizierten Signaturen (Abb. 17).

Durch den Doppelknockdown von SMAD3 und NF $\kappa$ B in aggressiven UMUC3-Zellen wurde ein epithelialer Phänotyp induziert und dementsprechend das invasive Potential dieser Zelllinie drastisch reduziert (Abb. 15, 16). In Abbildung 15 ist ebenfalls zu erkennen, dass die Depletion von NF $\kappa$ B auch ein verringertes SMAD3-Level in den UMUC3-Zellen nach sich zieht. Das lässt auf ein enges Zusammenspiel zwischen dem kanonischen TGF $\beta$ -Signalweg und NF $\kappa$ B im Hinblick auf das Zytoskelett- und die Organisation von Zell-Zell-Kontakten und die Aggressivität dieser Zelllinie schließen. In der Tat ist bekannt, dass TGF $\beta$  über CDC42, Rac1 und RhoA Einfluss auf die Zell-Zell-Kontakte hat (Derynck, Muthusamy, & Saeteurn, 2014). Es gibt jedoch unterschiedliche Ergebnisse dazu, ob dies über den kanonischen Signalweg vermittelt und somit SMAD-anhängig ist (Ooshima, Park, & Kim, 2019; Sader, Denis, et al., 2019; Feldkoren, Hutchinson, et al., 2017; Q. Chen, Yang, et al., 2017; Cicchini, Laudadio, et al., 2008). Zudem könnte dieses Zusammenspiel gewebespezifisch sein und vom zellulären Kontext abhängen. Die Interaktion des TGF $\beta$ -Signalweges mit NF $\kappa$ B wurde bereits beschrieben (Huber, Azoitei, et al., 2004). Zudem ist TGF $\beta$  ein Zielgen von NF $\kappa$ B und beide Signalwege induzieren zum Teil dieselben EMT-Marker (Min, Eddy, et al., 2008; Chua, Bhat-Nakshatri, et al., 2007).

Obwohl durch Doppelknockdown von SRC und FN1 die Invasivität der aggressiven MDA-MB231-Zellen in gleichem Ausmaß reduziert wurde, ging dieser Effekt nicht einher mit einer epithelialen Zellmorphologie. Das zeigt, dass neben der Morphologie und dem Zytoskelett, die beide die gerichtete Zellmotilität beeinflussen, auch andere Mechanismen bei der EMT eine Rolle spielen, zum Beispiel die zuvor erwähnte Anoikis-Resistenz und die Sekretion von Matrix-verdauenden Enzymen. Es ist anzunehmen, dass eher solche Prozesse durch den Doppelknockdown von SRC und FN1 supprimiert wurden.



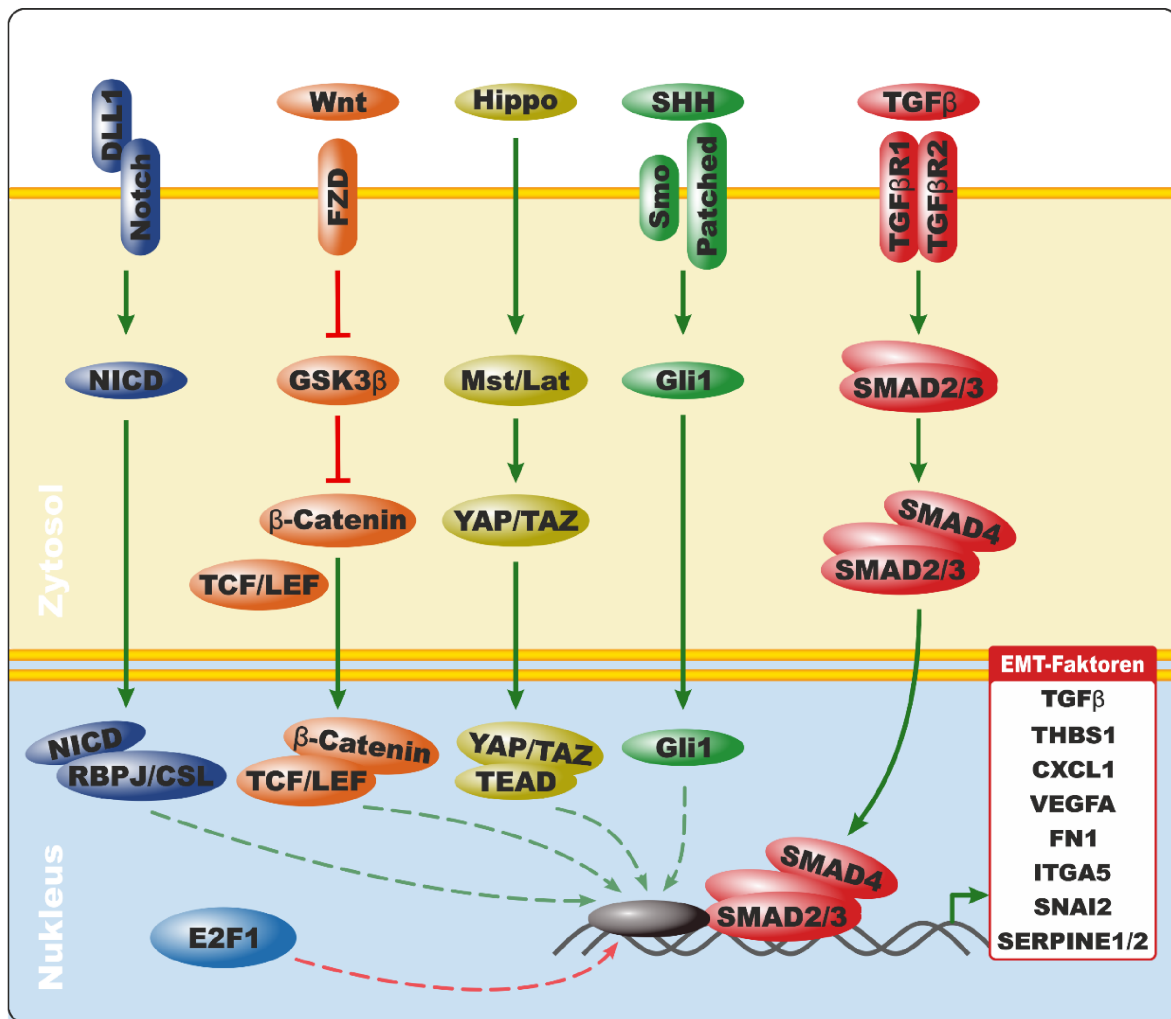
### IV.3. TGFβ als EMT-induzierender Faktor

In den 1980-er Jahren waren Forscher sehr erstaunt über die vielen verschiedenen, sogar mitunter widersprüchlichen Effekte des Zytokins TGFβ in verschiedenen Zellmodellen. Die Reaktionen der Zellen auf ein und denselben Faktor waren stark kontextabhängig, reichten von Proliferation und Zellzyklus-Arrest über die Zelldifferenzierung bis hin zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz und der Regeneration von Stammzellen (Gómez Tejeda Zañudo, Guinn, et al., 2019; Sader, Denis, et al., 2019; Lucarelli, Schilling, et al., 2018; Tsubakihara & Moustakas, 2018; Zarzynska, 2014; Joan Massagué, 2000, 2012; Siegel & Massagué, 2003). Umso verwunderlicher ist die relative Einfachheit des kanonischen TGFβ-Signalweges. Seitdem gilt es herauszufinden, wie der molekulare Kontext die zelluläre Antwort auf TGFβ bestimmt. Ein ähnlich umfangreiches Portfolio an kontextabhängigen, zuweilen antagonistischen Funktionen wurde hier bereits für E2F1 beschrieben. Beide Faktoren sind in der Lage, je nach molekularem Kontext zahlreiche verschiedene Zielgene zu aktivieren beziehungsweise zu hemmen. E2F1 reguliert seine Zielgene in der Regel direkt, während TGFβ diese indirekt über SMAD2-4, aber auch über nicht-kanonische Signalwege beeinflusst (Sader, Denis, et al., 2019).

Der kanonische Signalweg beinhaltet die Phosphorylierung von SMAD2/3 über den aktivierten Transforming Growth Factor Beta Receptor 1 (TGFβR1), die einzige bekannte Ser/Thr-Kinase auf der Zelloberfläche, der mit dem TGFβ-bindenden Rezeptor 2 assoziiert sein muss. Die aktiven SMAD2 und -3 heterodimerisieren miteinander, binden daraufhin SMAD4 und werden in den Zellkern transportiert, wo sie an ihre Zielgene binden. Für die SMAD-Proteine ist allerdings bekannt, dass ihre DNA-Bindungsaffinität zu gering ist, um ihre Zielgene effektiv zu transaktivieren (J Massagué & Wotton, 2000). Entweder sind viele SMAD-responsive Elemente (SRE) im Promotor notwendig oder Kofaktoren ermöglichen eine stärkere Bindung. Wenn die bloße Bindung von SMAD-Proteinen an Zielstrukturen hinreichend für deren Aktivierung wäre, würden unselektiv hunderte Gene und dutzende antagonistische zelluläre Reaktionen aktiviert, was so nicht beobachtet wurde. Eine teilweise, wenn auch nicht umfassende Erklärung hierfür ist der zelluläre Chromatinstatus, der bedingt, ob ein TF an sein Zielgen binden kann oder nicht. Die Zahl der Zielgene variiert dadurch je nach Zelltyp stark. In pluripotenten Stammzellen sind es einige wenige zugängliche, in differenzierten Zellen viele hundert oder tausend, während

bei letzteren zum Beispiel Gene der Selbsterneuerung epigenetisch stillgelegt sind und nicht aktiviert werden können. Auch der Effekt des TGF $\beta$ -Signalweges auf seine Zielgene (Aktivierung versus Suppression) hängt vom jeweiligen Zelltyp ab, was für eine Regulation durch Kofaktoren spricht. Von Interesse hinsichtlich der funktionellen Übereinstimmung zwischen TGF $\beta$  und E2F1 sind nicht zuletzt die Befunde darüber, dass E2F1 zahlreiche seiner Kofaktoren in Feedforward-Loops aktiviert (Goody, Gupta, et al., 2019; Meier, Spitschak, et al., 2014; Engelmann, Mayoli-Nüssle, et al., 2013; Alla, Engelmann, et al., 2010). Dies legt nahe, dass diese Kofaktoren Einfluss auf die Zielgenspezifität von E2F1 haben können (Y. Wang, Alla, et al., 2016).

Ähnlich wie E2F1 agiert TGF $\beta$  in normalen Zellen und frühen Tumorstadien als Tumorsuppressor, in späten Stadien wird der TGF $\beta$ -Signalweg von der Zelle „onkogen“ umgedeutet (Gómez Tejeda Zañudo, Guinn, et al., 2019; Hao, Baker, et al., 2019; Ooshima, Park, & Kim, 2019; Tsubakihara & Moustakas, 2018; Derynck, Muthusamy, & Saeteurn, 2014; J. Xu, Lamouille, & Derynck, 2009). In das Tumormikromilieu sekretiertes TGF $\beta$  beeinflusst die Tumorprogression und die Immunantwort, wobei Patienten mit hohem TGF $\beta$ -Level eine über alle 33 in TCGA-PANCAN erfassten Tumorentitäten gemittelte schlechtere Überlebensprognose haben (nicht gezeigt). Wahrscheinlich ist in diesem Zusammenhang auch das Zusammenspiel mit anderen potentiell onkogenen Signalwegen ausschlaggebend (J. Zhang, Tian, et al., 2018; Medici, Hay, & Goodenough, 2006).



**Abbildung 21: Mit dem kanonischen TGFβ-Signalweg interagierende Signalwege**

Die SMAD-Komplexe interagieren an ihren Zielgenen mit zahlreichen Transkriptionsfaktoren (TF) und Kofaktoren verschiedener Signalkaskaden. Dargestellt sind einige mit dem TGFβ-Signalweg interagierende, EMT-induzierende Signalwege. Bei einem dieser Signalwege handelt es sich, wie die Ergebnisse dieser Arbeit gezeigt haben, um E2F1, das zusammen mit SMAD2-4 die beispielhaft dargestellten EMT-Faktoren transaktiviert. Abbildung nach (Derynck, Muthusamy, & Saeteurn, 2014).

#### IV.4. Das Koregulom zweier potentieller Onkogene

Wie beschrieben, können zahlreiche Signalwege, wie der von E2F1 oder TGFβ, unabhängig voneinander die Epithelial-Mesenchymale Transition und dadurch invasives Tumorstadium induzieren. Der in **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** beobachtete kooperative Einfluss beider Faktoren auf den Prozess der EMT, sowohl im Blasen- als auch im Brustkrebsmodell (Abb. 13, 14), wurde mit Hilfe

bioinformatischer Analysen von Datenbanken aus Hochdurchsatz-Experimenten wie Microarrays, ChIP-seq- und Patienten-Expressionsdaten und *in silico*-Analysen untersucht. Als Ergebnis dieser Analysen wurden metastasierungsrelevante Faktoren identifiziert, die a) bei Patienten Prognosefaktoren darstellen, b) Einfluss auf die Überlebenserwartung haben und c) deren Aktivität sowohl von E2F1 als auch von TGFβ reguliert wird. Diese gemeinsamen Zielgene (das sogenannte Koregulom) haben in BLCA- und BRCA-Patienten zuweilen unterschiedlichen Einfluss auf das Überleben: Von den insgesamt 73 Genen (19 in BLCA und 57 in BRCA), die Einfluss auf die Überlebensprognose haben, sind beiden Entitäten nur drei gemeinsam: DNAJB4, PJA2 und THAP7. Diese haben jeweils den gleichen Effekt auf die Überlebensprognose (Abb. 20). Es gibt jedoch auch Zielgene von E2F1, die zwischen den Tumorentitäten einen gegenteiligen Effekt aufweisen, wie zum Beispiel ABCB6, KCNE1, RNF144A oder STX6. Das weist auf einen möglichen Erklärungsansatz hin, warum in den beiden verwendeten Tumormodellen ein und derselbe Signalweg verschiedene Effekte hervorruft. Zudem haben unterschiedliche Signalwege, mit denen TGFβ und E2F1 interagieren, in verschiedenen Tumorentitäten unterschiedliche Effekte auf die Zellen (Y. Zhao, Zhu, et al., 2019; J. Zhang, Tian, et al., 2018; Derynck, Muthusamy, & Saeteurn, 2014). Sowohl eigene ChIP-seq-Daten (unveröffentlicht) als auch Daten der TRANSFAC-Datenbank weisen darauf hin, dass Promotoren durch die Bindung vieler verschiedener Transkriptionsfaktoren eine wahrscheinlich gleichermaßen sensible wie robuste Schaltstelle für kombinierte Signale aus Signalwegkaskaden darstellen und dadurch sehr individuell vom molekularen Kontext der Zelle gesteuert werden.

In dieser Arbeit wurden zahlreiche, für die Überlebensprognose von Patienten relevante potentielle Zielgene von E2F1 und von TGFβ identifiziert (Tabelle 6, Anhang). Dabei münden der E2F1- und der TGFβ-Signalweg nicht nur unabhängig voneinander in denselben EMT-induzierenden Faktoren (Abb. 21), sondern es gibt Zielgene von E2F1, die den TGFβ-Signalweg und dessen Downstream-Effekte direkt beeinflussen und umgekehrt beeinflusst TGFβ die Expression von E2F1-Zielgenen. (Abb. 21). Während TGFβ durch Sekretion das Tumormikromilieu direkt beeinflussen kann, tut E2F1 dies über zahlreiche seiner Zielgene, unter denen auch sekretierte Faktoren wie Wachstumsfaktoren und Zytokine sowie Rezeptoren sind (Tabelle 6, Anhang) (Engelmann, Mayoli-Nüssle, et al., 2013).

Übereinstimmend mit unseren vorherigen Ergebnissen, die auf die gemeinsame Funktion von E2F1- und dem TGF $\beta$ -Signaling hinwiesen, haben die Ergebnisse dieser Arbeit gezeigt, dass beide Signalwege bei der Regulation EMT-relevanter Gene kooperieren.

Während in der vorliegenden Doktorarbeit das Augenmerk auf EMT-relevante Gene gerichtet war, gibt es andere interessante Signalwege und potentielle Kofaktoren von E2F1. Zum Beispiel lassen aktuelle Arbeiten bereits auf eine Rolle von E2F1 in der Immunregulation schließen. Hierzu sollen weitergehende Untersuchungen folgen.

## Ausblick

Von vorrangigem Interesse wäre es zu klären, welche strukturellen Eigenschaften der Zielgenpromotoren ausschlaggebend für eine differentielle Regulation durch E2F1 sind. Die dargestellten Ergebnisse, dass der Transkriptionsfaktor-Komplex SMAD2-4 viele Zielgene zusammen mit E2F1 reguliert sowie weitere Hinweise auf die kofaktorabhängige Spezifität von E2F1, sollten eine Promotoranalyse nach sich ziehen, um nach Unterschieden in den TFBS von möglichen Kofaktoren zwischen Genen mit positivem beziehungsweise negativem Einfluss auf die Überlebensprognose zu suchen. Dafür bieten sich machine learning Algorithmen wie zum Beispiel random forest an. Dem sollte eine umfassende Analyse der ChIP-seq-BS dieser Gene als Variablen für den random forest-Algorithmus vorausgehen (H. Qin, Chan, et al., 2009). Auf diese Weise wird es möglich, diejenigen Kofaktoren zu identifizieren, die zusammen mit E2F1 prognostische oder therapeutische Biomarker regulieren.

Des Weiteren würde eine tiefergehende Analyse der Patientendaten Aufschluss über die Beteiligung anderer Transkriptionsfaktoren und möglicher Kofaktoren von E2F1 auf die Regulation der identifizierten Zielgene geben. Unterteilt man zum Beispiel die Patienten in Subpopulationen nach schlechterer und besserer Überlebensprognose, registriert man zwischen den Populationen einen „Expressions-Korrelations-Shift“ bei einigen der E2F1-abhängigen Risikogene. Dieser Shift in der Abhängigkeit der Zielgene von E2F1 kann zum einen epigenetische Ursachen haben, zum anderen auch durch die differentielle Expression von weiteren an der Expression beteiligten Transkriptionsfaktoren und E2F1-Kofaktoren zu erklären sein (Goody, Gupta, et al., 2019).

## IV.5. Zusammenfassung

Die Behandlung von Patienten mit invasiv wachsenden oder bereits metastasierten Tumoren stellt die Krebstherapie vor besondere Herausforderungen. Ein Schlüsselfaktor für diese Prozesse ist der Transkriptionsfaktor E2F1, der diese Vorgänge über eine Vielzahl von Zielgenen und Interaktion dieser Genprodukte mit zellulären Signalwegen vermittelt. Im Zusammenhang mit dem jeweiligen zellulären Kontext resultieren daraus hoch komplexe Regulationsmechanismen, deren Aufklärung Ansätze für klinisch relevante Therapien eröffnet.

In der vorliegenden Arbeit wurde durch intensive Literatur- und Datenbankrecherche eine Übersichtskarte der bekannten Interaktionen von E2F1 zu dessen Regulatoren, Kofaktoren und Zielgenen erarbeitet, um dessen stark ambivalente Aktivitäten innerhalb der Zelle besser zu verstehen. Die in der Literatur beschriebenen Protein-Protein- und Protein-Gen-Interaktionen sowie posttranslationalen Modifikationen wurden in einem umfassenden Netzwerk aus 879 Knoten (Genen, miRNAs, Proteinen und Komplexen) mit 2278 Interaktionen festgehalten, welches die Grundlage für eine anschließende bioinformatische Analyse darstellte. Mithilfe systembiologischer Parameter sowie klinisch-molekularer Daten wurden in einem Blasen- und einem Brustkrebsmodell tumorspezifische Signaturen der E2F1-vermittelten EMT identifiziert. Diese Signaturen wurden anschließend sowohl experimentell als auch anhand von Patientendaten validiert.

Im Anschluss an die Identifikation der molekularen Signaturen wurde durch bioinformatische Analysen und Datenbank-Recherche das Interaktom von E2F1 und TGF $\beta$ , zweier Signatur-Faktoren, charakterisiert, um einen mechanistischen Einblick in deren Zusammenspiel zu erhalten. Das Interaktom umfasst zahlreiche EMT-relevante Gene, die signifikanten Einfluss auf die Überlebensprognose von Krebspatienten haben. Diese Faktoren stellen Angriffspunkte für eine Kombinations-Therapie von Patienten mit aberranten TGF $\beta$ - und E2F1-Signalwegen dar. Sie kommen auch als Tumormarker in Betracht, um der Metastasierung in einem frühen Stadium zu begegnen oder ihr zuvorzukommen.

## Referenzen

- Aderem, A. (2005). Systems biology: its practice and challenges. *Cell*, 121(4), 511–513. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.04.020>
- Afgan, E., Baker, D., Batut, B., van den Beek, M., Bouvier, D., Cech, M., ... Blankenberg, D. (2018). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W537–W544. <https://doi.org/10.1093/nar/gky379>
- Agliano, A., Calvo, A., & Box, C. (2017). The challenge of targeting cancer stem cells to halt metastasis. *Seminars in Cancer Biology*, 44, 25–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28323021>
- Akberdin, I. R., Omelyanchuk, N. A., Fadeev, S. I., Leskova, N. E., Oschepkova, E. A., Kazantsev, F. V., ... Kolchanov, N. A. (2018). Pluripotency gene network dynamics: System views from parametric analysis. *PloS One*, 13(3), e0194464. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194464>
- Alipour, M., Nabavi, S. M., Arab, L., Vosough, M., Pakdaman, H., Ehsani, E., & Shahpasand, K. (2018). Stem cell therapy in Alzheimer's disease: possible benefits and limiting drawbacks. *Molecular Biology Reports*, 1–22. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4499-7>
- Alla, V., Engelmann, D., Niemetz, A., Pahnke, J., Schmidt, A., Kunz, M., ... Pützer, B. M. (2010). E2F1 in Melanoma Progression and Metastasis. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 102(2), 127–133. <https://doi.org/10.1093/jnci/djp458>
- Alla, V., Kowtharapu, B. S., Engelmann, D., Emmrich, S., Schmitz, U., Steder, M., & Pützer, B. M. (2012). E2F1 confers anticancer drug resistance by targeting ABC transporter family members and Bcl-2 via the p73/DNp73-miR-205 circuitry. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 11(16), 3067–3078. <https://doi.org/10.4161/cc.21476>
- Alon, U. (2007). Network motifs: theory and experimental approaches. *Nature Reviews Genetics*, 8(6), 450–461. <https://doi.org/10.1038/nrg2102>
- Alvarez, M. J., Shen, Y., Giorgi, F. M., Lachmann, A., Ding, B. B., Ye, B. H., & Califano, A. (2016). Functional characterization of somatic mutations in cancer using network-based inference of protein activity. *Nature Genetics*, 48(8), 838–847. <https://doi.org/10.1038/ng.3593>
- An, J.-Y., Lin, K., Zhu, L., Werling, D. M., Dong, S., Brand, H., ... Sanders, S. J. (2018). Genome-wide de novo risk score implicates promoter variation in autism spectrum disorder. *Science (New York, N.Y.)*, 362(6420), eaat6576. <https://doi.org/10.1126/science.aat6576>
- Andrechek, E. R. (2015). HER2/Neu tumorigenesis and metastasis is regulated by E2F activator transcription factors. *Oncogene*, 34(2), 217–225. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.540>
- Aranda, B., Blankenburg, H., Kerrien, S., Brinkman, F. S. L., Ceol, A., Chautard, E., ... Hermjakob, H. (2011). PSICQUIC and PSIScore: accessing and scoring molecular interactions. *Nature Methods*, 8(7), 528–529. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1637>
- Armitage, P., & Doll, R. (1954). The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. *British Journal of Cancer*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1093/ije/dyh216>
- Barros de Andrade e Sousa, L. C., Kühn, C., Tyc, K. M., & Klipp, E. (2016). Dosage and Dose Schedule Screening of Drug Combinations in Agent-Based Models Reveals Hidden Synergies. *Frontiers in Physiology*, 6, 398. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00398>
- Batai, K., Imler, E., Pangilinan, J., Bell, R., Lwin, A., Price, E., ... Lee, B. R. (2018). Whole-transcriptome sequencing identified gene expression signatures associated with aggressive

- clear cell renal cell carcinoma. *Genes & Cancer*, 9(5–6), 247–256.  
<https://doi.org/10.18632/genesandcancer.183>
- Beadle, G. W., & Tatum, E. L. (1941). Genetic Control of Biochemical Reactions in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 27(11), 499–506. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16588492>
- Bhargava, R., Gerald, W. L., Li, A. R., Pan, Q., Lal, P., Ladanyi, M., & Chen, B. (2005). EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. *Modern Pathology*, 18(8), 1027–1033. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800438>
- Bieda, M., Xu, X., Singer, M. A., Green, R., & Farnham, P. J. (2006). Unbiased location analysis of E2F1-binding sites suggests a widespread role for E2F1 in the human genome. *Genome Research*, 16(5), 595–605. <https://doi.org/10.1101/gr.4887606>
- Binder, B., & Heinrich, R. (2002). Dynamic stability of signal transduction networks depending on downstream and upstream specificity of protein kinases. *Molecular Biology Reports*, 29(1–2), 51–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12241074>
- Biswas, A. K., & Johnson, D. G. (2012). Transcriptional and nontranscriptional functions of E2F1 in response to DNA damage. *Cancer Research*, 72(1), 13–17. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2196>
- Blennow, K., de Leon, M. J., & Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. *Lancet (London, England)*, 368(9533), 387–403. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69113-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69113-7)
- Boward, B., Wu, T., & Dalton, S. (2016). Concise Review: Control of Cell Fate Through Cell Cycle and Pluripotency Networks. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 34(6), 1427–1436.  
<https://doi.org/10.1002/stem.2345>
- Brennan, P., Babbage, J. W., Burgering, B. M., Groner, B., Reif, K., & Cantrell, D. A. (1997). Phosphatidylinositol 3-kinase couples the interleukin-2 receptor to the cell cycle regulator E2F. *Immunity*, 7(5), 679–689. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80388-X](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80388-X)
- Buchkovich, K., Duffy, L. A., & Harlow, E. (1989). The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell*, 58(6), 1097–1105. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2673543>
- Calzone, L., Gelay, A., Zinovyev, A., Radvanyi, F., & Barillot, E. (2008). A comprehensive modular map of molecular interactions in RB/E2F pathway. *Molecular Systems Biology*, 4, 173.  
<https://doi.org/10.1038/msb.2008.7>
- Cao, A. R., Rabinovich, R., Xu, M., Xu, X., Jin, V. X., & Farnham, P. J. (2011). Genome-wide analysis of transcription factor E2F1 mutant proteins reveals that N- and C-terminal protein interaction domains do not participate in targeting E2F1 to the human genome. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(14), 11985–11996. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.217158>
- Caron, E., Ghosh, S., Matsuoka, Y., Ashton-Beaucage, D., Therrien, M., Lemieux, S., ... Kitano, H. (2010). A comprehensive map of the mTOR signaling network. *Molecular Systems Biology*, 6, 453. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.108>
- Cartwright, P., Müller, H., Wagener, C., Holm, K., & Helin, K. (1998). E2F-6: a novel member of the E2F family is an inhibitor of E2F-dependent transcription. *Oncogene*, 17(5), 611–623.  
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201975>
- Castillo, D. S., Campalans, A., Belluscio, L. M., Carcagno, A. L., Radicella, J. P., Cánepa, E. T., & Pregi, N. (2015). E2F1 and E2F2 induction in response to DNA damage preserves genomic



- stability in neuronal cells. *Cell Cycle*, 14(8), 1300–1314.  
<https://doi.org/10.4161/15384101.2014.985031>
- Chakraborty, S., Hosen, M. I., Ahmed, M., & Shekhar, H. U. (2018). Onco-Multi-OMICS Approach: A New Frontier in Cancer Research. *BioMed Research International*, 2018, 9836256.  
<https://doi.org/10.1155/2018/9836256>
- Chaux, A., Cohen, J. S., Schultz, L., Albadine, R., Jadallah, S., Murphy, K. M., ... Netto, G. J. (2012). High epidermal growth factor receptor immunohistochemical expression in urothelial carcinoma of the bladder is not associated with EGFR mutations in exons 19 and 21: a study using formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissues. *Human Pathology*, 43(10), 1590–1595. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2011.11.016>
- Chellappan, S. P., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J. M., & Nevins, J. R. (1991). The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell*, 65(6), 1053–1061.  
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90557-F](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90557-F)
- Chen, H.-Z., Tsai, S.-Y., & Leone, G. (2009). Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nature Reviews Cancer*, 9(11), 785–797. <https://doi.org/10.1038/nrc2696>
- Chen, Jiaoe, Gong, C., Mao, H., Li, Z., Fang, Z., Chen, Q., ... Li, H. (2018). E2F1/SP3/STAT6 axis is required for IL-4-induced epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer cells. *International Journal of Oncology*, 53(2), 567–578. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4429>
- Chen, Jie, Zhu, F., Weeks, R. L., Biswas, A. K., Guo, R., Li, Y., & Johnson, D. G. (2011). E2F1 promotes the recruitment of DNA repair factors to sites of DNA double-strand breaks. *Cell Cycle*, 10(8), 1287–1294. <https://doi.org/10.4161/cc.10.8.15341>
- Chen, M., Capps, C., Willerson, J. T., & Zoldhelyi, P. (2002). E2F-1 regulates nuclear factor-kappaB activity and cell adhesion: potential antiinflammatory activity of the transcription factor E2F-1. *Circulation*, 106(21), 2707–2713. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12438297>
- Chen, Q., Yang, W., Wang, X., Li, X., Qi, S., Zhang, Y., & Gao, M.-Q. (2017). TGF- $\beta$ 1 Induces EMT in Bovine Mammary Epithelial Cells Through the TGF $\beta$ 1/Smad Signaling Pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 43(1), 82–93. <https://doi.org/10.1159/000480321>
- Chen, Xi, Xu, H., Yuan, P., Fang, F., Huss, M., Vega, V. B., ... Ng, H.-H. (2008). Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell*, 133(6), 1106–1117. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.043>
- Chen, Xiaoji, Chang, C.-W., Spoerke, J. M., Yoh, K., Kapoor, V., Baudo, C. D., ... Lackner, M. R. (2019). Low-Pass Whole-Genome Sequencing of Circulating Cell-Free DNA Demonstrates Dynamic Changes in Genomic Copy Number in a Squamous Lung Cancer Clinical Cohort. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, clincanres.1593.2018. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1593>
- Chong, J.-L., Wenzel, P. L., Sáenz-Robles, M. T., Nair, V., Ferrey, A., Hagan, J. P., ... Leone, G. (2009). E2f1–3 switch from activators in progenitor cells to repressors in differentiating cells. *Nature*, 462(7275), 930–934. <https://doi.org/10.1038/nature08677>
- Chua, H. L., Bhat-Nakshatri, P., Clare, S. E., Morimiya, A., Badve, S., & Nakshatri, H. (2007). NF- $\kappa$ B represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2. *Oncogene*, 26(5), 711–724. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209808>
- Cicchini, C., Laudadio, I., Citarella, F., Corazzari, M., Steindler, C., Conigliaro, A., ... Tripodi, M. (2008). TGF $\beta$ -induced EMT requires focal adhesion kinase (FAK) signaling. *Experimental Cell*

- Research*, 314(1), 143–152. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2007.09.005>
- Collins, F. S., Morgan, M., & Patrinos, A. (2003). The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5617), 286–290. <https://doi.org/10.1126/science.1084564>
- Davidson, J. M., & Duronio, R. J. (2012). S phase-coupled E2f1 destruction ensures homeostasis in proliferating tissues. *PLoS Genetics*, 8(8), e1002831. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002831>
- de Bruin, A., Maiti, B., Jakoi, L., Timmers, C., Buerki, R., & Leone, G. (2003). Identification and Characterization of E2F7, a Novel Mammalian E2F Family Member Capable of Blocking Cellular Proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(43), 42041–42049. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308105200>
- de Hijas-Liste, G. M., Klipp, E., Balsa-Canto, E., & Banga, J. R. (2014). Global dynamic optimization approach to predict activation in metabolic pathways. *BMC Systems Biology*, 8(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-8-1>
- De Smedt, E., Lui, H., Maes, K., De Veirman, K., Menu, E., Vanderkerken, K., & De Bruyne, E. (2018). The Epigenome in Multiple Myeloma: Impact on Tumor Cell Plasticity and Drug Response. *Frontiers in Oncology*, 8, 566. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00566>
- DeGregori, J., & Johnson, D. (2006). Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis. *Current Molecular Medicine*, 6(7), 739–748. <https://doi.org/10.2174/1566524010606070739>
- Denechaud, P.-D., Fajas, L., & Giralt, A. (2017). E2F1, a Novel Regulator of Metabolism. *Frontiers in Endocrinology*, 8, 311. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00311>
- Denechaud, P.-D., Lopez-Mejia, I. C., & Fajas, L. (2016). Contrôle de l'homéostasie glucido-lipidique par les facteurs du cycle cellulaire CDK4 et E2F1. *Médecine/Sciences*, 32(10), 815–818. <https://doi.org/10.1051/medsci/20163210008>
- Denechaud, P.-D., Lopez-Mejia, I. C., Giralt, A., Lai, Q., Blanchet, E., Delacuisine, B., ... Fajas, L. (2016). E2F1 mediates sustained lipogenesis and contributes to hepatic steatosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(1), 137–150. <https://doi.org/10.1172/JCI81542>
- Derynck, R., Muthusamy, B. P., & Saeteurn, K. Y. (2014). Signaling pathway cooperation in TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition. *Current Opinion in Cell Biology*, 31, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.09.001>
- Desmedt, C., Piette, F., Loi, S., Wang, Y., Lallemand, F., Haibe-Kains, B., ... TRANSBIG Consortium. (2007). Strong Time Dependence of the 76-Gene Prognostic Signature for Node-Negative Breast Cancer Patients in the TRANSBIG Multicenter Independent Validation Series. *Clinical Cancer Research*, 13(11), 3207–3214. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2765>
- Dhasarathy, A., Phadke, D., Mav, D., Shah, R. R., & Wade, P. A. (2011). The transcription factors Snail and Slug activate the transforming growth factor-beta signaling pathway in breast cancer. *PloS One*, 6(10), e26514. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026514>
- Di Stefano, L., Jensen, M. R., & Helin, K. (2003). E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes. *The EMBO Journal*, 22(23), 6289–6298. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg613>
- Dorel, M., Klinger, B., Gross, T., Sieber, A., Prahallad, A., Bosdriesz, E., ... Blüthgen, N. (2018). Modelling signalling networks from perturbation data. *Bioinformatics*, 34(23), 4079–4086. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty473>

- Dreyer, F. S., Cantone, M., Eberhardt, M., Jaitly, T., Walter, L., Wittmann, J., ... Vera, J. (2018). A web platform for the network analysis of high-throughput data in melanoma and its use to investigate mechanisms of resistance to anti-PD1 immunotherapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1864(6), 2315–2328. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2018.01.020>
- Dubrez, L. (2017). Regulation of E2F1 Transcription Factor by Ubiquitin Conjugation. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), 2188. <https://doi.org/10.3390/ijms18102188>
- Ebenhöh, O., & Heinrich, R. (2001). Evolutionary Optimization of Metabolic Pathways. Theoretical Reconstruction of the Stoichiometry of ATP and NADH Producing Systems. *Bulletin of Mathematical Biology*, 63(1), 21–55. <https://doi.org/10.1006/bulm.2000.0197>
- Ebenhöh, O., & Heinrich, R. (2003). Stoichiometric Design of Metabolic Networks: Multifunctionality, Clusters, Optimization, Weak and Strong Robustness. *Bulletin of Mathematical Biology*, 65(2), 323–357. [https://doi.org/10.1016/S0092-8240\(03\)00002-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8240(03)00002-8)
- Eddy, S. R. (1999). Noncoding RNA genes. *Current Opinion in Genetics & Development*, 9(6), 695–699. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(99\)00022-2](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(99)00022-2)
- Engelmann, D., Knoll, S., Ewerth, D., Steder, M., Stoll, A., & Pützer, B. M. (2010). Functional interplay between E2F1 and chemotherapeutic drugs defines immediate E2F1 target genes crucial for cancer cell death. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(6), 931–948. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0222-0>
- Engelmann, D., Mayoli-Nüssle, D., Mayrhofer, C., Fürst, K., Alla, V., Stoll, A., ... Pützer, B. M. (2013). E2F1 promotes angiogenesis through the VEGF-C/VEGFR-3 axis in a feedback loop for cooperative induction of PDGF-B. *Journal of Molecular Cell Biology*, 5(6), 391–403. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjt035>
- Engelmann, D., & Pützer, B. M. (2010). Translating DNA damage into cancer cell death—A roadmap for E2F1 apoptotic signalling and opportunities for new drug combinations to overcome chemoresistance. *Drug Resistance Updates*, 13(4–5), 119–131. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2010.06.001>
- Engelmann, D., & Pützer, B. M. (2012). The dark side of E2F1: in transit beyond apoptosis. *Cancer Research*, 72(3), 571–575. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2575>
- Ertosun, M. G., Hapil, F. Z., & Osman Nidai, O. (2016). E2F1 transcription factor and its impact on growth factor and cytokine signaling. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 31, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2016.02.001>
- Fassoni, A. C., Baldow, C., Roeder, I., & Glauche, I. (2018). Reduced tyrosine kinase inhibitor dose is predicted to be as effective as standard dose in chronic myeloid leukemia: a simulation study based on phase III trial data. *Haematologica*, 103(11), 1825–1834. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.194522>
- Feldkoren, B., Hutchinson, R., Rapoport, Y., Mahajan, A., & Margulis, V. (2017). Integrin signaling potentiates transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) dependent down-regulation of E-Cadherin expression – Important implications for epithelial to mesenchymal transition (EMT) in renal cell carcinoma. *Experimental Cell Research*, 355(2), 57–66. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2017.03.051>
- Fenner, F., Goody, D., Protzel, C., Erbersdobler, A., Richter, C., Hartz, J. M., ... Pützer, B. M. (2017). E2F1 Signalling is Predictive of Chemoresistance and Lymphogenic Metastasis in Penile Cancer: A Pilot Functional Study Reveals New Prognostic Biomarkers. *European Urology Focus*. <https://doi.org/10.1016/J.EUF.2017.02.009>

- Filipp, F. V. (2017). Precision medicine driven by cancer systems biology. *Cancer Metastasis Reviews*, 36(1), 91–108. <https://doi.org/10.1007/s10555-017-9662-4>
- Franceschini, A., Szklarczyk, D., Frankild, S., Kuhn, M., Simonovic, M., Roth, A., ... Jensen, L. J. (2013). STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue), D808–15. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1094>
- Freedman, J. A., Chang, J. T., Jakoi, L., & Nevins, J. R. (2009). A combinatorial mechanism for determining the specificity of E2F activation and repression. *Oncogene*, 28(32), 2873–2881. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.153>
- Fueyo, J., Gomez-Manzano, C., Yung, W. K., Liu, T. J., Alemany, R., McDonnell, T. J., ... Kyritsis, A. P. (1998). Overexpression of E2F-1 in glioma triggers apoptosis and suppresses tumor growth in vitro and in vivo. *Nature Medicine*, 4(6), 685–690. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9623977>
- Fulop, T., Kotb, R., Fortin, C. F., Pawelec, G., De Angelis, F., & Larbi, A. (2010). Potential role of immunosenescence in cancer development. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1197(1), 158–165. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05370.x>
- Fulop, T., Larbi, A., Kotb, R., & Pawelec, G. (2013). Immunology of aging and cancer development. *Interdisciplinary Topics in Gerontology*, 38, 38–48. <https://doi.org/10.1159/000343599>
- Galanos, P., Pappas, G., Polyzos, A., Kotsinas, A., Svolaki, I., Giakoumakis, N. N., ... Gorgoulis, V. G. (2018). Mutational signatures reveal the role of RAD52 in p53-independent p21-driven genomic instability. *Genome Biology*, 19(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1401-9>
- Gao, J., Aksoy, B. A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S. O., ... Schultz, N. (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science Signaling*, 6(269), pl1. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004088>
- Gao, Y., Li, H., Ma, X., Fan, Y., Ni, D., Zhang, Y., ... Zhang, X. (2017). KLF6 Suppresses Metastasis of Clear Cell Renal Cell Carcinoma via Transcriptional Repression of E2F1. *Cancer Research*, 77(2), 330–342. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0348>
- Gaubatz, S., Lindeman, G. J., Ishida, S., Jakoi, L., Nevins, J. R., Livingston, D. M., & Rempel, R. E. (2000). E2F4 and E2F5 play an essential role in pocket protein-mediated G1 control. *Molecular Cell*, 6(3), 729–735. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11030352>
- Gaubatz, S., Wood, J. G., & Livingston, D. M. (1998). Unusual proliferation arrest and transcriptional control properties of a newly discovered E2F family member, E2F-6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(16), 9190–9195. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9689056>
- GCO. (2018a). Cancer Fact Sheets 2018. Retrieved from <http://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>
- GCO. (2018b). Cancer Today. Retrieved from <http://gco.iarc.fr/today/home>
- Ghosh, D., Bernstein, J. A., Khurana Hershey, G. K., Rothenberg, M. E., & Mersha, T. B. (2018). Leveraging Multilayered “Omics” Data for Atopic Dermatitis: A Road Map to Precision Medicine. *Frontiers in Immunology*, 9, 2727. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02727>
- Giralt, A., Denechaud, P.-D., Lopez-Mejia, I. C., Delacuisine, B., Blanchet, E., Bonner, C., ... Fajas, L. (2018). E2F1 promotes hepatic gluconeogenesis and contributes to hyperglycemia during diabetes. *Molecular Metabolism*, 11, 104–112.

<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.02.011>

- Glauche, I., Horn, K., Horn, M., Thielecke, L., Essers, M. A. G., Trumpp, A., & Roeder, I. (2012). Therapy of chronic myeloid leukaemia can benefit from the activation of stem cells: simulation studies of different treatment combinations. *British Journal of Cancer*, 106(11), 1742–1752. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.142>
- Gomez-Manzano, C., Fueyo, J., Alameda, F., Kyritsis, A. P., & Yung, W. K. (1999). Gene therapy for gliomas: p53 and E2F-1 proteins and the target of apoptosis. *International Journal of Molecular Medicine*, 3(1), 81–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9864390>
- Gómez Tejeda Zañudo, J., Guinn, M. T., Farquhar, K., Szenk, M., Steinway, S. N., Balázs, G., & Albert, R. (2019). Towards control of cellular decision-making networks in the epithelial-to-mesenchymal transition. *Physical Biology*, 16(3), 031002. <https://doi.org/10.1088/1478-3975/aaffa1>
- Goody, D., Gupta, S. K., Engelmann, D., Spitschak, A., Marquardt, S., Mikkat, S., ... Pützer, B. M. (2019). Drug repositioning inferred from E2F1-coregulator interactions studies for the prevention and treatment of metastatic cancers. *Theranostics*, 9(5), (in Revision). <https://doi.org/10.7150/thno.29546>
- Gorgoulis, V. G., Zacharatos, P., Mariatos, G., Kotsinas, A., Bouda, M., Kletsas, D., ... Papavassiliou, A. G. (2002). Transcription factor E2F-1 acts as a growth-promoting factor and is associated with adverse prognosis in non-small cell lung carcinomas. *The Journal of Pathology*, 198(2), 142–156. <https://doi.org/10.1002/path.1121>
- Guagnano, V., Kauffmann, A., Wohrle, S., Stamm, C., Ito, M., Barys, L., ... Graus-Porta, D. (2012). FGFR Genetic Alterations Predict for Sensitivity to NVP-BGJ398, a Selective Pan-FGFR Inhibitor. *Cancer Discovery*, 2(12), 1118–1133. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0210>
- Guarnieri, D. J., & DiLeone, R. J. (2008). MicroRNAs: A new class of gene regulators. *Annals of Medicine*, 40(3), 197–208. <https://doi.org/10.1080/07853890701771823>
- Hallstrom, T. C., Mori, S., & Nevins, J. R. (2008). An E2F1-Dependent Gene Expression Program that Determines the Balance between Proliferation and Cell Death. *Cancer Cell*, 13(1), 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.11.031>
- Han, H., Cho, J.-W., Lee, S., Yun, A., Kim, H., Bae, D., ... Lee, I. (2018). TRRUST v2: an expanded reference database of human and mouse transcriptional regulatory interactions. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D380–D386. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1013>
- Hao, Y., Baker, D., ten Dijke, P., Hao, Y., Baker, D., & ten Dijke, P. (2019). TGF- $\beta$ -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11), 2767. <https://doi.org/10.3390/ijms20112767>
- Harrow, J., Frankish, A., Gonzalez, J. M., Tapanari, E., Diekhans, M., Kokocinski, F., ... Hubbard, T. J. (2012). GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project. *Genome Research*, 22(9), 1760–1774. <https://doi.org/10.1101/gr.135350.111>
- Hartwell, L. H., Hopfield, J. J., Leibler, S., & Murray, A. W. (1999). From molecular to modular cell biology. *Nature*, 402(6761supp), C47–C52. <https://doi.org/10.1038/35011540>
- Hartz, J. M., Engelmann, D., Fürst, K., Marquardt, S., Spitschak, A., Goody, D., ... Pützer, B. M. (2016). Integrated Loss of miR-1/miR-101/miR-204 Discriminates Metastatic from Nonmetastatic Penile Carcinomas and Can Predict Patient Outcome. *Journal of Urology*, 196(2), 570–578. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2016.01.115>

- Hasselbach, L., Haase, S., Fischer, D., Kolberg, H. C., & Stürzbecher, H. W. (2005). Characterisation of the promoter region of the human DNA-repair gene Rad51. *European Journal of Gynaecological Oncology*, 26(6), 589–598. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16398215>
- Hatakeyama, M., & Weinberg, R. A. (1995). The role of RB in cell cycle control. *Progress in Cell Cycle Research*, 1, 9–19. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9552350>
- Heinrich, R., Neel, B. G., & Rapoport, T. A. (2002). Mathematical models of protein kinase signal transduction. *Molecular Cell*, 9(5), 957–970. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00528-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00528-2)
- Helsten, T., Elkin, S., Arthur, E., Tomson, B. N., Carter, J., & Kurzrock, R. (2016). The FGFR Landscape in Cancer: Analysis of 4,853 Tumors by Next-Generation Sequencing. *Clinical Cancer Research*, 22(1), 259–267. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-3212>
- Hershko, T., & Ginsberg, D. (2004). Up-regulation of Bcl-2 Homology 3 (BH3)-only Proteins by E2F1 Mediates Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(10), 8627–8634. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312866200>
- Hodgkin, A. L., & Huxley, A. F. (1952). The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *The Journal of Physiology*, 116(4), 473–496. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14946714>
- Hoeijmakers, W. A. M., Bártfai, R., & Stunnenberg, H. G. (2012). *Transcriptome Analysis Using RNA-Seq*. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-026-7\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-026-7_15)
- Hoffmann, R., & Valencia, A. (2004). A gene network for navigating the literature. *Nature Genetics*, 36(7), 664–664. <https://doi.org/10.1038/ng0704-664>
- Hofree, M., Shen, J. P., Carter, H., Gross, A., & Ideker, T. (2013). Network-based stratification of tumor mutations. *Nature Methods*, 10(11), 1108–1115. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2651>
- Holdman, X. B., Welte, T., Rajapakshe, K., Pond, A., Coarfa, C., Mo, Q., ... Rosen, J. M. (2015). Upregulation of EGFR signaling is correlated with tumor stroma remodeling and tumor recurrence in FGFR1-driven breast cancer. *Breast Cancer Research : BCR*, 17. <https://doi.org/10.1186/S13058-015-0649-1>
- Hollern, D. P., Swiatnicki, M. R., Rennhack, J. P., Misek, S. A., Matson, B. C., McAuliff, A., ... Andrechek, E. R. (2019). E2F1 Drives Breast Cancer Metastasis by Regulating the Target Gene FGF13 and Altering Cell Migration. *Scientific Reports*, 9(1), 10718. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47218-0>
- Horn, M., Glauche, I., Müller, M. C., Hehlmann, R., Hochhaus, A., Loeffler, M., & Roeder, I. (2013). Model-based decision rules reduce the risk of molecular relapse after cessation of tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukemia. *Blood*, 121(2), 378–384. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-441956>
- Hsu, S.-D., Lin, F.-M., Wu, W.-Y., Liang, C., Huang, W.-C., Chan, W.-L., ... Huang, H.-D. (2011). miRTarBase: a database curates experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Research*, 39(Database issue), D163–9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1107>
- Huang, C.-I., Liu, D., Nakano, J., Yokomise, H., Ueno, M., Kadota, K., & Wada, H. (2007). E2F1 Overexpression Correlates with Thymidylate Synthase and Survivin Gene Expressions and Tumor Proliferation in Non Small-Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*, 13(23), 6938–6946. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1539>
- Huber, M. A., Azoitei, N., Baumann, B., Grünert, S., Sommer, A., Pehamberger, H., ... Wirth, T.

- (2004). NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(4), 569–581. <https://doi.org/10.1172/JCI21358>
- Humbert, P. O., Rogers, C., Ganiatsas, S., Landsberg, R. L., Trimarchi, J. M., Dandapani, S., ... Lees, J. A. (2000). E2F4 is essential for normal erythrocyte maturation and neonatal viability. *Molecular Cell*, 6(2), 281–291. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10983976>
- IARC. (2018). *Latest global cancer data*. Retrieved from <https://www.who.int/cancer/PRGlobocanFinal.pdf>
- Imai, M. A., Oda, Y., Oda, M., Nakanishi, I., & Kawahara, E. (2004). Overexpression of E2F1 associated with LOH at RB locus and hyperphosphorylation of RB in non-small cell lung carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 130(6), 320–326. <https://doi.org/10.1007/s00432-003-0538-3>
- Iwamoto, M., Banerjee, D., Menon, L. G., Jurkiewicz, A., Rao, P. H., Kemeny, N. E., ... Bertino, J. R. (2004). Overexpression of E2F-1 in lung and liver metastases of human colon cancer is associated with gene amplification. *Cancer Biology & Therapy*, 3(4), 395–399. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14726656>
- Jalili, M., Gebhardt, T., Wolkenhauer, O., & Salehzadeh-Yazdi, A. (2018). Unveiling network-based functional features through integration of gene expression into protein networks. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1864(6), 2349–2359. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2018.02.010>
- Jang, M., Kim, E., Choi, Y., Lee, H., Kim, Y., Kim, J., ... Park, S. (2012). FGFR1 is amplified during the progression of in situ to invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Research : BCR*, 14(4), R115. <https://doi.org/10.1186/bcr3239>
- Jiang, Y., Saavedra, H. I., Holloway, M. P., Leone, G., & Altura, R. A. (2004). Aberrant Regulation of Survivin by the RB/E2F Family of Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 279(39), 40511–40520. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404496200>
- Johnson, D. G., Schwarz, J. K., Cress, W. D., & Nevins, J. R. (1993). Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature*, 365(6444), 349–352. <https://doi.org/10.1038/365349a0>
- Jonsson, P. F., & Bates, P. A. (2006). Global topological features of cancer proteins in the human interactome. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 22(18), 2291–2297. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16844706>
- Joshi-Tope, G., Gillespie, M., Vastrik, I., D'Eustachio, P., Schmidt, E., de Bono, B., ... Stein, L. (2004). Reactome: a knowledgebase of biological pathways. *Nucleic Acids Research*, 33(Database issue), D428–D432. <https://doi.org/10.1093/nar/gki072>
- Kaiser, J. (2018). “Liquid biopsy” for cancer promises early detection. *Science (New York, N.Y.)*, 359(6373), 259. <https://doi.org/10.1126/science.359.6373.259>
- Katoh, M., & Nakagama, H. (2014). FGF Receptors: Cancer Biology and Therapeutics. *Medicinal Research Reviews*, 34(2), 280–300. <https://doi.org/10.1002/med.21288>
- Kerrien, S., Aranda, B., Breuza, L., Bridge, A., Broackes-Carter, F., Chen, C., ... Hermjakob, H. (2012). The IntAct molecular interaction database in 2012. *Nucleic Acids Research*, 40(Database issue), D841–6. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1088>
- Keshava Prasad, T. S., Goel, R., Kandasamy, K., Keerthikumar, S., Kumar, S., Mathivanan, S., ...

- Pandey, A. (2009). Human Protein Reference Database--2009 update. *Nucleic Acids Research*, 37(Database issue), D767-72. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn892>
- Khan, F. M., Marquardt, S., Gupta, S. K., Knoll, S., Schmitz, U., Spitschak, A., ... Pützer, B. M. (2017). Unraveling a tumor type-specific regulatory core underlying E2F1-mediated epithelial-mesenchymal transition to predict receptor protein signatures. *Nature Communications*, 8(1), 198. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00268-2>
- Khan, F. M., Schmitz, U., Nikolov, S., Engelmann, D., Pützer, B. M., Wolkenhauer, O., & Vera, J. (2014). Hybrid modeling of the crosstalk between signaling and transcriptional networks using ordinary differential equations and multi-valued logic. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1844(1 PART B), 289–298. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.05.007>
- Khera, A. V., Chaffin, M., Zekavat, S. M., Collins, R. L., Roselli, C., Natarajan, P., ... Kathiresan, S. (2018). Whole Genome Sequencing to Characterize Monogenic and Polygenic Contributions in Patients Hospitalized with Early-Onset Myocardial Infarction. *Circulation*, CIRCULATIONAHA.118.035658. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035658>
- Kim, J., Vandamme, D., Kim, J.-R., Munoz, A. G., Kolch, W., & Cho, K.-H. (2014). Robustness and evolvability of the human signaling network. *PLoS Computational Biology*, 10(7), e1003763. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003763>
- Kitano, H. (2007). A robustness-based approach to systems-oriented drug design. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(3), 202–210. <https://doi.org/10.1038/nrd2195>
- Klijn, C., Durinck, S., Stawiski, E. W., Haverty, P. M., Jiang, Z., Liu, H., ... Zhang, Z. (2015). A comprehensive transcriptional portrait of human cancer cell lines. *Nature Biotechnology*, 33(3), 306–312. <https://doi.org/10.1038/nbt.3080>
- Klipp, E., Heinrich, R., & Holzhütter, H.-G. (2002). Prediction of temporal gene expression. *European Journal of Biochemistry*, 269(22), 5406–5413. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03223.x>
- Knoll, S., Emmrich, S., & Pützer, B. M. (2013). *The E2F1-miRNA Cancer Progression Network*. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5590-1\\_8](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5590-1_8)
- Knoll, S., Fürst, K., Kowtharapu, B., Schmitz, U., Marquardt, S., Wolkenhauer, O., ... Pützer, B. M. (2014). E2F1 induces miR-224/452 expression to drive EMT through TXNIP downregulation. *EMBO Reports*, 15(12), 1315–1329. <https://doi.org/10.15252/embr.201439392>
- Kobayashi, K., Hisamatsu, K., Suzui, N., Hara, A., Tomita, H., & Miyazaki, T. (2018). A Review of HPV-Related Head and Neck Cancer. *Journal of Clinical Medicine*, 7(9). <https://doi.org/10.3390/JCM7090241>
- Kolch, W., Halasz, M., Granovskaya, M., & Kholodenko, B. N. (2015). The dynamic control of signal transduction networks in cancer cells. *Nature Reviews Cancer*, 15(9), 515–527. <https://doi.org/10.1038/nrc3983>
- Kolesnikov, N., Hastings, E., Keays, M., Melnichuk, O., Tang, Y. A., Williams, E., ... Brazma, A. (2015). ArrayExpress update--simplifying data submissions. *Nucleic Acids Research*, 43(Database issue), D1113-6. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1057>
- Korcsmáros, T. (2013). Cancer-related networks: A help to understand, predict and change malignant transformation. *Seminars in Cancer Biology*, 23(4), 209–212. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2013.06.011>
- Korf, I. (2013). Genomics: the state of the art in RNA-seq analysis. *Nature Methods*, 10(12), 1165–



1166. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2735>
- Kovesdi, I., Reichel, R., & Nevins, J. R. (1986). Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation. *Cell*, 45(2), 219–228. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90386-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90386-7)
- Kowalik, T. F., DeGregori, J., Schwarz, J. K., & Nevins, J. R. (1995). E2F1 overexpression in quiescent fibroblasts leads to induction of cellular DNA synthesis and apoptosis. *Journal of Virology*, 69(4), 2491–2500. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7884898>
- Kreeger, P. K., & Lauffenburger, D. A. (2010). Cancer systems biology: a network modeling perspective. *Carcinogenesis*, 31(1), 2–8. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp261>
- Krogan, N. J. J., Lippman, S., Agard, D. A. A., Ashworth, A., & Ideker, T. (2015). The Cancer Cell Map Initiative: Defining the Hallmark Networks of Cancer. *Molecular Cell*, 58(4), 690–698. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.008>
- Kuperstein, I., Cohen, D. P. A., Pook, S., Viara, E., Calzone, L., Barillot, E., & Zinovyev, A. (2013). NaviCell: a web-based environment for navigation, curation and maintenance of large molecular interaction maps. *BMC Systems Biology*, 7, 100. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-7-100>
- Kwon, J. S., Everetts, N. J., Wang, X., Wang, W., Della Croce, K., Xing, J., & Yao, G. (2017). Controlling Depth of Cellular Quiescence by an Rb-E2F Network Switch. *Cell Reports*, 20(13), 3223–3235. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.007>
- Kyrochristos, I. D., Ziogas, D. E., & Roukos, D. H. (2018). Dynamic genome and transcriptional network-based biomarkers and drugs: precision in breast cancer therapy. *Medicinal Research Reviews*. <https://doi.org/10.1002/med.21549>
- La Thangue, N. B. (2003). The yin and yang of E2F-1: balancing life and death. *Nature Cell Biology*, 5(7), 587–589. <https://doi.org/10.1038/ncb0703-587>
- Lai, Q., Giralt, A., May, C. Le, Zhang, L., Cariou, B., Denechaud, P.-D., & Fajas, L. (2017). E2F1 inhibits circulating cholesterol clearance by regulating Pcsk9 expression in the liver. *JCI Insight*, 2(10). <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.89729>
- Lambusch, F., Waltemath, D., Wolkenhauer, O., Sandkuhl, K., Rosenke, C., & Henkel, R. (2018). Identifying frequent patterns in biochemical reaction networks: a workflow. *Database : The Journal of Biological Databases and Curation*, 2018. <https://doi.org/10.1093/database/bay051>
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(3), 178–196. <https://doi.org/10.1038/nrm3758>
- Lee, J.-S., Leem, S.-H., Lee, S.-Y., Kim, S.-C., Park, E.-S., Kim, S.-B., ... Chu, I.-S. (2010). Expression signature of E2F1 and its associated genes predict superficial to invasive progression of bladder tumors. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(16), 2660–2667. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.0977>
- Li, Y., Huang, J., Yang, D., Xiang, S., Sun, J., Li, H., & Ren, G. (2018). Expression patterns of E2F transcription factors and their potential prognostic roles in breast cancer. *Oncology Letters*, 15(6), 9216–9230. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8514>
- Liebermeister, W., & Klipp, E. (2006). Bringing metabolic networks to life: integration of kinetic, metabolic, and proteomic data. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 3(1), 42. <https://doi.org/10.1186/1742-4682-3-42>

- Lim, C.-A., Yao, F., Wong, J. J.-Y., George, J., Xu, H., Chiu, K. P., ... Chin, K.-C. (2007). Genome-wide Mapping of RELA(p65) Binding Identifies E2F1 as a Transcriptional Activator Recruited by NF- $\kappa$ B upon TLR4 Activation. *Molecular Cell*, 27(4), 622–635. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.038>
- Logan, N., Graham, A., Zhao, X., Fisher, R., Maiti, B., Leone, G., & Thangue, N. B. La. (2005). E2F-8: an E2F family member with a similar organization of DNA-binding domains to E2F-7. *Oncogene*, 24(31), 5000–5004. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208703>
- Loria, R., Laquintana, V., Bon, G., Trisciuglio, D., Frapolli, R., Covelio, R., ... Falcioni, R. (2018). HMGA1/E2F1 axis and NF $\kappa$ B pathways regulate LPS progression and trabectedin resistance. *Oncogene*, 1. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0394-x>
- Lott, P. C., & Carvajal-Carmona, L. G. (2018). Resolving gastric cancer aetiology: an update in genetic predisposition. *The Lancet. Gastroenterology & Hepatology*, 3(12), 874–883. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(18\)30237-1](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(18)30237-1)
- Lubitz, T., Welkenhuysen, N., Shashkova, S., Bendrioua, L., Hohmann, S., Klipp, E., & Krantz, M. (2015). Network reconstruction and validation of the Snf1/AMPK pathway in baker's yeast based on a comprehensive literature review. *NPJ Systems Biology and Applications*, 1(1), 15007. <https://doi.org/10.1038/npjbsa.2015.7>
- Lucarelli, P., Schilling, M., Kreutz, C., Vlasov, A., Boehm, M. E., Iwamoto, N., ... Klingmüller, U. (2018). Resolving the Combinatorial Complexity of Smad Protein Complex Formation and Its Link to Gene Expression. *Cell Systems*, 6(1), 75–89.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2017.11.010>
- Ma, H., Brosens, L. A. A., Offerhaus, G. J. A., Giardiello, F. M., de Leng, W. W. J., & Montgomery, E. A. (2018). Pathology and genetics of hereditary colorectal cancer. *Pathology*, 50(1), 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2017.09.004>
- Magee, J., Wu, C. L., Illenye, S., Harlow, E., & Heintz, N. H. (1996). Nuclear localization of DP and E2F transcription factors by heterodimeric partners and retinoblastoma protein family members. *Journal of Cell Science*, 109 ( Pt 7), 1717–1726. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8832394>
- Manicum, T., Ni, F., Ye, Y., Fan, X., & Chen, B.-C. (2018). Prognostic values of E2F mRNA expression in human gastric cancer. *Bioscience Reports*, 38(6), BSR20181264. <https://doi.org/10.1042/BSR20181264>
- Marquardt, S., Solanki, M., Spitschak, A., Vera, J., & Pützer, B. M. B. M. (2018). Emerging functional markers for cancer stem cell-based therapies: Understanding signaling networks for targeting metastasis. *Seminars in Cancer Biology*, 53, 90–109. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.06.006>
- Massagué, J., & Wotton, D. (2000). Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *The EMBO Journal*, 19(8), 1745–1754. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.8.1745>
- Massagué, Joan. (2000). How cells read TGF- $\beta$  signals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(3), 169–178. <https://doi.org/10.1038/35043051>
- Massagué, Joan. (2012). TGF $\beta$  signalling in context. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 13(10), 616–630. <https://doi.org/10.1038/nrm3434>
- Massip, A., Arcondéguy, T., Touriol, C., Basset, C., Prats, H., & Lacazette, E. (2013). E2F1 activates p53 transcription through its distal site and participates in apoptosis induction in HPV-positive cells. *FEBS Letters*, 587(19), 3188–3194. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.08.009>

- Masunaga, H., Sugimoto, Y., Magi, S., Itasaki, R., Okada-Hatakeyama, M., & Kurata, H. (2017). Robustness analysis of the detailed kinetic model of an ErbB signaling network by using dynamic sensitivity. *PLOS ONE*, 12(5), e0178250. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178250>
- Matsuoka, Y., Matsumae, H., Katoh, M., Eisfeld, A. J., Neumann, G., Hase, T., ... Kawaoka, Y. (2013). A comprehensive map of the influenza A virus replication cycle. *BMC Systems Biology*, 7, 97. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-7-97>
- Mazumder, S., Datta, S., Ray, J. G., Chaudhuri, K., & Chatterjee, R. (2019). Liquid biopsy: miRNA as a potential biomarker in oral cancer. *Cancer Epidemiology*, 58, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.CANEP.2018.12.008>
- Medici, D., Hay, E. D., & Goodenough, D. A. (2006). Cooperation between snail and LEF-1 transcription factors is essential for TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Molecular Biology of the Cell*, 17(4), 1871–1879. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-08-0767>
- Mehlen, P., & Puisieux, A. (2006). Metastasis: a question of life or death. *Nature Reviews Cancer*, 6(6), 449–458. <https://doi.org/10.1038/nrc1886>
- Meier, C., Spitschak, A., Abshagen, K., Gupta, S., Mor, J. M., Wolkenhauer, O., ... Pützer, B. M. (2014). Association of RHAMM with E2F1 promotes tumour cell extravasation by transcriptional up-regulation of fibronectin. *The Journal of Pathology*, 234(3), 351–364. <https://doi.org/10.1002/path.4400>
- Melnikova, V. O., Dobroff, A. S., Zigler, M., Villares, G. J., Braeuer, R. R., Wang, H., ... Bar-Eli, M. (2010). CREB inhibits AP-2alpha expression to regulate the malignant phenotype of melanoma. *PloS One*, 5(8), e12452. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012452>
- Meng, P., & Ghosh, R. (2014). Transcription addiction: can we garner the Yin and Yang functions of E2F1 for cancer therapy? *Cell Death & Disease*, 5(8), e1360–e1360. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.326>
- Meynier, S., & Rieux-Laucat, F. (2019). FAS and RAS related Apoptosis defects: From autoimmunity to leukemia. *Immunological Reviews*, 287(1), 50–61. <https://doi.org/10.1111/imr.12720>
- Miliás-Argeitis, A., Oliveira, A. P., Gerosa, L., Falter, L., Sauer, U., & Lygeros, J. (2016). Elucidation of Genetic Interactions in the Yeast GATA-Factor Network Using Bayesian Model Selection. *PLOS Computational Biology*, 12(3), e1004784. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004784>
- Min, C., Eddy, S. F., Sherr, D. H., & Sonenshein, G. E. (2008). NF-κB and epithelial to mesenchymal transition of cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 104(3), 733–744. <https://doi.org/10.1002/jcb.21695>
- Molina-Privado, I., Rodríguez-Martínez, M., Rebollo, P., Martín-Pérez, D., Artiga, M.-J., Menárguez, J., ... Campanero, M. R. (2009). E2F1 expression is deregulated and plays an oncogenic role in sporadic Burkitt's lymphoma. *Cancer Research*, 69(9), 4052–4058. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4617>
- Mooso, B. A., Vinall, R. L., Mudryj, M., Yap, S. A., deVere White, R. W., & Ghosh, P. M. (2015). The role of EGFR family inhibitors in muscle invasive bladder cancer: a review of clinical data and molecular evidence. *The Journal of Urology*, 193(1), 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2014.07.121>
- Morales-Sanchez, A., & Fuentes-Panana, E. M. (2017). Epstein-Barr Virus-associated Gastric Cancer and Potential Mechanisms of Oncogenesis. *Current Cancer Drug Targets*, 17(6).

<https://doi.org/10.2174/1568009616666160926124923>

- Morgunova, E., Yin, Y., Jolma, A., Dave, K., Schmierer, B., Popov, A., ... Taipale, J. (2015). Structural insights into the DNA-binding specificity of E2F family transcription factors. *Nature Communications*, 6, 10050. <https://doi.org/10.1038/ncomms10050>
- Morris, K. V., & Mattick, J. S. (2014). The rise of regulatory RNA. *Nature Reviews Genetics*, 15(6), 423–437. <https://doi.org/10.1038/nrg3722>
- Mudunuri, U., Che, A., Yi, M., & Stephens, R. M. (2009). bioDBnet: the biological database network. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 25(4), 555–556. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn654>
- Navarro-Tableros, V., Gomez, Y., Camussi, G., & Brizzi, M. F. (2018). Extracellular Vesicles: New Players in Lymphomas. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1). <https://doi.org/10.3390/ijms20010041>
- Nelson, M. A., Reynolds, S. H., Rao, U. N. M., Goulet, A.-C., Feng, Y., Beas, A., ... Sargent, L. M. (2006). Increased gene copy number of the transcription factor E2F1 in malignant melanoma. *Cancer Biology & Therapy*, 5(4), 407–412. <https://doi.org/10.4161/cbt.5.4.2512>
- Oda, K., Matsuoka, Y., Funahashi, A., & Kitano, H. (2005). A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Molecular Systems Biology*, 1, 2005.0010. <https://doi.org/10.1038/msb4100014>
- Oki, S., Ohta, T., Shioi, G., Hatanaka, H., Ogasawara, O., Okuda, Y., ... Meno, C. (2018). ChIP-Atlas: a data-mining suite powered by full integration of public ChIP-seq data. *EMBO Reports*, 19(12). <https://doi.org/10.15252/embr.201846255>
- Onichtchouk, D., Geier, F., Polok, B., Messerschmidt, D. M., Mössner, R., Wendik, B., ... Driever, W. (2010). Zebrafish Pou5f1-dependent transcriptional networks in temporal control of early development. *Molecular Systems Biology*, 6, 354. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.9>
- Ooshima, A., Park, J., & Kim, S. (2019). Phosphorylation status at Smad3 linker region modulates transforming growth factor- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition and cancer progression. *Cancer Science*, 110(2), 481–488. <https://doi.org/10.1111/cas.13922>
- Panza, F., Lozupone, M., Logroscino, G., & Imbimbo, B. P. (2019). A critical appraisal of amyloid- $\beta$ -targeting therapies for Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, 1. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0116-6>
- Pappas, L., Xu, X. L., Abramson, D. H., & Jhanwar, S. C. (2017). Genomic instability and proliferation/survival pathways in RB1-deficient malignancies. *Advances in Biological Regulation*, 64, 20–32. Retrieved from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212492617300015>
- Philip, M., Fairchild, L., Sun, L., Horste, E. L., Camara, S., Shakiba, M., ... Schietinger, A. (2017). Chromatin states define tumour-specific T cell dysfunction and reprogramming. *Nature*, 545(7655), 452–456. <https://doi.org/10.1038/nature22367>
- Pintarelli, G., Cotroneo, C. E., Noci, S., Dugo, M., Galvan, A., Delli Carpini, S., ... Colombo, F. (2017). Genetic susceptibility variants for lung cancer: replication study and assessment as expression quantitative trait loci. *Scientific Reports*, 7, 42185. <https://doi.org/10.1038/srep42185>
- Poppy Roworth, A., Ghari, F., & La Thangue, N. B. (2015). To live or let die - complexity within the E2F1 pathway. *Molecular & Cellular Oncology*, 2(1), e970480. <https://doi.org/10.4161/23723548.2014.970480>

- Pützer, B. M., & Engelmann, D. (2013). E2F1 apoptosis counterattacked: evil strikes back. *Trends in Molecular Medicine*, 19(2), 89–98. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2012.10.009>
- Pützer, B. M., Steder, M., & Alla, V. (2010). Predicting and preventing melanoma invasiveness: advances in clarifying E2F1 function. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 10(11), 1707–1720. <https://doi.org/10.1586/era.10.153>
- Qin, H., Chan, M. W., Liyanarachchi, S., Balch, C., Potter, D., Souriraj, I. J., ... Davuluri, R. V. (2009). An integrative ChIP-chip and gene expression profiling to model SMAD regulatory modules. *BMC Systems Biology*, 3(1), 73. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-3-73>
- Qin, X. Q., Livingston, D. M., Kaelin, W. G., & Adams, P. D. (1994). Deregulated transcription factor E2F-1 expression leads to S-phase entry and p53-mediated apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(23), 10918–10922. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7971984>
- Racek, T., Buhlmann, S., Rüst, F., Knoll, S., Alla, V., & Pützer, B. M. (2008). Transcriptional Repression of the Prosurvival Endoplasmic Reticulum Chaperone GRP78/BIP by E2F1. *Journal of Biological Chemistry*, 283(49), 34305–34314. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803925200>
- Rennhack, J., & Andrechek, E. (2015). Conserved E2F mediated metastasis in mouse models of breast cancer and HER2 positive patients. *Oncoscience*, 2(10), 867–871. <https://doi.org/10.18632/oncoscience.259>
- Rhodes, D. R., Kalyana-Sundaram, S., Mahavisno, V., Barrette, T. R., Ghosh, D., & Chinnaiyan, A. M. (2005). Mining for regulatory programs in the cancer transcriptome. *Nature Genetics*, 37(6), 579–583. <https://doi.org/10.1038/ng1578>
- Richter, C., Marquardt, S., Li, F., Spitschak, A., Murr, N., Edelhäuser, B. A. H., ... Logotheti, S. (2019). Rewiring E2F1 with classical NHEJ via APLF suppression promotes bladder cancer invasiveness. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1), 292. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6615232/>
- Rinn, J. L., & Chang, H. Y. (2012). Genome Regulation by Long Noncoding RNAs. *Annual Review of Biochemistry*, 81(1), 145–166. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-051410-092902>
- Rizwani, W., Schaal, C., Kunigal, S., Coppola, D., & Chellappan, S. (2014). Mammalian Lysine Histone Demethylase KDM2A Regulates E2F1-Mediated Gene Transcription in Breast Cancer Cells. *PLoS ONE*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0100888>
- Roeder, I., Horn, M., Glauche, I., Hochhaus, A., Mueller, M. C., & Loeffler, M. (2006). Dynamic modeling of imatinib-treated chronic myeloid leukemia: functional insights and clinical implications. *Nature Medicine*, 12(10), 1181–1184. <https://doi.org/10.1038/nm1487>
- Rothblum-Oviatt, C., Wright, J., Lefton-Greif, M. A., McGrath-Morrow, S. A., Crawford, T. O., & Lederman, H. M. (2016). Ataxia telangiectasia: a review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 11(1), 159. <https://doi.org/10.1186/s13023-016-0543-7>
- Rouaud, F., Hamouda-Tekaya, N., Cerezo, M., Abbe, P., Zangari, J., Hofman, V., ... Rocchi, S. (2018). E2F1 inhibition mediates cell death of metastatic melanoma. *Cell Death & Disease*, 9(5), 527. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0566-1>
- Sader, F., Denis, J.-F., Laref, H., & Roy, S. (2019). Epithelial to mesenchymal transition is mediated by both TGF- $\beta$  canonical and non-canonical signaling during axolotl limb regeneration. *Scientific Reports*, 9(1), 1144. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38171-5>
- Schietinger, A., Philip, M., Krisnawan, V. E., Chiu, E. Y., Delrow, J. J., Basom, R. S., ... Greenberg, P. D. (2016). Tumor-Specific T Cell Dysfunction Is a Dynamic Antigen-Driven Differentiation

- Program Initiated Early during Tumorigenesis. *Immunity*, 45(2), 389–401.  
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.07.011>
- Schwarz, J. K., Devoto, S. H., Smith, E. J., Chellappan, S. P., Jakoi, L., & Nevins, J. R. (1993). Interactions of the p107 and Rb proteins with E2F during the cell proliferation response. *The EMBO Journal*, 12(3), 1013–1020. Retrieved from  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8458319>
- Seldin, M. F. (2015). The genetics of human autoimmune disease: A perspective on progress in the field and future directions. *Journal of Autoimmunity*, 64, 1–12.  
<https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.08.015>
- Shackney, S. E., Chowdhury, S. A., & Schwartz, R. (2014). A Novel Subset of Human Tumors That Simultaneously Overexpress Multiple E2F-responsive Genes Found in Breast, Ovarian, and Prostate Cancers. *Cancer Informatics*, 13(Suppl 5), 89–100.  
<https://doi.org/10.4137/CIN.S14062>
- Shan, B., & Lee, W. H. (1994). Deregulated expression of E2F-1 induces S-phase entry and leads to apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 14(12), 8166–8173. Retrieved from  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7969153>
- Sharma, P., Srivastava, P., Seth, A., Tripathi, P. N., Banerjee, A. G., & Shrivastava, S. K. (2018). Comprehensive review of mechanisms of pathogenesis involved in Alzheimer's disease and potential therapeutic strategies. *Progress in Neurobiology*.  
<https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2018.12.006>
- Shats, I., Deng, M., Davidovich, A., Zhang, C., Kwon, J. S., Manandhar, D., ... You, L. (2017). Expression level is a key determinant of E2F1-mediated cell fate. *Cell Death and Differentiation*, 24(4), 626–637. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.12>
- Siegel, P. M., & Massagué, J. (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF- $\beta$  in homeostasis and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3(11), 807–820. <https://doi.org/10.1038/nrc1208>
- Simin, K., Wu, H., Lu, L., Pinkel, D., Albertson, D., Cardiff, R. D., & Van Dyke, T. (2004). pRb inactivation in mammary cells reveals common mechanisms for tumor initiation and progression in divergent epithelia. *PLoS Biology*, 2(2), E22.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020022>
- Skrypek, N., Goossens, S., De Smedt, E., Vandamme, N., & Berx, G. (2017). Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Epigenetic Reprogramming Driving Cellular Plasticity. *Trends in Genetics : TIG*, 33(12), 943–959. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.08.004>
- Stanelle, J., Stiewe, T., Rodicker, F., Kohler, K., Theseling, C., & Putzer, B. (2003). Mechanism of E2F1-induced apoptosis in primary vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular Research*, 59(2), 512–519. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(03\)00392-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(03)00392-4)
- Stanelle, Jens, & Pützer, B. M. (2006). E2F1-induced apoptosis: turning killers into therapeutics. *Trends in Molecular Medicine*, 12(4), 177–185.  
<https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2006.02.002>
- Steinway, S. N., Zañudo, J. G. T., Ding, W., Rountree, C. B., Feith, D. J., Loughran, T. P., & Albert, R. (2014). Network modeling of TGF $\beta$  signaling in hepatocellular carcinoma epithelial-to-mesenchymal transition reveals joint sonic hedgehog and Wnt pathway activation. *Cancer Research*, 74(21), 5963–5977. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0225>
- Stemmler, M. P., Eccles, R. L., Brabletz, S., & Brabletz, T. (2019). Non-redundant functions of EMT transcription factors. *Nature Cell Biology*, 21(1), 102–112. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0196-y>

- Stiewe, T., & Pützer, B. M. (2000). Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis. *Nature Genetics*, 26(4), 464–469. <https://doi.org/10.1038/82617>
- Sumitomo, S., Nagafuchi, Y., Tsuchida, Y., Tsuchiya, H., Ota, M., Ishigaki, K., ... Yamamoto, K. (2018). Transcriptome analysis of peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis: a systematic review. *Inflammation and Regeneration*, 38, 21. <https://doi.org/10.1186/s41232-018-0078-5>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Tam, W. L., & Weinberg, R. A. (2013). The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nature Medicine*, 19(11), 1438–1449. <https://doi.org/10.1038/nm.3336>
- The Cancer Genome Atlas Network. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490(7418), 61–70. <https://doi.org/10.1038/nature11412>
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*, 139(5), 871–890. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>
- Tian, W., Cui, F., & Esteban, M. A. (2013). E2F1 in renal cancer: Mr Hyde disguised as Dr Jekyll? *The Journal of Pathology*, 231(2), 143–146. <https://doi.org/10.1002/path.4238>
- To, B., & Andrechek, E. R. (2018). Transcription factor compensation during mammary gland development in E2F knockout mice. *PLOS ONE*, 13(4), e0194937. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194937>
- Tomlinson, D. C., Baxter, E. W., Loadman, P. M., Hull, M. A., & Knowles, M. A. (2012). FGFR1-induced epithelial to mesenchymal transition through MAPK/PLC $\gamma$ /COX-2-mediated mechanisms. *PloS One*, 7(6), e38972. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038972>
- Trimarchi, J M, Fairchild, B., Wen, J., & Lees, J. A. (2001). The E2F6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(4), 1519–1524. <https://doi.org/10.1073/pnas.041597698>
- Trimarchi, Jeffrey M., & Lees, J. A. (2002). Sibling rivalry in the E2F family. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(1), 11–20. <https://doi.org/10.1038/nrm714>
- Tsai, T. Y.-C., Choi, Y. S., Ma, W., Pomerening, J. R., Tang, C., & Ferrell, J. E. (2008). Robust, Tunable Biological Oscillations from Interlinked Positive and Negative Feedback Loops. *Science*, 321(5885), 126–129. <https://doi.org/10.1126/science.1156951>
- Tsubakihara, Y., & Moustakas, A. (2018). Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis under the Control of Transforming Growth Factor  $\beta$ . *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11). <https://doi.org/10.3390/ijms19113672>
- Tuve, S., Wagner, S. N., Schitteck, B., & Pützer, B. M. (2004). Alterations of  $\Delta$ TA-p 73 splice transcripts during melanoma development and progression. *International Journal of Cancer*, 108(1), 162–166. <https://doi.org/10.1002/ijc.11552>
- Valdes-Mora, F., Handler, K., Law, A. M. K., Salomon, R., Oakes, S. R., Ormandy, C. J., & Gallego-Ortega, D. (2018). Single-Cell Transcriptomics in Cancer Immunobiology: The Future of Precision Oncology. *Frontiers in Immunology*, 9, 2582. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02582>

- Vélez-Cruz, R., & Johnson, D. G. (2017). The Retinoblastoma (RB) Tumor Suppressor: Pushing Back against Genome Instability on Multiple Fronts. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8). <https://doi.org/10.3390/ijms18081776>
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., ... Zhu, X. (2001). The sequence of the human genome. *Science (New York, N.Y.)*, 291(5507), 1304–1351. <https://doi.org/10.1126/science.1058040>
- Vera, J., Schmitz, U., Lai, X., Engelmann, D., Khan, F. M., Wolkenhauer, O., & Pützer, B. M. (2013). Kinetic Modeling–Based Detection of Genetic Signatures That Provide Chemoresistance via the E2F1-p73/DNp73-miR-205 Network. *Cancer Research*, 73(12), 3511–3524. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4095>
- Verona, R., Moberg, K., Estes, S., Starz, M., Vernon, J. P., & Lees, J. A. (1997). E2F activity is regulated by cell cycle-dependent changes in subcellular localization. *Molecular and Cellular Biology*, 17(12), 7268–7282. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9372959>
- Wachi, S., Yoneda, K., & Wu, R. (2005). Interactome-transcriptome analysis reveals the high centrality of genes differentially expressed in lung cancer tissues. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 21(23), 4205–4208. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti688>
- Wang, B., Ma, A., Zhang, L., Jin, W.-L., Qian, Y., Xu, G., ... Liu, Y. (2015). POH1 deubiquitylates and stabilizes E2F1 to promote tumour formation. *Nature Communications*, 6(1), 8704. <https://doi.org/10.1038/ncomms9704>
- Wang, J., Lu, M., Qiu, C., & Cui, Q. (2010). TransmiR: a transcription factor-microRNA regulation database. *Nucleic Acids Research*, 38(Database issue), D119–22. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp803>
- Wang, X., Huang, X., & Zhang, Y. (2018). Involvement of Human Papillomaviruses in Cervical Cancer. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02896>
- Wang, X. T., Xie, Y. B., & Xiao, Q. (2011). Lentivirus-mediated RNA interference targeting E2F-1 inhibits human gastric cancer MGC-803 cell growth in vivo. *Experimental & Molecular Medicine*, 43(11), 638–645. <https://doi.org/10.3858/emm.2011.43.11.072>
- Wang, Y., Alla, V., Goody, D., Gupta, S. K., Spitschak, A., Wolkenhauer, O., ... Engelmann, D. (2016). Epigenetic factor EPC1 is a master regulator of DNA damage response by interacting with E2F1 to silence death and activate metastasis-related gene signatures. *Nucleic Acids Research*, 44(1), 117–133. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv885>
- Wang, Z.-T., Tan, C.-C., Tan, L., & Yu, J.-T. (2019). Systems biology and gene networks in Alzheimer's disease. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 96, 31–44. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.11.007>
- Wendt, C., & Margolin, S. (2019). Identifying breast cancer susceptibility genes – a review of the genetic background in familial breast cancer. *Acta Oncologica*, 1–12. <https://doi.org/10.1080/0284186X.2018.1529428>
- Werner, H. M. J., Mills, G. B., & Ram, P. T. (2014). Cancer Systems Biology: a peek into the future of patient care? *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 11(3), 167–176. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.6>
- Wingender, E., Chen, X., Hehl, R., Karas, H., Liebich, I., Matys, V., ... Schacherer, F. (2000). TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 316–319. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10592259>
- Wingender, E., Dietze, P., Karas, H., & Knüppel, R. (1996). TRANSFAC: a database on transcription



- factors and their DNA binding sites. *Nucleic Acids Research*, 24(1), 238–241.  
<https://doi.org/10.1093/nar/24.1.238>
- Wolkenhauer, O. (2002). Mathematical modelling in the post-genome era: understanding genome expression and regulation—a system theoretic approach. *Biosystems*, 65(1), 1–18.  
[https://doi.org/10.1016/S0303-2647\(02\)00004-7](https://doi.org/10.1016/S0303-2647(02)00004-7)
- Wu, L., Timmers, C., Maiti, B., Saavedra, H. I., Sang, L., Chong, G. T., ... Leone, G. (2001). The E2F1–3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature*, 414(6862), 457–462.  
<https://doi.org/10.1038/35106593>
- Wu, M., Wang, X., McGregor, N., Pienta, K. J., & Zhang, J. (2014). Dynamic Regulation of Rad51 by E2F1 and p53 in Prostate Cancer Cells upon Drug-Induced DNA Damage under Hypoxia. *Molecular Pharmacology*, 85(6), 866–876. <https://doi.org/10.1124/mol.113.090688>
- Wu, X., & Levine, A. J. (1994). p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(9), 3602–3606.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.91.9.3602>
- Wu, Xin, Sheng, X., Sheng, R., Lu, H., & Xu, H. (2019). Genetic and clinical markers for predicting treatment responsiveness in rheumatoid arthritis. *Frontiers of Medicine*, 1–9.  
<https://doi.org/10.1007/s11684-018-0659-3>
- Xanthoulis, A., & Tiniakos, D. G. (2013). E2F transcription factors and digestive system malignancies: how much do we know? *World Journal of Gastroenterology*, 19(21), 3189–3198. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i21.3189>
- Xie, Y. (2017). *Hepatitis B Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma*.  
[https://doi.org/10.1007/978-981-10-5765-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-10-5765-6_2)
- Xiong, Z., Ye, L., Zhenyu, H., Li, F., Xiong, Y., Lin, C., ... Wang, X. (2018). ANP32E induces tumorigenesis of triple-negative breast cancer cells by upregulating E2F1. *Molecular Oncology*, 12(6), 896–912. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12202>
- Xu, H., Ang, Y.-S., Sevilla, A., Lemischka, I. R., & Ma'ayan, A. (2014). Construction and validation of a regulatory network for pluripotency and self-renewal of mouse embryonic stem cells. *PLoS Computational Biology*, 10(8), e1003777. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003777>
- Xu, J., Lamouille, S., & Derynck, R. (2009). TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Research*, 19(2), 156–172. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.5>
- Xu, X., Bieda, M., Jin, V. X., Rabinovich, A., Oberley, M. J., Green, R., & Farnham, P. J. (2007). A comprehensive ChIP-chip analysis of E2F1, E2F4, and E2F6 in normal and tumor cells reveals interchangeable roles of E2F family members. *Genome Research*, 17(11), 1550–1561.  
<https://doi.org/10.1101/gr.6783507>
- Yachie-Kinoshita, A., Onishi, K., Ostblom, J., Langley, M. A., Posfai, E., Rossant, J., & Zandstra, P. W. (2018). Modeling signaling-dependent pluripotency with Boolean logic to predict cell fate transitions. *Molecular Systems Biology*, 14(1), e7952.  
<https://doi.org/10.15252/msb.20177952>
- Yamasaki, L., Bronson, R., Williams, B. O., Dyson, N. J., Harlow, E., & Jacks, T. (1998). Loss of E2F-1 reduces tumorigenesis and extends the lifespan of Rb1(+/-) mice. *Nature Genetics*, 18(4), 360–364. <https://doi.org/10.1038/ng0498-360>
- Yang, C., Wang, Y., Xu, W., Liu, Z., Zhou, S., Zhang, M., & Cui, D. (2018). Genome-wide association study using diversity outcross mice identified candidate genes of pancreatic cancer. *Genomics*. <https://doi.org/10.1016/J.YGENO.2018.12.011>

- Yang, H. L., Dong, Y. B., Elliott, M. J., Liu, T. J., & McMasters, K. M. (2000). Caspase activation and changes in Bcl-2 family member protein expression associated with E2F-1-mediated apoptosis in human esophageal cancer cells. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 6(4), 1579–1589. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10778992>
- Yang, H., Zhang, X., Cai, X.-Y., Wen, D.-Y., Ye, Z.-H., Liang, L., ... Feng, Z.-B. (2017). From big data to diagnosis and prognosis: gene expression signatures in liver hepatocellular carcinoma. *PeerJ*, 5, e3089. <https://doi.org/10.7717/peerj.3089>
- Yang, S.-Z., Lin, F.-T., & Lin, W.-C. (2008). MCPH1/BRIT1 cooperates with E2F1 in the activation of checkpoint, DNA repair and apoptosis. *EMBO Reports*, 9(9), 907–915. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.128>
- Yang, W., Han, Y., Zhao, X., Duan, L., Zhou, W., Wang, X., ... Fan, D. (2018). Advances in prognostic biomarkers for esophageal cancer. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 1–11. <https://doi.org/10.1080/14737159.2019.1563485>
- Yeo, H. C., Beh, T. T., Quek, J. J. L., Koh, G., Chan, K. K. K., & Lee, D.-Y. (2011). Integrated transcriptome and binding sites analysis implicates E2F in the regulation of self-renewal in human pluripotent stem cells. *PloS One*, 6(11), e27231. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027231>
- Yevshin, I., Sharipov, R., Valeev, T., Kel, A., & Kolpakov, F. (2017). *GTRD: a database of transcription factor binding sites identified by ChIP-seq experiments*. 45(D1), D61–D67. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw951>
- Zarzynska, J. M. (2014). Two faces of TGF-beta1 in breast cancer. *Mediators of Inflammation*, 2014, 141747. <https://doi.org/10.1155/2014/141747>
- Zhang, J., Tian, X.-J., Chen, Y.-J., Wang, W., Watkins, S., & Xing, J. (2018). Pathway crosstalk enables cells to interpret TGF- $\beta$  duration. *Npj Systems Biology and Applications*, 4(1), 18. <https://doi.org/10.1038/s41540-018-0060-5>
- Zhang, W., Bojorquez-Gomez, A., Velez, D. O., Xu, G., Sanchez, K. S., Shen, J. P., ... Ideker, T. (2018). A global transcriptional network connecting noncoding mutations to changes in tumor gene expression. *Nature Genetics*, 50(4), 613–620. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0091-2>
- Zhang, Y., & Chellappan, S. P. (1995). Cloning and characterization of human DP2, a novel dimerization partner of E2F. *Oncogene*, 10(11), 2085–2093. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7784053>
- Zhang, Yonghui, Venkatraj, V. S., Fischer, S. G., Warburton, D., & Chellappan, S. P. (1997). Genomic Cloning and Chromosomal Assignment of the E2F Dimerization PartnerTFDPGene Family. *Genomics*, 39(1), 95–98. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.4473>
- Zhao, M., Kong, L., Liu, Y., & Qu, H. (2015). dbEMT: an epithelial-mesenchymal transition associated gene resource. *Scientific Reports*, 5, 11459. <https://doi.org/10.1038/srep11459>
- Zhao, Y., Zhu, J., Shi, B., Wang, X., Lu, Q., Li, C., & Chen, H. (2019). The transcription factor LEF1 promotes tumorigenicity and activates the TGF- $\beta$  signaling pathway in esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 38(1), 304. <https://doi.org/10.1186/S13046-019-1296-7>
- Zhou, W., Chen, Z., Liu, Z., & Wang, Y. (2018). Stochasticity and robustness analysis of microRNA-mediated ERK signaling network. *Computational Biology and Chemistry*, 76, 318–326. Retrieved from

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1476927118305152?via%3Dihub>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Korrelation der Lebenserwartung mit der Krebs-Inzidenz 2016. (WHO-Statistik).....	2
Abbildung 2: Die Familie der E2F-Transkriptionsfaktoren. ....	7
Abbildung 3: Die Regulation von E2F1 im Verlauf des Zellzyklus. ....	8
Abbildung 4: Die antagonistische Regulation von Zielgenen durch die E2F- Familie. ....	9
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Rolle von E2F1 in karyotypisch normalen Zellen abhängig vom E2F1-Proteinlevel. ....	11
Abbildung 6: Schema der E2F1-Map.....	49
Abbildung 7: Vergleichende Venn-Diagramme der E2F1-Map mit dem Rb/E2F-Netzwerk von Calzone et al.....	50
Abbildung 8: Invasives Potential und Expression von E2F1 und EMT-Markern in humanen Blasen- und Brustkrebs-Zelllinien .....	58
Abbildung 9: Korrelation zwischen der Expression von E2F1 und der EMT- Marker E-Cadherin, N-Cadherin und Vimentin in Tumorzelllinien verschiedener Ursprungsgewebe aus der CCLE-Datenbank. ....	60
Abbildung 10: Beeinflussung des invasiven Potentials humaner Tumorzelllinien durch Überexpression/Aktivierung versus Knockdown von E2F1.....	61
Abbildung 11: Effekte unterschiedlicher chemischer Rezeptor-Inhibitoren auf die Invasivität von aggressiven Blasen- und Brustkrebszelllinien ..	63
Abbildung 12: Expression der Oberflächenrezeptoren in den verschiedenen Zelllinien. ....	64
Abbildung 13: Effekt der Inhibition der EGFR-, FGFR1-, TGF $\beta$ R- und E2F1- Signalwege auf die Invasivität von mesenchymalen Blasen- und Brustkrebszelllinien.....	64
Abbildung 14: Effekt der Aktivierung der EGFR-, FGFR1-, TGF $\beta$ R- und E2F1-Signalwege auf die Invasivität von epithelialen Blasen- und Brustkrebszelllinien.....	65

Abbildung 15: Invasivität der aggressiven Zelllinien nach Knockdown der identifizierten Netzwerk-Faktoren. ....	68
Abbildung 16: Morphologie von mesenchymalen UM-UC-3 und epithelialen RT-4 Blasenkrebszellen.....	69
Abbildung 17: Validierung der molekularen Signaturen in Blasen- und Brustkrebs-Kohorten aus der TCGA-Datenbank. ....	71
Abbildung 18: Expression mesenchymaler und epithelialer Marker beider Tumorentitäten in Patienten-Kohorten der TCGA-Datenbank. ....	72
Abbildung 19: Bioinformatische Analyse der potentiellen Zielgene von E2F1 und TGF $\beta$ /SMAD2-4 anhand von ChIP-seq- und Transkriptomdaten.....	78
Abbildung 20: Bioinformatischer Workflow und Ergebnisse.....	83
Abbildung 21: Mit dem kanonischen TGF $\beta$ -Signalweg interagierende Signalwege .....	96

## V. Anhang

Tabelle 6

<b>a1) E2F1 (bekannte/ChIP-seq-BS &amp; Responder) &amp; TGFB-assoziert</b>						
ACVR1	CD109	FAM89B	ID1	NLK	RAB31	TGFB1
ACVR1B	CDK9	FERMT1	ID2	NOG	RANBP3	TGFBR2
ACVR1C	CDKN1C	FGFR2	ID3	NOX4	RASL11B	TGFBRAP1
ACVR2A	CDKN2B	FKBP1A	ID4	NUP93	RBL1	TGIF2
ACVR2B	CFLAR	FLCN	ING2	ONECUT2	RBPMS	THBS1
ADAM9	CHRD	FLNA	INHBA	OVOL2	ROCK1	THBS4
ANKRD1	CITED1	FNDC4	INHBB	PARD3	RPS6KB1	TNF
APAF1	CITED2	FOS	IPO7	PARD6A	RUNX3	TOB1
APC	CLDN1	FST	ITCH	PARP1	SERPINE1	TWSG1
APPL1	CREB1	FURIN	ITGAV	PBLD	SFRP1	UBB
APPL2	CREB3L1	GATA6	JUN	PDCD5	SIRT1	UBE2D1
ARHGEF18	CREBBP	GDF1	JUNB	PDPK1	SKIL	UCHL5
ARID4B	CRK	GDF11	KLF10	PEG10	SKP1	USP15
ARRB2	CRKL	GDF15	LEMD3	PIN1	SLC20A1	USP9X
ATF2	CSNK2B	GDF5	LIMS1	PML	SMAD2	VEPH1
AXIN1	CTGF	GDF9	LTBP1	PPP1CA	SMAD5	WNT11
AXIN2	CX3CR1	GIPC1	MAP3K7	PPP1CB	SMAD6	WNT2
BAMBI	DAXX	GLG1	MAPK1	PPP1CC	SMAD7	WNT5A
BMP2	DKK1	GOT1	MAPK3	PPP1R15A	SNW1	WWOX
BMP3	DLX1	GRB2	MECOM	PPP2CA	SNX6	WWP1
BMP6	DROSHA	HDAC1	MEF2A	PPP2R1A	SOX5	YES1
BMP7	E2F4	HIF1A	MEN1	PPP2R1B	SOX9	YWHAE
			MINOS1-			
BMPR1A	E2F5	HIPK2	NBL1	PPP2R2A	STAR	ZBTB7A
BMPR1B	EDN1	HMGA2	MTMR4	PTPRK	STK16	ZFP36L2
BMPR2	EIF2A	HPGD	MYC	PURA	STUB1	ZFYVE16
CAV1	ENG	HSPA1A	NBL1	PURB	TAB1	ZFYVE9
CCNT2	F11R	HSPA5	NEDD4L	PXN	TFDP1	ZNF451
						ZYX
<b>a2) E2F1 (bekannte/ChIP-seq-BS &amp; Responder) &amp; EMT</b>						
ABCB1	CKS2	FGF2	HSPB1	MEF2D	PLAUR	STK26
ABCC3	CLDN1	FGF9	ID1	MET	PLS3	SUFU
ACTL6A	CLK2	FGFR1	ID2	MGAT3	POGLUT1	SUZ12
ACTN4	CMTM8	FGFR2	IDH1	MICA	PPARG	TAB1
ACVR1	COL12A1	FHL1	IDH2	MICAL2	PPIB	TACC3
ADAM10	COL4A1	FHOD1	IFT88	MICALL2	PPM1D	TAZ
ADAM12	COPA	FKBP1A	IGF1R	MIR612	PPP1R8	TBK1
ADAM15	CREB1	FLNA	IGFBP4	MITF	PPP2CA	TBX2
ADIPOR1	CREBBP	FLT1	IKBKG	MLLT3	PRKAA2	TCF3
AGO2	CRIM1	FMR1	IL11	MMD	PRKCI	TCF7
AKT1	CRK	FN1	IL15	MMP14	PRKCQ	TCOF1

ALAD	CRKL	FOSL1	IL17RD	MRC2	PRUNE1	TEAD1
ANG	CSK	FOXA1	IL18	MSX1	PSME3	TERT
ANXA1	CSNK2B	FOXA2	IL1B	MSX2	PTGS2	TET1
ANXA5	CSPG4	FOXC1	IL23A	MTA1	PTP4A3	TET3
AQP3	CTGF	FOXF2	IL6	MTA3	PTPN6	TFCP2
AR	CTNNBIP1	FOXO1	ING4	MTDH	PTX3	TFPI2
AREG	CUL3	FOXO3	INHBA	MTHFD2	PVR	TGFA
ARHGEF12	CUL4A	FOXO3	IRF6	MTOR	QKI	TGFB1
ARHGEF18	CUL7	FRAT1	IRS1	MUC4	RAB22A	TGFB1
ARMC8	CUX1	FSCN1	IRS2	MYB	RAC1	TGFBR2
ARRB1	CXCL1	FSHR	ITCH	MYBL2	RAF1	TGM2
ASCL1	CXCL14	FST	ITGA2	MYC	RASAL2	THBS1
ATM	CXCL8	FSTL3	ITGA5	MYCN	RASSF1	TIMELESS
AURKA	CYR61	FURIN	ITGA6	MYD88	RB1	TIMP3
AXIN1	DKK1	FUT4	ITGAV	MYL2	RBM8A	TLE1
AXIN2	DLG5	FZD2	ITGB3	MYLK	RDX	TLE4
AXL	DLX2	FZD7	ITGB4	MZF1	RELA	TLR4
BAG3	DLX4	FZD8	JAG1	NCL	REPIN1	TNF
BAMBI	DNMT1	GAB2	JAG2	NCOA3	RHOB	TNFAIP3
BBC3	DNMT3B	GADD45A	JUN	NEAT1	RHOG	TNFRSF11A
BCL2	DPYSL3	GADD45B	JUNB	NEDD4L	RNF8	TNFRSF11B
BCL2L1	DYRK2	GAPDH	KAT2B	NES	RNH1	TNFSF11
BCL6	E2F1	GAS1	KBTBD8	NF1	ROCK1	TP53
BHLHE40	ECT2	GATA6	KCNH1	NFIL3	ROR1	TP53BP2
BIRC2	EDN1	GDF15	KCNN4	NFKB1	RPL22L1	TP53INP1
BIRC5	EED	GEM	KDM3A	NFKBIA	RPS6KB1	TP73
BMI1	EFEMP2	GEMIN2	KDM5A	NLRP3	RUNX3	TPBG
BMP1	EFNB2	GJA1	KDM6A	NME1	S100A2	TPM2
BMP2	EGFR	GJB2	KDR	NOG	S100A9	TRAP1
BMP6	EGLN3	GLIPR1	KHDRBS1	NOLC1	SALL1	TRIM16
BMP7	EGR1	GLO1	KIF5B	NOTCH1	SAT1	TRIM28
BOP1	EHD2	GLS	KLF5	NOTCH2	SCG2	TRIM37
BRCA1	EHMT2	GMNN	KLF6	NOV	SCRIB	TSC1
BRD7	EIF2AK3	GNA13	KMT5A	NR2C2	SDC1	TSC2
BRF2	EIF2S1	GOLGA2	KRAS	NRP1	SDC4	TUFT1
BRMS1	EIF4G1	GOLM1	KRT18	NT5E	SERPINE1	TUG1
BTBD7	EIF5A2	GOLPH3	KRT8	NTM	SERPINE2	TWIST1
BTRC	ELK1	GPC1	LAMA1	NTN1	SETDB1	TXN2
BVES	ELK3	GRN	LAMA5	NUMB	SFRP1	TXNIP
CA9	ELL3	H19	LAMC1	OLFM1	SIAH2	TYMS
CALU	ELN	H2AFX	LAMC2	ONECUT2	SIM2	UBE3C
CAMK1D	EML4	HAS2	LEF1	OVOL2	SIN3A	UBR5
CAPG	EMP3	HAVCR2	LETMD1	PAG1	SIRT1	UCHL3
CAPNS1	ENG	HBEGF	LGALS1	PAQR3	SIRT3	UCP2
CAPZA1	EPB41L3	HDAC1	LGALS3	PARD3	SKIL	UHRF1
CAV1	EPHA2	HDAC3	LGR4	PARD6A	SKP1	UHRF2
CAVIN1	EPHB2	HDAC4	LHX2	PARP1	SKP2	UIMC1

CBLB	EPHB3	HDAC6	LIMA1	PAWR	SLC2A1	USF3
CBR1	EPS8	HDAC9	LIMS1	PBLD	SLC30A7	USP22
CBY1	ERBB2	HES1	LMNB1	PBX3	SLC39A6	USP9X
CCL3	ERBIN	HEY1	LRIG1	PBXIP1	SLC9A3R1	VANGL1
CCNA2	ERF	HEY2	LRP1	PCDH9	SLIT3	VASH2
CCND1	ERN1	HIC1	LRRFIP1	PCGF2	SMAD2	VEGFA
CCND2	ERRFI1	HIF1A	LTBP1	PCMT1	SMAD7	VEGFC
CCNG2	ESR2	HINT2	LYN	PDCD4	SMC1A	VGLL4
CD151	ESRRA	HIP1	MAD2L2	PDCD6IP	SNAI1	WASF3
CD44	ETV4	HIPK2	MAGEE1	PDE4A	SNAI2	WNT11
CD59	EXOC7	HK2	MAP3K4	PDGFB	SNW1	WNT2
CD63	EZH2	HMGA2	MAP3K7	PDGFRB	SOC3	WNT5A
CDC42	EZR	HMGB1	MAPK1	PDLIM4	SOX2	WNT6
CDH6	F11R	HNRNPAB	MAPK14	PEAK1	SOX5	WWOX
CDK3	F2R	HOOK1	MAPK3	PEF1	SOX9	XRN2
CDK5	F3	HOXA13	MAPK8	PEG10	SPHK1	YWHAG
CDKL2	FAM3C	HOXB9	MATN2	PGF	SPOP	YWHAZ
CDKN1A	FAM83D	HOXD9	MATN3	PHLDA2	SQSTM1	ZBTB33
CDKN1B	FAS	HPGD	MBD3	PIK3CA	SREBF1	ZFAS1
CDKN2A	FASN	HPSE	MCAM	PIK3R1	SRF	ZFP36
CEBPA	FBXO11	HRAS	MCL1	PIK3R3	SRI	ZFYVE9
CEBPB	FBXO45	HSF1	MCM7	PIN1	ST6GAL1	ZMYND8
CEMIP	FBXW7	HSP90AA1	MDK	PITPNM1	STAT3	ZNF217
CIP2A	FERMT1	HSPA4	MDM2	PKD1	STC2	ZYX
CIRBP	FGF1	HSPA5	MED28	PLAGL2	STIM2	

**b1) E2F1 (bekannte/ChIP-seq-BS & Responder) & Cox(BLCA)**

AARS	CEP95	FKBP14	MAP4	PIK3C3	SETBP1	TRMT10B
ABCB10	CERK	FKBP9	MAPK1	PIK3CA	SETD3	TRMT10C
ABCC1	CHEK2	FLAD1	MAPK14	PINX1	SETMAR	TRMT13
ABCD4	CHKB-CPT1B	FLII	MAPK1IP1L	PISD	SFSWAP	TRMT2A
ABCF2	CHSY1	FNBP4	MAPK3	PITPNA	SFXN4	TROVE2
ABHD15	CHTF18	FNTB	MAPK8IP3	PITPNM1	SH3BP2	TSEN2
			MAPKAPK5-			
ABHD16A	CHTOP	FOPNL	AS1	PJA2	SH3D19	TSEN54
ABHD17B	CIAO1	FOXO3	MAPKBP1	PLBD2	SH3GLB2	TSGA10
				PLEKHA8P		
ABHD4	CISD1	FRS3	MAST3	1	SH3PXD2B	TSHZ1
ABL2	CLASRP	FUBP3	MBD6	PLEKHF2	SHROOM1	TSPAN14
ABRACL	CLIC4	FUT10	MBLAC2	PLEKHG3	SIDT2	TSR1
ABT1	CLIP1	FUT11	MBOAT2	PLS3	SIGMAR1	TSR2
ACACA	CLK1	GABPB1-IT1	MBOAT7	PMS1	SIK2	TTC13
ACADS	CLK2	GALM	MCAM	PMS2P11	SIK3	TTC28-AS1
ACAT1	CLK4	GANAB	MED18	PMS2P3	SIRT5	TTC31
ACBD5	CLTC	GAR1	MED25	PNISR	SIRT6	TTC37
ACLY	CLUAP1	GARS	MED6	PNKP	SLAIN2	TTLL13P
ACOT13	CLUHP3	GBF1	MED7	PNMA1	SLC12A2	TTLL5



ACTN3	CNIH1	GCH1	MEF2A	PNRC2	SLC12A7	TUBGCP5
ACVR1	CNOT11	GDPGP1	MEF2D	POC1B	SLC20A1	TUBGCP6
ADAM9	CNOT3	GEMIN5	METAP1	POC5	SLC25A14	TUG1
ADCY3	CNOT8	GEMIN7	METTL8	POGLUT1	SLC25A30	TULP3
AFG3L1P	CNP	GEMIN8	MEX3D	POLB	SLC25A35	TYK2
AFTPH	CNPY4	GGA1	MFAP1	POLD2	SLC25A36	TYW3
AGAP1	COA5	GGA3	MFN2	POLL	SLC25A38	UACA
AGFG1	COA6	GINM1	MFSD10	POLR2H	SLC31A1	UAP1L1
AGL	COA7	GK	MFSD14A	POLR3A	SLC39A14	UBALD2
AGO1	COLGALT1	GLCE	MFSD2A	POLR3D	SLC4A1AP	UBE2G1
AGO3	COMMD3	GLG1	MFSD4B	POLR3G	SLC9B1	UBE2I
AGPAT5	COMMD5	GMIP	MIB1	POM121	SLTM	UBE2K
AHCY	COMMD7	GMNN	MID1IP1	PPAN	SMAD2	UBE2N
AHCYL1	COPS2	GNA12	MIER2	PPCDC	SMG9	UBE2Q1
AHSA2P	COQ4	GNAI3	MIPEP	PPIL2	SMIM26	UBE2Q2
AK3	CORO1B	GNB1	MITD1	PPME1	SMPD2	UBE3C
AKAP13	CORO1C	GNG5	MKRN1	PPP1CB	SNAPC2	UBE4B
AKAP17A	COX18	GNL3	MLKL	PPP2R3A	SND1	UBLCP1
AKAP8	COX4I1	GNPDA1	MLLT6	PPP3CC	SNHG17	UBXN4
AKAP8L	CPEB4	GOLGA8A	MLXIP	PPT2	SNHG20	UCHL5
AKR7A2	CPSF2	GOLPH3L	MMGT1	PRDM15	SNRNP70	UFSP2
ALG1	CRADD	GPATCH2L	MMS19	PRDM4	SNRPE	UGGT1
ALG9	CREBZF	GPBP1	MOB3C	PRICKLE3	SNTB2	UNC119
ALKBH2	CRK	GPR108	MOGS	PRKACA	SNW1	UPF1
ALKBH6	CRLS1	GPR89A	MPHOSPH10	PRKCD	SNX14	UQCC1
AMY2A	CROCCP3	GRK2	MPRIP	PRKD2	SNX17	UQCR10
ANAPC4	CRTAP	GRK5	MPST	PRKRIP1	SNX19	USF2
ANGEL2	CSAD	GSAP	MRFAP1L1	PRMT5	SNX2	USP13
ANKRA2	CSE1L	GTF2F2	MRPL32	PRMT6	SNX29	USP25
	CSGALNACT					
ANKRD10	2	GTF3C4	MRPL49	PRPF19	SNX6	USP3
ANKRD13D	CSRNP2	GTPBP2	MRPS12	PRPF39	SPATA20	USP35
ANKRD49	CTDSPL	GUSBP11	MRPS25	PRPF4B	SPECC1L	USP5
ANKZF1	CTDSPL2	GXYLT1	MRPS26	PRPF8	SPG7	UVSSA
ANXA4	CTPS2	H1FX-AS1	MRRF	PRR3	SPOPL	UXT
ANXA5	CUEDC1	H3F3A	MRS2	PSD4	SPRYD7	VAMP3
ANXA7	CXorf38	HAT1	MSANTD2	PSKH1	SPTAN1	VAPB
AP1AR	CXorf40A	HAUS2	MSANTD3	PSMB5	SREBF2	VARS2
AP3B1	CXorf40B	HAUS4	MSH5	PSMD1	SRF	VCPIP1
AP3M2	CYB5B	HAUS8	MSL1	PSMD2	SRI	VPS37C
AP4E1	CYBC1	HCN3	MTERF3	PSMG1	SRP54	VRK3
APAF1	CYFIP1	HDAC4	MTG1	PTCD1	SRP68	WASHC5
APBA3	CYP2R1	HDAC6	MTHFD1	PTCD2	SRPK1	WBP1
APBB3	CYP51A1	HDHD3	MTHFSD	PTCD3	SRRT	WDR37
APOBEC3F	CYTH2	HECTD1	MTIF3	PTER	SRSF10	WDR5B
ARAP2	DAAM1	HEMK1	MTMR14	PTPN18	SRSF11	WDR6
ARCN1	DCAF16	HEXDC	MTMR9	PTPN21	SRSF2	WDR83

ARFGEF1	DCLRE1C	HEXIM1	MTOR	PTPN6	SRSF5	WDSUB1
ARFIP1	DCTN1	HIST1H4C	MTRF1	PUS1	SRSF6	WHAMM
ARGLU1	DCTN2	HMG20B	MUM1	PVR	SS18L1	WNK1
ARHGAP26	DDB1	HMGN1	MXD3	PWP1	SS18L2	WRAP73
ARHGAP5	DDX10	HMGN4	MXRA7	PYCR2	SSBP4	XPC
ARHGEF17	DDX12P	HNRNPU	MYD88	PYGB	SSR2	XPO5
ARHGEF18	DDX19A	HPS3	MYH10	QKI	SSRP1	XPOT
ARL4C	DDX24	HSD17B7	MYL12B	QTRT1	ST7	YARS
ARL6IP1	DDX39A	HSPA1L	MYO5A	RAB11B	STAG1	YDJC
ARMC9	DDX50	HSPBAP1	MZF1	RAB23	STAG3L3	YIF1A
ARPC4	DDX55	HSPG2	NAA38	RAB4B	STAT2	YJU2
ARSK	DEDD2	IARS	NADSYN1	RAB5C	STIM2	YKT6
ARV1	DEGS1	IARS2	NAPEPLD	RAB6A	STK4	YPEL5
ARVCF	DENND4B	ICMT	NARF	RAB8A	STK40	YTHDC1
ASB13	DFFB	IFNAR2	NAT9	RABL2A	STRN3	YTHDF2
ASCC2	DGAT1	IFNGR1	NAXD	RABL2B	STX18	ZBTB17
ASCC3	DGCR8	IFT122	NBAS	RAD54B	STX5	ZBTB33
ASIC1	DGKZ	IFT80	NBPF11	RAD9A	SUCLA2	ZBTB4
ATAD3A	DGUOK	IKBKB	NBR2	RANBP3	SUGP1	ZBTB48
ATAT1	DHX16	IKBKE	NCBP2	RAP1A	SUGP2	ZC3H11A
ATF6	DHX34	IMMP1L	NCBP2-AS2	RAP2A	SULT1A3	ZC3H4
ATF6B	DICER1-AS1	IMPDH1	NCDN	RASAL2	SUMF2	ZCCHC8
ATF7	DIP2A	INO80B	NCKAP1	RAVER1	SUPT16H	ZDHHC13
ATG4B	DIP2C	INTS3	NCL	RBBP5	SUPT6H	ZDHHC23
ATG9A	DLAT	INTS5	NDOR1	RBFA	SUPT7L	ZDHHC3
ATIC	DMTF1	IPO11	NDUFS1	RBM33	SURF4	ZDHHC6
ATP5F1A	DMXL2	IPO13	NEK9	RBM39	SUZ12P1	ZFP14
ATP5IF1	DNAAF5	IPO4	NELFA	RBM5	SWT1	ZFP91
ATP6AP2	DNAJB4	IPO7	NEMF	RC3H1	SZT2	ZFPM1
ATP6V0A1	DNAJC19	IPO9	NFE2L1	RC3H2	TADA3	ZFYVE27
ATP6V1B2	DNAL4	IQCB1	NFKBIE	RCOR1	TAF13	ZGRF1
ATP6V1D	DNASE1	IQGAP1	NFXL1	RDX	TAF1C	ZHX3
ATP8B2	DNPEP	IRAK2	NFYA	RECQL	TAF6L	ZMIZ2
AUP1	DOCK8	IRF3	NID1	RECQL5	TALDO1	ZNF101
AZI2	DPYSL2	ITPRIP	NIT2	REEP3	TANGO6	ZNF106
B3GNTL1	DRAM2	ITSN1	NKTR	REV1	TAPT1	ZNF107
		JMJD7-				
B4GAT1	DSTN	PLA2G4B	NOCT	REV3L	TBC1D16	ZNF138
B9D2	DSTYK	KANSL2	NOL9	REX1BD	TBC1D3	ZNF141
BACE1	DTNBP1	KAT2A	NOMO1	REXO2	TBC1D3B	ZNF155
BAG3	DUSP14	KCTD20	NOP9	RFK	TBC1D3H	ZNF160
BAIAP2	DUSP16	KCTD3	NOTCH2	RGL2	TCAIM	ZNF165
BBC3	DUSP28	KDELC1	NPC1	RGPD4	TCERG1	ZNF180
BBOF1	DUSP3	KDELC2	NR2C1	RGPD6	TCFL5	ZNF182
BBS9	DXO	KDELR2	NR2C2AP	RGS12	TCP11L1	ZNF184
BCKDK	DYNC2LI1	KDSR	NR2F6	RHBDD3	TCTE3	ZNF195
BET1	E4F1	KHDC4	NRDC	RHOT1	TDP2	ZNF20

BICD2	ECHDC2	KIAA0391	NRF1	RHOT2	TEAD1	ZNF202
BID	EDEM2	KIAA0753	NSUN5	RIOK2	TECPR2	ZNF205
BLCAP	EED	KIAA0895L	NSUN5P1	RIPK2	TEFM	ZNF222
BLOC1S6	EFHD2	KIAA1328	NSUN6	RNF103	TELO2	ZNF224
BMS1P1	EFNA4	KIF1B	NT5C3A	RNF11	TESK1	ZNF226
BORA	EFR3A	KIF1C	NT5DC3	RNF113A	TGIF2	ZNF227
BRMS1L	EID1	KIF21B	NUB1	RNF149	THAP7	ZNF230
BTN2A1	EIF2AK3	KIFAP3	NUBP1	RNF187	THAP9	ZNF248
BTN3A1	EIF2B3	KLC1	NUCKS1	RNF19A	THOC1	ZNF250
BUD23	EIF2S1	KLHDC10	NUFIP2	RNF20	THRAP3	ZNF26
C11orf24	EIF3A	KLHDC4	NUMBL	RNF215	THUMPD2	ZNF266
C11orf49	EIF3B	KLHL20	NUP188	RNF216	TIA1	ZNF282
C11orf95	EIF3CL	KLHL36	NUP205	RNF26	TIFA	ZNF3
C12orf73	EIF3J	KLHL42	NUP50	RNF34	TIGD2	ZNF317
C16orf70	EIF4A3	KLHL7	NUPL2	RNF40	TIMM17B	ZNF322
C19orf12	EIF4G1	KMT2D	OCIAD2	RNF44	TIMM21	ZNF335
C19orf24	ELAC2	KPNA3	ODF2L	RNGTT	TIMM22	ZNF337
C19orf66	ELF4	KPNA6	ODR4	RNH1	TIPIN	ZNF33A
C1orf174	EMC1	KPNB1	OFD1	ROCK1	TKT	ZNF345
C1RL	EMC2	KRBOX4	OGDH	RPA1	TLNRD1	ZNF346
C2CD5	EMP1	LACTB	OGFOD1	RPAIN	TMA7	ZNF350
C2orf42	ENDOD1	LAMC1	OGFOD2	RPAP1	TMCO3	ZNF37BP
C2orf68	ENGASE	LAMP2	OGFR	RPE	TMCO6	ZNF394
C6orf120	ENTPD6	LANCL1	OGT	RPIA	TMED10	ZNF41
C6orf136	EPHB4	LARP7	ORMDL1	RPL23AP7	TMEM104	ZNF419
				RPL23AP8		
C6orf62	EPRS	LARS	OSBPL7	2	TMEM109	ZNF432
C7orf43	ERCC5	LENG1	OSGEPL1	RPL28	TMEM129	ZNF44
CAAP1	ESD	LENG8	OTUD5	RPL30	TMEM134	ZNF443
CACTIN	ESRRA	LETMD1	OXLD1	RPL32	TMEM144	ZNF480
CAD	ESYT1	LIG1	OXSM	RPL32P3	TMEM165	ZNF507
					TMEM185	
CALU	ESYT2	LIN52	P3H4	RPL37	B	ZNF518A
CAPN15	ETNK1	LINC00893	P4HA2	RPN2	TMEM216	ZNF547
CAPRIN2	EXOC1	LIPT1	PABPN1	RPP25L	TMEM243	ZNF552
CARD8	EXOC5	LLGL1	PAFAH1B1	RPP38	TMEM259	ZNF557
CASP3	EXTL2	LMBR1L	PAFAH1B2	RPS6KA1	TMEM267	ZNF561
CASP6	FAM104B	LPGAT1	PANX1	RRBP1	TMEM50B	ZNF562
CASP8	FAM111A	LPIN3	PAQR6	RRM1	TMEM51	ZNF580
CASP9	FAM114A1	LRCH1	PARD3	RRNAD1	TMEM53	ZNF586
CATSPER2	FAM114A2	LRCH3	PARP4	RRP7BP	TMEM60	ZNF587
CBR4	FAM122B	LRCH4	PASK	RRS1	TMEM87B	ZNF593
CC2D1A	FAM126A	LRP1	PATZ1	RSRC2	TMOD3	ZNF613
CCDC130	FAM136A	LRP10	PAXBP1	RSRP1	TMX2	ZNF615
CCDC14	FAM156A	LRRC1	PCED1A	RSU1	TNFAIP2	ZNF638
CCDC174	FAM162A	LRRC14	PCED1B	RTF2	TNFAIP8L1	ZNF653
CCDC22	FAM168A	LRRC27	PCF11	RTL8C	TNIP2	ZNF664

CCDC28A	FAM168B	LRRC57	PCMT1	RTN3	TNPO3	ZNF672
CCDC57	FAM192A	LRRC59	PCMTD1	RWDD3	TOP3B	ZNF680
CCDC6	FAM200B	LSM11	PCNX1	SACM1L	TOR1AIP1	ZNF692
CCDC66	FAM217B	LSM6	PCYT2	SARS	TP53INP1	ZNF696
CCDC7	FAM32A	LSS	PDCL3	SAT2	TPD52L2	ZNF700
CCDC85C	FAM43A	LTBP1	PDE7A	SAV1	TPGS2	ZNF75D
CCNG2	FAM53A	LUZP6	PDIA5	SAYSD1	TPP1	ZNF76
CCNL2	FAM76B	LYPLA1	PDS5B	SBDS	TPST1	ZNF770
CCNT2	FANCD2	LYPLA2	PDXK	SCAI	TRABD	ZNF786
CCNYL1	FANCF	LZIC	PEAK1	SCFD1	TRAF4	ZNF789
CCPG1	FARSB	LZTR1	PELO	SCRN1	TRAFD1	ZNF799
CCSER2	FASTKD1	MACF1	PEX16	SCRN2	TRAK2	ZNF823
CCT6A	FASTKD3	MAD2L1BP	PFDN6	SCYL3	TRAM2	ZNF84
CCT6P1	FBXL12	MADD	PGLS	SDHAP2	TRAPPC2	ZNF92
CD2AP	FBXL19	MAFG	PGM2L1	SEC24A	TREX1	ZNRF2
CDC16	FBXO31	MAN1A2	PGM3	SEC31A	TRIM16	ZNRF2P1
CDC42BPB	FBXO46	MAN2A1	PHF13	SEC61A2	TRIM16L	ZRANB2
CDC42SE1	FBXO6	MAN2C1	PHKA2	SEC63	TRIM27	ZRSR2
CDK18	FBXW11	MAP2K7	PHKB	SEMA4D	TRIM38	ZSCAN16
CDK3	FBXW7	MAP3K10	PHKG2	SENP3	TRIM39	ZSCAN26
CEBPG	FCF1	MAP3K11	PIAS1	SEPSECS	TRIM52	ZSWIM1
CEP135	FER	MAP3K4	PIGA	SEPT7P2	TRIM8	ZUP1
CEP290	FHL3	MAP3K5	PIGF	SERBP1	TRIP11	ZW10
CEP89	FITM2	MAP3K7	PIGS	SERINC1	TRMT1	

## **b2) E2F1 (bekannte/ChIP-seq-BS & Responder) & Cox(BRCA)**

AAMP	CEP57	FLAD1	LSM14B	PCNP	RRAGC	TMEM179 B
AARS2	CEP68	FLCN	LSM2	PCNX1	RRM2B	TMEM183 A
AASDH	CEP89	FLT1	LSM4	PCYT1A	RRP1	TMEM184 C
ABCB8	CERK	FLT4	LSR	PCYT2	RRP36	TMEM186
ABCF3	CES2	FNDC3B	LSS	PDCD2L	RRP9	TMEM206
ABCG4	CFAP298	FNIP1	LTN1	PDCL3	RSPRY1	TMEM242
ABHD11	CFL2	FOXP4	LUZP1	PDHB	RTL8C	TMEM251
ABHD16A	CHAF1A	FRAT2	LYPLA2	PEAK1	RUFY2	TMEM43
ACAA1	CHCHD7	FTX	LYRM7	PEAR1	RUSC2	TMEM60
ACAP2	CHEK2	FUS	LYSMD3	PELO	RUVBL1	TMEM69
ACAT1	CHERP	FUT11	MAD2L1BP	PELP1	SAAL1	TMOD2
ACBD5	CHMP2A	FZD4	MAD2L2	PEX11B	SAC3D1	TNIP2
ACBD6	CHMP2B	FZR1	MAF	PEX16	SAMD1	TNKS2
ACIN1	CHMP3	GABARAPL1	MAFG	PFDN2	SAP130	TNRC18
ACO1	CHMP4A	GADD45GIP1	MAFG-DT	PFDN6	SAP30BP	TNS2
ACOX1	CHMP6	GALK2	MAGEF1	PGAP2	SAP30L	TOMM22
ACP2	CHTF18	GAPDH	MAGOH	PGBD4	SARS2	TOMM40
ACP6	CHTF8	GAPVD1	MAGT1	PGK1	SART1	TOMM5

ACTG1	CHTOP	GAS8	MAN2B1	PGLS	SBDS	TP53TG1
ACVR1	CISH	GATAD2A	MAP1A	PGM3	SBDSP1	TPCN1
ACY1	CIT	GBAP1	MAP1LC3B	PHACTR2	SBNO2	TPMT
ADAM9	CLASRP	GCAT	MAP2K2	PHB	SCAF11	TPRG1L
ADAR	CLCN2	GDPGP1	MAP3K10	PHB2	SCARB2	TRABD
ADCK2	CLCN6	GEMIN6	MAP3K4	PHF20L1	SCARNA2	TRAF3IP1
ADD1	CLIC4	GEMIN7	MAP3K5	PHF23	SCLY	TRAF7
ADH5	CLK2	GFER	MAP4	PHF5A	SCO2	TRAFD1
ADIPOR1	CLN8	GGA1	MAPK1	PHKA2	SDAD1	TRAM2
ADPRHL2	CLPP	GGPS1	MAPK14	PHKB	SDF4	TRAPPC10
AFAP1L1	CLTCL1	GIN1	MAPKBP1	PHKG2	SDHAF4	TRAPPC12
AFDN	CMC4	GINM1	MAPRE3	PHTF1	SDHAP1	TRAPPC3
AFF4	CMTR2	GIPC1	MARCH6	PIAS1	SDR39U1	TRIM21
AFG1L	CNOT11	GK	MARCKSL1	PIAS3	SEC11C	TRIM28
AGBL2	CNOT3	GLA	MARK4	PIAS4	SEC24A	TRMT1
AGFG1	CNP	GLG1	MAT2A	PICALM	SEC24B	TRMT112
AGMAT	CNPY2	GLUD2	MAX	PIGC	SEC63	TRMT2A
AGRN	CNTROB	GLYR1	MAZ	PIH1D1	SECISBP2L	TRMT2B
AGTRAP	COA4	GMDS	MBLAC2	PIK3C2B	SEMA3F	TRPC1
AHCY	COA6	GMEB2	MBTPS2	PIK3CA	SEMA4D	TRPM7
AK2	COG6	GMIP	MCAM	PIK3R2	SENP6	TRUB2
AKAP11	COL4A3BP	GMPPB	MCAT	PIN1	SERAC1	TSC1
AKAP8L	COMMD3	GNA11	MCM3	PIP4P2	SERF1A	TSC22D1
ALG1	COMMD4	GNA12	MCM5	PJA2	SERINC1	TSC22D2
ALG12	COPG1	GNB2	MCM7	PKD2	SERINC3	TSEN15
ALG6	COQ10B	GNG5	MCUB	PKM	SERP1	TSEN34
				PLEKHA8P		
ALG8	COQ4	GNPAT	MEAF6	1	SERTAD2	TSEN54
ALG9	COQ8B	GNS	MED17	PLEKHM1	SETDB1	TSFM
ALKBH2	CORO1B	GOLGA4	MED23	PLIN3	SETDB2	TSR3
ALKBH6	COX20	GON7	MED25	PLK3	SETX	TTC19
ALYREF	CPNE2	GOPC	MEN1	PLPP1	SF3B4	TTC21B
ANAPC10	CPSF3	GOSR2	MERTK	PLPP3	SFMBT1	TTC3
ANAPC11	CPSF4	GPA33	MESD	PLRG1	SFPQ	TTC31
ANAPC7	CPTP	GPALPP1	METTL14	PLS3	SFXN2	TTC37
ANGPT2	CRADD	GPATCH11	METTL16	PMF1	SFXN4	TTC4
ANKFY1	CRELD2	GPATCH2	METTL23	PMVK	SGMS1	TTC7B
ANKMY2	CRK	GPATCH3	METTL26	PNISR	SGSH	TTLL1
ANKRD13D	CRTAP	GPATCH4	METTL7A	PNKP	SH2B3	TTLL5
ANKRD40	CRY1	GPN3	MEX3D	POC1A	SH3BP2	TUBB4B
ANKRD46	CS	GPR137	MFAP3	POLE	SH3D19	TUBE1
ANKRD49	CSK	GPR180	MFN1	POLL	SH3GLB1	TUBG1
ANKS1A	CSKMT	GPR89A	MFSD14A	POLR1D	SHPRH	TUBGCP5
ANO8	CSNK2A2	GPS1	MFSD14C	POLR2B	SIAH2	TUSC2
ANP32A	CTDP1	GRHPR	MFSD9	POLR2G	SIDT2	TWF2
AP1S1	CTDSP2	GRK2	MGRN1	POLR2H	SIK2	TWISTNB
AP4E1	CUL4B	GRK3	MICAL1	POLR2I	SIPA1L1	TWNK

AP4M1	CUL5	GRK4	MICALL2	POLR2M	SIRT6	TXNDC11
AP5Z1	CUTA	GRK5	MIIP	POLR3C	SIVA1	TXNDC12
APBA3	CWF19L2	GRN	MIOS	POLR3E	SKP1	TXNL4A
APC	CXorf40A	GSS	MIR22HG	POLRMT	SLC10A7	TYK2
APEH	CYB561D2	GSTM4	MIS12	POMGNT1	SLC16A2	U2AF2
APEX1	CYB5B	GTF2IRD1	MITD1	POP7	SLC17A5	UACA
APOOL	CYB5R4	GTF3A	MITF	PPAN	SLC1A4	UBAP2L
APPL2	CYBC1	GTPBP1	MKRN1	PPCDC	SLC20A1	UBE2G1
APT-X	CYFIP1	GTPBP3	MLXIP	PPIB	SLC20A2	UBE2I
ARAP3	CYP46A1	GUSB	MLYCD	PPIP5K2	SLC25A10	UBE2L6
ARF1	CYTH1	H1FO	MMADHC	PPM1D	SLC25A15	UBE2M
ARF5	CYTH2	H1FX	MMD	PPM1F	SLC25A16	UBE2O
ARFGAP1	DAAM2	H2AFX	MMGT1	PPM1G	SLC25A22	UBE2Q1
ARFGAP2	DAXX	H3F3A	MOAP1	PPOX	SLC25A29	UBE2R2
ARFIP2	DBF4	HABP4	MOC-S1	PPP1CA	SLC25A32	UBE2Z
ARFRP1	DBNL	HACE1	MOC-S3	PPP1R14B	SLC25A35	UBE4A
ARHGAP10	DCAF10	HADH	MOGS	PPP2R1B	SLC25A36	UBE4B
ARHGAP12	DCAF11	HADHA	MON1B	PPP6C	SLC25A39	UBL3
ARHGAP24	DCAF15	HAUS2	MON2	PPP6R1	SLC25A52	UBQLN1
ARHGDIA	DCLRE1A	HAUS5	MORC3	PPT2	SLC26A11	UBQLN4
ARHGEF1	DCP1A	HAUS8	MORC4	PQBP1	SLC27A4	UBR1
ARHGEF16	DCTN6	HAX1	MOSMO	PQLC2	SLC29A1	UBR3
ARHGEF18	DCUN1D4	HCCS	MOSPD1	PREPL	SLC29A3	UBR5
ARID5B	DDAH1	HCFC2	MOSPD3	PRIMPOL	SLC30A4	UBTF
ARIH2OS	DDX19A	HDAC1	MPHOSPH8	PRKAB2	SLC30A6	UBXN7
ARL2BP	DDX27	HDDC3	MPRIP	PRKCD	SLC35A5	UFSP2
ARMC1	DDX39A	HDGFL2	MPST	PRKCSH	SLC35G2	UNC13B
ARMC10	DDX3X	HDHD3	MPV17L2	PRKD2	SLC38A2	UNC45A
ARMC6	DDX41	HECA	MRE11	PRKRIP1	SLC39A3	UNKL
ARPC1B	DDX54	HECTD1	MRPL12	PRMT3	SLC43A2	UPF1
ARPC4	DELE1	HEG1	MRPL14	PRMT6	SLC50A1	USE1
ARPC5L	DENND4C	HERC3	MRPL16	PRMT9	SLC7A6	USF2
ARRDC3	DERL1	HEXDC	MRPL17	PRPF19	SLIRP	USF3
ARV1	DEXI	HHLA3	MRPL34	PRPF31	SLIT3	USP12
ATF7	DGAT1	HIBCH	MRPL38	PRPF6	SLK	USP15
ATG2B	DGKZ	HIKESHI	MRPL4	PRPF8	SLU7	USP25
ATG4A	DHDDS	HINT2	MRPL40	PRPS2	SMAD5	USP31
ATIC	DHX30	HINT3	MRPL57	PRR14	SMARCA5	USP46
ATP13A1	DHX34	HIRA	MRPL58	PRRG1	SMARCAD1	USP5
ATP13A2	DHX37	HIRIP3	MRPS11	PRUNE1	SMARCB1	USP8
ATP2B1	DIABLO	HIST1H1T	MRPS12	PSD4	SMG9	USP9X
ATP5F1B	DIP2C	HIST1H2AJ	MRPS15	PSKH1	SMIM26	USPL1
ATP5F1D	DIS3	HIST1H3F	MRPS26	PSMA5	SMIM8	UTP20
ATP5IF1	DLAT	HM13	MRPS33	PSMB5	SMPD2	VAMP2
ATP5MC1	DLGAP1-AS1	HMBS	MRPS34	PSMC4	SMUG1	VAMP3
ATP6V0A1	DLL4	HMG20B	MSANTD4	PSMD4	SNAPC2	VAMP4

ATP6V0B	DMAC2	HMGA1	MTA1	PSME2	SND1	VAR52
ATP6V0E2	DNAAF5	HMGB2	MTA2	PSPC1	SNRNP25	VASP
ATP6V1C1	DNAJA2	HMGN1	MTA3	PSRC1	SNRNP40	VAT1
ATP6V1F	DNAJA3	HMGN2	MTDH	PTAR1	SNRNP70	VAV2
ATP7A	DNAJB14	HMOX2	MTF1	PTBP1	SNRPA	VEGFC
ATPAF2	DNAJB4	HNRNPA1	MTFP1	PTCD1	SNRPA1	VEZF1
ATRIP	DNAJC13	HNRNPA2B1	MTG1	PTCD2	SNRPD3	VKORC1L1
ATRN	DNAJC19	HNRNPAB	MTHFS	PTGES2	SNTB2	VPS13D
ATRX	DNAJC2	HNRNPD	MTM1	PTMA	SNW1	VPS26C
ATXN1L	DNAJC9	HNRNPDL	MTMR10	PTPN18	SNX13	VPS35
ATXN2L	DNAL4	HNRNPL	MTMR9	PTPN21	SNX19	VPS37C
ATXN7L3	DNASE2	HNRNPM	MTRF1L	PTPN23	SNX2	VPS72
AUP1	DNMT1	HNRNPU	MTX1	PTPN6	SNX29	WAC
AXIN1	DNMT3A	HNRNPUL1	MTX2	PTPRM	SNX30	WASHC5
AZI2	DNPH1	HRAS	MUT	PUS1	SNX8	WBP1
AZIN2	DOCK6	HRH1	MUTYH	PUSL1	SOC55	WBP4
B3GALT6	DOCK9	HS6ST1	MVP	PXN	SOX12	WDFY2
B4GALT2	DPH6	HSD17B10	MXD3	QKI	SP4	WDR18
B9D2	DPP9	HSD17B7	MXRA7	QTRT1	SPAG7	WDR25
BACE1	DPY19L4	HSDL2	MYADM	RAB11FIP2	SPATA33	WDR37
BAD	DSE	HSF2	MYCBP2	RAB21	SPHK2	WDR44
BAG1	DSTN	HSP90AA1	MYD88	RAB3GAP1	SPOUT1	WDR46
BAG5	DSTYK	HSPA5	MYL12B	RAB3IP	SPRY4	WDR6
BAIAP2	DTNBP1	HSPB11	MYO5A	RAB4B	SPRYD7	WDR75
BAK1	DTWD1	HSPBP1	N4BP2L2	RAB8A	SFRBP1	WDR83
BAP1	DTX3L	HYAL3	NAA10	RABGAP1	SRRT	WDR89
BAX	DTYMK	IBTK	NAA16	RABL3	SRSF8	WDSUB1
BAZ2B	DUS1L	ICK	NAA38	RABL6	SRSF9	WEE1
						WHAMMP
BBS7	DUSP3	ID3	NAA60	RAMAC	SS18	2
						WHAMMP
BBX	DVL1	IDH2	NAB2	RANBP3	SS18L2	3
BCAS3	DYNC1LI1	IDS	NACC1	RANGAP1	SSBP4	WIZ
BCAT2	DYNC1LI2	IFI35	NADK2	RAPGEF2	SSH1	WRAP53
BCL3	E4F1	IFNAR1	NAGA	RARS2	SSR2	WRAP73
BCLAF1	ECSIT	IFNGR1	NAGPA	RASA3	SSR4	WRN
BFAR	EDEM2	IFRD2	NANS	RASAL2	SSRP1	WRNIP1
BHLHB9	EDF1	IFT122	NAT10	RAVER1	SSU72	WSB1
BICD2	EEA1	IFT172	NAT9	RB1	ST13	WWOX
BIRC2	EEF1B2	IFT22	NAXE	RBBP7	STAG1	XAB2
BLOC1S6	EEF1G	IKBKE	NCDN	RBFA	STAG3L4	XKR8
BLVRA	EEF2KMT	IL17RA	NCKAP1	RBM10	STARD3NL	XPA
BNIP3	EFCAB14	IL18	NCL	RBM15B	STARD8	XRCC1
BORCS6	EFHD2	ILKAP	NCLN	RBM27	STOML2	XRCC3
BRAT1	EGLN2	IMP4	NCOA4	RBM4	STRBP	XRCC4
BRF1	EHMT2	IMPAD1	NDFIP1	RBM41	STUB1	YARS2
BRMS1	EIF1B	ING2	NDOR1	RBM42	STX10	YBEY

BRMS1L	EIF2B3	ING3	NDST1	RBMS1	STX12	YDJC
BTAF1	EIF2B4	INO80	NDUFA11	RBMS2	STX2	YEATS4
BTBD6	EIF3CL	INO80B	NDUFA8	RC3H1	STX4	YIPF1
BTBD7	EIF4A3	INPP5A	NDUFAF4	RCBTB2	STX7	YIPF2
BTN2A2	EIF4EBP2	INSIG2	NDUFB10	RCC2	STXBP1	YIPF4
BUD23	EIF5	INTS11	NDUFB8	RCCD1	STXBP5	YIPF5
C11orf49	EIF6	INTS13	NDUFS1	RCHY1	SUCLA2	YJU2
C11orf95	ELK1	INTS7	NDUFS5	RDH11	SUGP1	YPEL5
C12orf45	ELK3	INVS	NDUFS6	RDH14	SUMO2	YTHDF3
C14orf119	ELL3	IPO11	NEDD4	RDX	SUN1	YWHAB
C14orf28	ELOB	IPO4	NEK7	RECQL	SUPT5H	YWHAG
C14orf93	ELP1	IPP	NELFA	RECQL5	SURF2	ZBED1
C19orf12	EMC10	IQCC	NENF	REEP4	SURF4	ZBTB12
C19orf24	EMC2	IQCE	NFATC2IP	RELB	SVIP	ZBTB17
C19orf48	EMC6	IQSEC1	NFE2L2	REPIN1	SYNGR2	ZBTB21
C19orf53	EMP1	IRF1	NFKB2	REPS1	SYNJ1	ZBTB4
C19orf54	ENDOD1	ITGA1	NFKBIA	RETSAT	SYPL2	ZBTB48
C19orf66	ENOX2	ITGB1BP1	NFKBIE	REV1	TAB1	ZC3H4
C19orf70	ENTPD6	ITGB3	NFKBIL1	REV3L	TADA3	ZC3H7A
C20orf194	EPB41L4B	ITSN1	NFRKB	REXO2	TAF1	ZC3HC1
C20orf96	EPS15L1	IWS1	NGDN	RFC1	TAF12	ZCCHC14
C21orf58	EPS8	JAM3	NHP2	RFC2	TAF6	ZCCHC17
C6orf120	ERCC1	JMJD1C	NINJ1	RFNG	TAF6L	ZDHHC12
C7orf43	ERF	JMJD4	NME1	RFX5	TAF7	ZDHHC16
C9orf3	ESD	JMY	NME2	RFXANK	TAF9B	ZDHHC17
CA5B	ESS2	JPT2	NME3	RFXAP	TAL1	ZDHHC7
CAB39	ESYT1	JRKL	NMRAL1	RGL1	TANGO6	ZFAND1
CABYR	ESYT2	KANK2	NMRK1	RGL2	TAP1	ZFP1
CACTIN	ETFDH	KANSL1L	NOC2L	RGS10	TAPBP	ZFP69
CALCOCO1	EWSR1	KAT2B	NOP16	RGS19	TAPBPL	ZFP90
CALHM2	EXO5	KBTBD6	NOP56	RHBDD3	TARBP1	ZFR
CALR	EXOC1	KCTD20	NOSIP	RHOT2	TARDBP	ZHX1
CAMK2G	EXOC5	KDELC2	NOTCH1	RIC1	TARS2	ZHX3
CAMSAP1	EXOSC1	KDM6A	NOVA2	RIC8A	TATDN1	ZKSCAN4
CAPG	EXOSC5	KDR	NPAT	RICTOR	TBC1D10B	ZMAT5
CAPN15	EXOSC7	KHDRBS1	NPHP3	RING1	TBC1D12	ZMIZ2
CAPN7	EZH1	KHSRP	NPRL2	RIOK2	TBC1D14	ZNF101
CAPNS1	F8	KIAA1143	NR1D2	RIOX1	TBC1D15	ZNF106
CAPZA1	FAAP100	KIAA1522	NR2C2AP	RIOX2	TBC1D25	ZNF133
CARD19	FAAP20	KIAA1671	NR2F6	RITA1	TBC1D2B	ZNF138
CASP2	FAAP24	KIAA2013	NRP1	RLF	TBC1D5	ZNF155
CASP6	FADD	KIF1B	NRSN2	RMI1	TBCB	ZNF174
CASP7	FAM102A	KIF22	NSUN5	RNF11	TBCEL	ZNF205
CASP8	FAM111A	KIF2A	NT5C	RNF113A	TBL1X	ZNF212
CASP9	FAM114A1	KIF5B	NT5E	RNF123	TBL2	ZNF248
CAT	FAM126B	KIZ	NUAK2	RNF139	TBL3	ZNF26
CBX4	FAM136A	KLF10	NUB1	RNF146	TBP	ZNF275



CBX5	FAM160B1	KLF11	NUBP1	RNF168	TBPL1	ZNF282
CC2D1A	FAM162A	KLF3	NUDT3	RNF170	TCF3	ZNF3
CC2D1B	FAM168B	KLF6	NUMA1	RNF187	TCP1	ZNF362
CC2D2A	FAM172A	KLHDC3	NUP210	RNF214	TCP11L1	ZNF382
CCDC106	FAM173B	KLHDC4	NUP43	RNF215	TDP1	ZNF394
CCDC115	FAM189B	KLHL20	NUP62	RNF220	TEAD1	ZNF408
CCDC130	FAM214B	KMT2D	OAF	RNF34	TELO2	ZNF507
CCDC137	FAM32A	KNOP1	OCIAD2	RNF40	TENT4A	ZNF510
CCDC22	FAM43A	KRBOX4	OGFOD2	RNF41	TEX261	ZNF512B
CCDC28B	FAM50A	KRI1	OGFOD3	RNF7	TFAP4	ZNF562
CCDC51	FAM53A	KYAT3	OGFR	RNGTT	TFDP1	ZNF586
CCDC57	FAM86C1	LACTB2	OGT	RNPEP	TFE3	ZNF589
CCDC88C	FAM86FP	LAMC1	OIP5-AS1	RNPEPL1	TFPI	ZNF593
CCDC92	FAN1	LAMP2	OPA1	RNPS1	TFPT	ZNF598
CCHCR1	FANCF	LAMTOR2	ORC3	RPF1	TGDS	ZNF629
CCPG1	FANCG	LAMTOR5	ORC5	RPL13A	TGOLN2	ZNF652
CCS	FANCM	LANCL2	OSGEP	RPL14	THAP4	ZNF653
CCSER2	FARSA	LBHD1	OTUB1	RPL19	THAP7	ZNF654
CD164	FASTK	LDLRAD3	OTUB2	RPL23A	THAP9	ZNF665
CD2BP2	FBF1	LEF1	OTUD1	RPL26L1	THOC1	ZNF672
CD99L2	FBL	LEMD3	OTUD3	RPL27A	THOC6	ZNF687
CDADC1	FBXL19	LEPR	OTUD6B	RPL28	TIMM10	ZNF691
CDC23	FBXL4	LEPROT	OTUD7B	RPL29	TIMM17B	ZNF692
CDC27	FBXL5	LETMD1	OXLD1	RPL3	TIMM44	ZNF70
CDC40	FBXO33	LIG1	PABPN1	RPL38	TIMM9	ZNF74
CDC42BPA	FBXO43	LIG4	PACS1	RPL41	TK2	ZNF75D
CDC42BPB	FBXO46	LIMA1	PAF1	RPL8	TLE3	ZNF76
CDC42EP2	FBXO6	LIMCH1	PAFAH1B1	RPLP0	TLNRD1	ZNF768
CDCA4	FBXO8	LMBR1L	PAGR1	RPP25L	TLR4	ZNF771
CDK5	FBXW11	LNPK	PAOX	RPP38	TM9SF3	ZNF778
CDK5RAP1	FBXW7	LONP1	PARD6A	RPS11	TMA7	ZNF786
CDKL3	FCF1	LPCAT4	PARP1	RPS18	TMC7	ZNF821
CDKN1A	FDPS	LPXN	PARP3	RPS2	TMED1	ZRSR2
CEBPZ	FEM1C	LRCH3	PASK	RPS21	TMED5	ZSCAN16
CENPU	FEN1	LRCH4	PATZ1	RPS29	TMEM115	ZSCAN21
CENPX	FER	LRP11	PAXIP1	RPS3	TMEM131	ZUP1
CEP104	FIBP	LRRC42	PAXIP1-AS1	RPS6KA1	TMEM135	ZYG11B
CEP120	FKBP14	LRRC57	PAXX	RPS8	TMEM143	
CEP131	FKBP2	LRRC8A	PCCA	RPSA	TMEM147	
CEP170B	FKBP9	LRWD1	PCMT1	RPUSD1	TMEM14A	
CEP250	FKBPL	LSM10	PCNA	RPUSD2	TMEM177	

**c1) E2F1 & SMAD2-4 (bekannte/ChIP-seq-BS & Responder)**

AASS	CALCOCO1	EFR3B	HSPA1B	NANS	RAD51	SUGCT
ABAT	CAMK2D	EGFR	HSPH1	NAXE	RAD51AP1	SULT1A3
ABCA5	CAPRIN2	EGR1	HTR1D	NCAPD2	RARS2	SULT1A4
ABCB6	CASP2	EIF2B3	ICK	NCAPG	RBBP5	SWAP70

ABCC3	CAVIN1	EIF5A2	ID2	NCAPH	RBBP9	SWT1
ABHD11	CAVIN2	ELK3	ID3	NCEH1	RBM3	SYT11
AC007192.1	CBY1	ELOB	IDH2	NDC80	RBMX	TBC1D15
AC013489.1	CCDC186	EMP2	IFI35	NEBL	RDH10	TBK1
AC020916.1	CCDC85B	EREG	IFRD1	NEIL3	RECQL	TCEAL9
AC068831.7	CCNB1	ERMARD	IFT81	NEK2	REL	TCTN3
AC087721.2	CCNB2	ETFDH	IFT88	NEK7	RF02215	TEP1
AC092718.3	CCND2	EVC	IGFBP5	NEURL1B	RF02216	TERT
AC104452.1	CCNG2	F2R	IL11	NOG	RHOU	TESC
AC135586.2	CD320	F3	IMPA2	NOL6	RIT1	TGFB1
AC139530.2	CD58	FA2H	IMPACT	NPAT	RNASE4	THAP1
				NPHP3-		
ACAD9	CD59	FAM171A1	ING4	ACAD11	RNF103	THAP7
ACAP2	CDC20	FAM171B	INSIG2	NQO1	RNF216	THBS1
ACP2	CDC45	FAM214B	IP6K1	NR2C2	RNF24	TIMP3
ACTR1B	CDCA8	FAM43A	IPO4	NR2F1	RPL23A	TK1
ACY1	CDK1	FAM72D	IPP	NRP1	RRAGC	TLN2
ADAM19	CDKN1A	FAM83D	IQGAP1	NTAN1	RRM2	TM7SF2
						TMEM106
ADAMTS6	CDKN2B	FAM86B1	IQGAP2	NUP50	RRS1	B
						TMEM120
AGMAT	CDKN3	FAM86B2	IQGAP3	NUSAP1	RSF1	B
AGO4	CDR2	FAM86B3P	ITGA5	OAF	RTN4RL2	TMEM129
						TMEM161
AIMP2	CEBPA	FAM86C1	IVD	OAT	RUNX1T1	A
AKAP13	CEBPD	FAM89B	JAG1	ORC3	RWDD2B	TMEM177
AKAP7	CENPA	FAM8A1	JMJD1C	OSER1	S100A2	TMEM53
AL031777.3	CENPE	FANCD2	JMJD4	OSGIN1	S1PR5	TMEM97
AL137782.1	CENPF	FARSB	JUN	OTUD1	SAAL1	TMTC4
AL163636.2	CENPI	FBXO33	JUNB	P4HA2	SAP30L	TMX4
AL358113.1	CENPK	FDXR	KAT14	PAK1IP1	SAV1	TNFRSF10D
ALDH1B1	CENPN	FERMT1	KAT2B	PAPOLG	SBNO1	TNFRSF21
ALDH5A1	CENPO	FGFR1	KCNK5	PCCB	SCG2	TOMM40L
ALDH6A1	CENPU	FGFR10P	KCNN4	PCDH1	SCG5	TOP2A
ALKBH2	CEP55	FIBP	KCTD7	PCDHB2	SCMH1	TOPORS
ANG	CEP68	FITM2	KDM3A	PCED1B	SERAC1	TOR1AIP2
ANKRD16	CEP76	FKBP10	KHDC4	PCF11	SERPINB1	TP53
ANKRD36C	CES2	FKBP14	KHDRBS3	PCLAF	SERPINE1	TP53INP1
ANXA8L1	CGRRF1	FKBP4	KIF11	PCMTD1	SERPINE2	TPP1
AP1S2	CHMP2B	FLRT3	KIF14	PCYT2	SERTAD1	TPST1
APAF1	CHMP6	FN1	KIF15	PDK4	SERTAD2	TRIM4
APEH	CIP2A	FND3C3B	KIF18A	PEA15	SFXN2	TRMT1L
APOBEC3B	CIRBP	FOS	KIF18B	PEAK1	SFXN3	TROAP
AQP3	CIT	FOXA2	KIF20A	PEG10	SH3GLB1	TSPAN4
ARF3	CITED2	FOXM1	KIF22	PELI1	SHPK	TST
ARG2	CKS1B	FST	KIF27	PERP	SIGMAR1	TTC12
ARHGAP11						
A	CLCN6	FSTL3	KIF2C	PEX1	SIRT1	TTC31

ARHGAP18	CLK1	FUS	KIFC1	PFKL	SKA1	TTLL1
ARHGEF18	CLNS1A	G6PC3	KLF6	PGAP2	SKIL	TUBD1
ARID4B	CLUAP1	GABARAPL1	KLHL24	PGBD1	SKP2	TUBGCP5
ARL14	CNPPD1	GADD45B	KRT80	PGM2L1	SLC12A2	TUFT1
ARMCX6	COL4A1	GAS5	LAMC2	PHB2	SLC16A2	TUT7
ARRB2	CPQ	GATD3B	LANCL2	PHF1	SLC16A6	TYMS
ARRDC3	CPT2	GCAT	LARP6	PHF6	SLC16A7	UAP1L1
	CSGALNACT					
ASF1B	2	GCDH	LMBR1L	PHIP	SLC22A4	UBE2D1
ATG10	CTBP1-DT	GCLM	LMCD1	PI4K2A	SLC24A1	UBXN7
ATG14	CTGF	GCSH	LPAR1	PIGM	SLC25A10	UCP2
ATP5F1D	CTH	GIN51	LPCAT3	PIGO	SLC25A15	UGCG
ATP6V0E2	CTNNBIP1	GJA1	LPXN	PIK3C2B	SLC25A30	UNG
ATP6V1B2	CTSC	GK	LRIG3	PIK3IP1	SLC25A39	UROS
ATP6V1C1	CTTNBP2NL	GLCCI1	LRRC8A	PIM1	SLC26A2	USP18
ATP6V1D	CXCL1	GLCE	LRRC8C	PIMREG	SLC27A2	USP2
ATP6V1G2-						
DDX39B	CXCL2	GLIPR1	LTV1	PIP4K2A	SLC29A1	USP38
ATP7A	CYB5A	GMD5	LUZP1	PIR	SLC2A3	USP53
ATP7B	CYLD	GOLGA8A	LY6E	PITPNC1	SLC2A8	UTP25
ATP8B1	CYR61	GOLGA8B	MAD2L1	PJA2	SLC30A9	VCPIP1
AURKA	CYREN	GPC6	MAF	PLAG1	SLC37A4	VEGFA
AURKB	DAAM1	GPR137B	MAFB	PLAU	SLC6A6	VGLL3
AVPI1	DCP2	GRHPR	MAFG	PLEK2	SLC7A2	WASHC2A
BAMBI	DDIT4	GSTA4	MAOA	PLEKHF2	SLC9A6	WASHC2C
BCKDHB	DDX39A	GSTM2	MAP3K14	PLEKHM1	SLU7	WDR18
					SLX1A-	
BCL10	DDX58	GSTM4	MAPRE2	PLS1	SULT1A3	WDR19
					SLX1B-	
BCL2	DEDD2	GTF2H3	MARC1	PMAIP1	SULT1A4	WDR47
BDKRB2	DEPDC1B	GTSE1	MARF1	PMS2P3	SMAD7	WDR48
BIN1	DEPP1	GXYLT2	MATN3	PMS2P4	SNAI2	WDYHV1
BIRC5	DEPTOR	GYS1	MCCC2	PNPLA3	SNHG1	WEE1
BLM	DES11	HADH	MCM10	PNRC1	SNHG17	WHAMM
BMP2	DET1	HCFC2	MDK	POLE2	SNORD12C	XRCC2
BOLA3	DHFR	HDDC3	MED21	POLL	SNRNP48	YDJC
BOP1	DHODH	HERC4	MEGF9	POLR1E	SNX17	YPEL2
BPGM	DHRS13	HES1	MELK	POP5	SNX5	YPEL5
BPHL	DIMT1	HGSNAT	MERTK	PP7080	SORD	YTHDC1
BROX	DLGAP1-AS1	HHEX	MEX3B	PPARD	SORL1	Z94721.2
BTG1	DLGAP5	HIBADH	MFHAS1	PPM1K	SOX2	ZBTB43
BTRC	DNAJB4	HIST1H2AD	MICALL2	PPP1R14C	SP4	ZC2HC1A
BUB1	DNAJB9	HIST1H2AK	MKI67	PPP1R15A	SPAG5	ZC3HAV1
BUB1B	DNAJC12	HIST1H2BH	MLH1	PPP1R3C	SPAG7	ZCCHC2
BZW2	DNAJC19	HIST1H2BM	MLXIPL	PRKD3	SPATA20	ZFP36
C11orf24	DNPH1	HIST1H3H	MOB3B	PRPF8	SPICE1	ZFP36L2
C11orf71	DPH5	HJURP	MON1B	PRR11	SPRYD7	ZFYVE26
C12orf10	DPH6	HMBS	MOSPD1	PRR3	SPTLC3	ZNF133

C12orf4	DPY19L3	HMGA2	MPI	PTGFRN	SPTSSA	ZNF195
C12orf49	DSC2	HMGB2	MRPL16	PTGR1	SRD5A3	ZNF224
C17orf53	DSE	HMGN2	MSH5	PTGS2	SREK1IP1	ZNF277
C1RL	DTL	HMGXB4	MST1	PTPN18	SRM	ZNF280C
C2	DUSP14	HMMR	MSTO1	PTPRK	SSSCA1	ZNF281
C2orf72	DUSP7	HNRNPA1	MSTO2P	PVR	ST3GAL6	ZNF394
C6orf48	DUSP9	HNRNPM	MT1G	PXDC1	STEAP1	ZNF442
C8orf37	DZIP1	HOXD10	MT1X	PXMP2	STIL	ZNF697
C9orf72	E2F2	HRH1	MTFMT	QDPR	STK26	ZNF70
CA2	E2F7	HSD17B12	MTSS1L	RAB23	STK32B	ZPR1
CABLES2	ECT2	HSD17B4	MYBL2	RAB30	STX11	ZYX
CABYR	EEF2KMT	HSD17B8	MYC	RAB8B	STX7	
CACNB2	EFL1	HSPA1A	MYLIP	RABEPK	SUCLG2	

#### **c2) E2F1 & SMAD2-4 (bekannte/ChIP-seq-BS & Responder) & EMT**

ABCC3	CBY1	EGFR	GADD45B	KAT2B	PEG10	STK26
ANG	CCND2	EGR1	GJA1	KCNN4	PRUNE1	TBK1
AQP3	CCNG2	EIF5A2	GLIPR1	KDM3A	PTGS2	TERT
AR	CD59	ELK3	HES1	KLF6	PVR	TGFB1
ARHGEF18	CDKN1A	F2R	HMGA2	LAMC2	S100A2	THBS1
AURKA	CEBPA	F3	ID2	MATN3	SCG2	TIMP3
BAMBI	CIP2A	FAM83D	IDH2	MDK	SERPINE1	TP53
BCL2	CIRBP	FERMT1	IFT88	MICALL2	SERPINE2	TP53INP1
BIRC5	COL4A1	FGFR1	IL11	MYBL2	SIRT1	TUFT1
BMP2	CTGF	FN1	ING4	MYC	SKIL	TYMS
BOP1	CTNNBIP1	FOXA2	ITGA5	NOG	SKP2	UCP2
BTRC	CXCL1	FOXM1	JAG1	NR2C2	SMAD7	VEGFA
CAVIN1	CYR61	FST	JUN	NRP1	SNAI2	ZFP36
CBR1	ECT2	FSTL3	JUNB	PEAK1	SOX2	ZYX

#### **d1) E2F1 & SMAD2-4 (bekannte/ChIP-seq-BS & Responder) & Cox & Correlation(BLCA)**

AKAP13	DAAM1	FANCD2	PCMTD1	SIGMAR1	TP53INP1	YTHDC1
CLK1	DNAJB4	IQGAP1	PJA2	SPATA20	WHAMM	
CLUAP1	EIF2B3	PCF11	PVR	THAP7	YPEL5	

#### **d2) E2F1 & SMAD2-4 (bekannte/ChIP-seq-BS & Responder) & Cox & Correlation(BRCA)**

ABHD11	DNAJB4	GCAT	JMJD1C	NRP1	SLC16A2	WDR18
ACAP2	DSE	GMDS	JMJD4	OTUD1	SLC25A10	YDJC
AGMAT	ELK3	HCFC2	KAT2B	PCYT2	SLC25A39	ZNF70
ARRDC3	ETFDH	HMBS	KIF22	PIK3C2B	SLU7	
ATP7A	FIBP	HMGN2	KLF6	PJA2	SP4	
CALCOCO1	FKBP14	HNRNPM	LUZP1	PLEKHM1	STX7	
CEP68	FNDC3B	IDH2	NANS	SAAL1	TBC1D15	
CHMP6	FUS	IPO4	NEK7	SAP30L	THAP7	
CLCN6	GABARAPL1	IPP	NPAT	SH3GLB1	TMEM177	

## Danksagung

Mein großer Dank geht an Frau Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Brigitte M. Pützer für die ausdauernde wissenschaftliche Unterstützung und die Möglichkeit, meine Dissertation an ihrem Institut für Experimentelle Gentherapie und Tumorforschung (IEGT) durchgeführt haben zu können und an ihrem Anspruch an wissenschaftliches Arbeiten gewachsen zu sein. Dank der kollegialen Unterstützung der gesamten Arbeitsgruppe am IEGT wurde mir diese Phase erleichtert und nicht zuletzt dank der experimentellen Unterstützung innerhalb der Arbeitsgruppe war es mir möglich, meine wissenschaftliche Arbeit zusammen mit ihnen zu publizieren. Namentlich zu nennen sind Alf Spitschak, Stella Logotheti, Anja Stoll, Manish Solanki, Ingrid Winkler, David Engelmann, Susanne Knoll, Vijay Alla, Deborah Goody und Ottmar Herchenröder. Des Weiteren geht mein Dank an die Kollegen im Department of Systems Biology and Bioinformatics Rostock, mit denen ich durch arbeitsintensive Phasen ging, dabei aber auch viele interessante Gespräche führen durfte. Hier besonders hervorzuheben sind Faiz M Khan, Shailendra Gupta, Prof. Julio Vera-Gonzales und Ulf Schmitz.

Mein herzlichster Dank geht an meine Mutter für ihre andauernde Unterstützung und Liebe als mein Fels in der Brandung. Für ihre Nachsicht, Unterstützung und Liebe bedanke ich mich herzlich bei meiner Freundin Franziska. Für erholsame, aufbauende, nicht-wissenschaftliche Phasen bedanke ich mich bei meinen Freunden Ute und Jörg und bei meinen Freunden aus dem Orchester. Nicht zuletzt danke ich meinen drei Katzen, die so viel Sonne in mein Leben bringen beziehungsweise gebracht haben.