
Analyse von regulatorischen Netzwerken bei Zelldifferenzierung und in der Infektionsbiologie

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius–Maximilians–Universität Würzburg

Vorgelegt von

Martin Ernst Kaltdorf

aus

Bad Mergentheim

Würzburg, 2019



Eingereicht am

Mitglieder der Promotionskommission

Vorsitzender

Gutachter Prof. Dr. Thomas Dandekar

Gutachter Prof. Dr. Jürgen Löffler

Tag des Promotionskolloquiums

Doktorurkunde ausgehändigt am

Erklärung / Affidavit

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „Analyse von regulatorischen Netzwerken bei Zelldifferenzierung und in der Infektionsbiologie“, eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Weiterhin erkläre ich, dass bei allen Abbildungen und Texten bei denen die Verwertrungsrechte (Copyright) nicht bei mir liegen, diese von den Rechtsinhabern eingeholt wurden und die Textstellen bzw. Abbildungen entsprechend den rechtlichen Vorgaben gekennzeichnet sind sowie bei Abbildungen, die dem Internet entnommen wurden, der entsprechende Hypertextlink angegeben wurde.

Affidavit

I hereby declare that my thesis entitled: “Analysis of Regulatory Networks during Cell Differentiation and in Infection Biology” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I verify that the thesis has not been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Besides I declare that if I do not hold the copyright for figures and paragraphs, I obtained it from the rights holder and that paragraphs and figures have been marked according to law or for figures taken from the internet the hyperlink has been added accordingly.

Würzburg,

.....

Martin Kaltdorf

Inhaltsverzeichnis

Erklärung / Affidavit	II
Eidesstattliche Erklärung	II
Affidavit.....	II
Inhaltsverzeichnis	III
1.1 Zusammenfassung.....	1
1.2 Summary.....	3
2 Einleitung	5
2.1 Biologische Netzwerkmodelle	6
2.2 Regulation der Stammzellendifferenzierung.....	8
2.2.1 Mesenchymale Stammzellen und multipotente Stromazellen.....	9
2.2.2 Zentrale Regulatoren der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen...	10
2.3 WNT-Signalwege.....	12
2.3.1 kanonischer WNT-Signalweg.....	12
2.3.2 nicht-kanonischer planarer Zellpolaritäts-Signalweg	12
2.3.3 nicht-kanonischer WNT/Calcium-Signalweg	13
2.4 TGF- β / SMAD-Signalweg.....	13
2.5 Adipogenese	14
2.6 Chondrogenese und Osteogenese	15
2.7 Dendritische Zellen des Menschen und <i>Aspergillus fumigatus</i>	16
2.8 Immunregulation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
2.8.1 Cytokinine.....	20
2.8.2 Auxine	21
2.8.3 Gibberellin	22
2.8.4 Jasmonsäure	22
2.8.5 Salicylsäure	23
2.9 Ziele der Arbeit	24
3 Methoden	26
3.1 Regulatorische Netzwerke.....	26
3.1.1 Identifizierung funktionell relevanter Gene mit Hilfe von Gene Ontology Annotationen.....	26
3.1.2 Erfassung der Interaktionsdaten	27
3.1.3 Konstruktion eines Netzwerks zur Verwendung in Jimena.....	33
3.1.4 Netzwerkanalyse und dynamische Simulation.....	33
4 Ergebnisse	40

4.1	Die Steuerung der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen	41
4.2	<i>Aspergillus fumigatus</i> und dendritische Zellen	51
4.3	Die Regulation der pflanzlichen Immunantwort am Beispiel <i>A. thaliana</i>	58
5	Diskussion	63
5.1.1	Rekonstruktion des Netzwerks aus Interaktionsdaten	64
5.1.2	Konsolidierung des Kernnetzwerks	66
5.1.3	Vergleichbarkeit der SSS mit experimentellen MicroArray-Daten	67
5.1.4	Kontrollzentralitäten zur Identifizierung bedeutender Netzwerkkomponenten.....	69
5.2	Mesenchymale Stammzellen.....	70
5.3	<i>Aspergillus</i>	76
5.4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	82
5.5	Fazit.....	86
	Abkürzungsverzeichnis.....	94
	Tabellenverzeichnis.....	97
	Abbildungsverzeichnis.....	98
	Literaturverzeichnis	99
6	Anhang.....	127
6.1	Rekonstruierte Netzwerkmodelle	127
6.1.1	MSC Netzwerk	127
6.1.2	DC Netzwerk	127
6.1.3	AT Netzwerk	127
6.2	Quellverzeichnis der rekonstruierten Netzwerkmodelle.....	127
6.2.1	Interaktionen und Literaturnachweise MSC Netzwerk.....	127
6.2.2	Interaktionen und Literaturnachweise DC Netzwerk.....	127
6.2.3	Interaktionen und Literaturnachweise AT Netzwerk	127
6.3	Ergebnisse: Berechnung der Kontrollzentralität	127
6.3.1	Kontrollzentralität des MSC Netzwerks.....	127
6.3.2	Kontrollzentralität des DC Netzwerks	128
6.3.3	Kontrollzentralität des AC Netzwerks	128
6.4	Ergebnisse: Berechnung der Stablen Systemzustände	128
6.4.1	Stabile Systemzustände des MSC Netzwerks.....	128
6.4.2	Stabile Systemzustände des DC Netzwerks.....	128
6.4.3	Stabile Systemzustände des AT Netzwerks	128
6.5	Vergleich der Simulationsergebnisse mit experimentelle Daten (GEO)	128
6.6	Script-Programme zur Netzwerkumwandlung und Datenauswertung.....	128
7	Lebenslauf.....	129
	Title: "AspMetNet – <i>Aspergillus fumigatus</i> Metabolism Network. The Systematic identification of anti-fungal drug targets by a metabolic network approach"	131

8	Publikationen	132
9	Danksagung.....	134

*“Systems biology...
is about putting together rather than taking apart,
integration rather than reduction.
It requires that we develop ways of thinking
about integration that are as rigorous
as our reductionist programmes,
but different....
It means changing our philosophy,
in the full sense of the term”*

Denis Noble [1]

1.1 Zusammenfassung

Das zentrale Paradigma der Systembiologie zielt auf ein möglichst umfassendes Verständnis der komplexen Zusammenhänge biologischer Systeme. Die in dieser Arbeit angewandten Methoden folgen diesem Grundsatz.

Am Beispiel von drei auf Basis von Datenbanken und aktueller Literatur rekonstruierten Netzwerkmodellen konnte in der hier vorliegenden Arbeit die Gültigkeit analytischer und prädiktiver Algorithmen nachgewiesen werden, die in Form der Analysesoftware Jimena angewandt wurden. Die daraus resultierenden Ergebnisse sowohl für die Berechnung von stabilen Systemzuständen, der dynamischen Simulation, als auch der Identifikation zentraler Kontrollknoten konnten experimentell validiert werden. Die Ergebnisse wurden in einem iterativen Prozess verwendet um das entsprechende Netzwerkmodell zu optimieren.

Beim Vergleich des Verhaltens des semiquantitativ ausgewerteten regulatorischen Netzwerks zur Kontrolle der Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen in Chondrozyten (Knorpelbildung), Osteoblasten (Knochenbildung) und Adipozyten (Fettzellbildung) konnten 12 wichtige Faktoren (darunter: RUNX2, OSX/SP7, SOX9, TP53) mit Hilfe der Berechnung der Bedeutung (Kontrollzentralität der Netzwerkknoten identifiziert werden). Der Abgleich des simulierten Verhaltens dieses Netzwerkes ergab eine Übereinstimmung mit experimentellen Daten von 47,2%, bei einem widersprüchlichen Verhalten von ca. 25%, dass unter anderem durch die temporäre Natur experimenteller Messungen im Vergleich zu den terminalen Bedingungen der Berechnung der stabilen Systemzustände erklärt werden kann.

Bei der Analyse des Netzwerkmodells der menschlichen Immunantwort auf eine Infektion durch *A. fumigatus* konnten vier Hauptregulatoren identifiziert werden (*A. fumigatus*, Blutplättchen, hier Platelets genannt, und TNF), die im Zusammenspiel mit weiteren Faktoren mit hohen Zentralitätswerten (CCL5, IL1, IL6, Dectin-1, TLR2 und TLR4) fähig sind das gesamte Netzwerkverhalten zu beeinflussen. Es konnte gezeigt werden,

dass sich das Aktivitätsverhalten von IL6 in Reaktion auf *A. fumigatus* und die regulatorische Wirkung von Blutplättchen mit den entsprechenden experimentellen Resultaten deckt.

Die Simulation, sowie die Berechnung der stabilen Systemzustände der Immunantwort von *A. thaliana* auf eine Infektion durch *Pseudomonas syringae* konnte zeigen, dass die *in silico* Ergebnisse mit den experimentellen Ergebnissen übereinstimmen. Zusätzlich konnten mit Hilfe der Analyse der Zentralitätswerte des Netzwerkmodells fünf Masterregulatoren identifiziert werden: TGA Transkriptionsfaktor, Jasmonsäure, Ent-Kaurenoate-Oxidase, Ent-kaurene-Synthase und Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase. Während die ersteren beiden bereits lange als wichtige Regulatoren für die Gibberellin-Synthese bekannt sind, ist die immunregulatorische Funktion von Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase bisher weitgehend unbekannt.

1.2 Summary

The central paradigm of systems biology aims at a comprehensive understanding in complex relationships of biological systems. The methods used in this work support this aim.

By the example of three network models reconstructed on the basis of databases and current literature, the validity of analytical and predictive algorithms could be demonstrated in this work. As simulation software the framework Jimena was applied. The results for the calculation of stable system states, the dynamic simulation as well as the identification of central control nodes could be validated experimentally. The results were used in an iterative process to further optimize the corresponding network model. Comparing the behavior of the semi-quantitatively evaluated regulatory network to control the differentiation of human mesenchymal stem cells into chondrocytes (cartilage formation), osteoblasts (bone formation) and adipocytes (fatty cell formation), 12 important factors (including: RUNX2, OSX/SP7, SOX9, TP53) could be identified by the calculation of the control centralities of the network nodes. The comparison of the simulated behavior of these nodes showed an agreement with experimental data of 47.2%. We found a contradictory behavior of approximately 25%. Differing results can be explained due to the temporary nature of experimental measurements compared to the terminal conditions of the calculation the stable system states.

Analyzing the network model of the human immune response to *A. fumigatus* infection, four major regulators could be identified (*A. fumigatus*, platelets, and TNF), which interact with other factors with high control centrality values (CCL5, IL1, IL6, Dectin1). TLR2 and TLR4) are capable of affecting the overall network behavior. It could be shown that the activity behavior of IL6 in response to the modular activity of the platelets as well as *A. fumigatus* coincides with the corresponding experimental results.

The simulation, as well as the calculation of the stable system states of the immune response of *A. thaliana* to an infection by *Pseudomonas syringae*, showed that *in silico* results are in agreement with the experimental results. By analyzing the control centrality values of the network model, five main regulators could be: TGA transcription factor, jasmonic acid, ent-kaurene-Oxidase, ent-kaurene synthase and aspartate semialdehyde.

While the former two have long been recognized as important regulators of gibberellin synthesis, the immunoregulatory function of aspartate semialdehyde dehydrogenase has been largely unknown.

2 Einleitung

Das Verstehen der Komplexität von Lebewesen bedarf eines interdisziplinären Ansatzes, der nicht alleine genetische Information, oder Erkenntnisse bezüglich einzelner Proteine oder RNAs betrachtet. Vielmehr ist es notwendig einen ganzheitlichen Blick auf die Zusammenhänge zu entwickeln. Dieser Gedanke gilt als zentraler Leitgedanke der Systembiologie [1]. Teil des systembiologischen Paradigmas ist eine iterative Entstehung der Modelle: basierend auf den experimentellen Resultaten wird ein Netzwerke erstellt, das wiederum in darauf aufbauenden Experimenten verifiziert wird und aufgrund der so erhaltenen neuen Datengrundlage weiter verbessert werden kann [2].

Omics-Technologien offenbaren uns die Gesamtheit aller in einem Lebewesen vorhandenen Gene (Genomics [3]), aller in der Entstehung begriffener Proteine (Transcriptomics [4–6]), aller aktiver Proteine (Proteomics [4, 7, 8]) und letztendlich aller Interaktionen (Interactomics [9, 10]) und ermöglichen uns so einen tieferen Einblick auf die Vorgänge und Mechanismen in Lebewesen auf molekularer Ebene.

Das menschliche Genom besteht aus 3,3 Milliarden Basenpaaren, das auf 23 Chromosomen verteilt für mehr als 20.500 bekannte Gene kodiert [11]. Jedes dieser Gene kann in mindestens ein Protein übersetzt werden [12]. Um in Anbetracht dieser hohen Komplexität den Überblick über die Zusammenhänge zu bewahren und daraus neue Erkenntnisse zu gewinnen werden bioinformatische, insbesondere systembiologische, Methoden benötigt.

Diese Dissertation stellt einen Ansatz vor, der einen integrierten Blick auf die Zusammenhänge auf Basis derzeit bekannter Datengrundlagen von Genregulation und Protein-Protein-Interaktionen (PPI) erlaubt, und es ermöglicht *in silico*, d.h. im Computer unter Anwendung spezialisierter Algorithmen [13–15] das Verhalten von ausgewählten biologischen Modellsystemen zu simulieren.

Protein-Protein-Interaktionen sind universal in allen Lebewesen vorzufinden [16–18] und kontrollieren (1) die metabolischen Prozesse indem sie die Herstellung der benötigten Enzyme kontrollieren [19], (2) die Regeneration von Gewebe im Falle von Zellerneuerung oder Verletzungen, indem sie die Differenzierung pluripotenter Stammzellen anregen und die Entwicklung der Zellen anleiten [20], (3) das Schicksal von Zellen während

der Entwicklung [20] und letztendlich (4) die Steuerung einer effektiven Immunantwort des Organismus durch die Steuerung und Induktion der Differenzierung von Zellen des Immunsystems (T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, usw.) [21] beziehungsweise durch die Vermittlung einer intrazellulären, spezifischen Abwehrreaktion [22, 23].

Unter anderem können Fehler in den PPI-Netzwerken, die durch Mutationen der Gene hervorgerufen werden, den Grundstein für diverse erblich bedingte Krankheiten inklusive der Entstehung vieler Tumorarten legen, weshalb ein detailliertes Verständnis der molekularen Zusammenhänge von enormer medizinischer Bedeutung ist [24, 25].

2.1 Biologische Netzwerkmodelle

In der Systembiologie unterscheidet man verschiedene Arten von biologischen Netzwerken: metabolische Netzwerke [26], PPI [27], genregulatorische Netzwerke [28] und Signaltransduktions-Netzwerke [29]. Jedes dieser Netzwerktypen basiert jeweils auf einer anderen Datengrundlage.

(1) Metabolische Netzwerke, deren Analysen die Stoffflüsse während der Stoffwechselfvorgänge in Zellen und Organismen erörtern, werden mit Hilfe bekannter Metabolomdaten aufgebaut (Beispiel: [2, 30]). Die wichtigsten Komponenten in derartigen Netzwerken sind Enzyme, Proteine welche biochemische Reaktionen katalysieren [26, 31]. Die Analyse metabolischer Netzwerke kann Aufschluss über wichtige metabolische Komponenten geben, die ursächlich für eine Erkrankung sind, oder toxische metabolische Intermediate (Zwischenprodukte) in Pathogenen aufdecken, die für den Wirt unschädlich sind und für neuartige Therapien verwendet werden können [32], beispielsweise indem der Krankheitserreger sein eigenes Gift produziert [32].

(2) PPIs bestehen aus Proteinen, die durch ungerichtete Interaktionen miteinander verbunden sind. Die Funktion der Interaktionen auf die verbundenen Komponenten spielt dabei eine untergeordnete Rolle. PPI legen damit die Grundlage für ein Verständnis der engen Vernetzung innerhalb einer Zelle, sind jedoch in ihrer Aussagekraft auf die Signalweiterleitung und Regulation stark limitiert [27].

Um die internen Regulationsmechanismen einer Zelle und zwischen Zellen zu untersuchen werden hingegen genregulatorische Netzwerke verwendet.

(3) Genregulatorische Netzwerke (GRNs) sind aus molekularen Regulatoren aufgebaut, welche die Genexpression steuern. Da die Genexpression direkt über die Menge der aktiven RNA bestimmt, sind folglich ebenso alle daraus translatierten Proteine festgelegt. Die Rolle eines Regulators kann dabei sowohl von DNA, RNA als auch von Proteinen wahrgenommen werden. Zentrale Komponenten eines GRNs stellen dabei Transkriptionsfaktoren dar, welche die Aktivität von Genen über die Transkription dieser Gene in RNA steuern können [28].

(4) Signaltransduktionsnetzwerke erweitern die funktionale Definition der GRNs um zusätzliche regulatorisch aktive Elemente, wie kleine biologisch aktive Moleküle (*engl. „small molecules“*), beispielsweise Hormone oder weitere biotische und abiotische Signale wie physikalischer Stress, der sich in Form von mechanischem Druck oder Zug, Hitze oder Kälte, oder Trockenheit auf die Zellstruktur auswirken kann [29, 30, 33–37].

Der allgemeine Aufbau eines systembiologischen Netzwerks besteht aus Knoten, die für die einzelnen Komponenten wie Proteine, Gene, RNAs und andere regulatorisch aktive Bestandteile stehen, und sogenannten Kanten, welche die Interaktionen im Netzwerk darstellen. Im Fall der hier verwendeten GRNs und Signaltransduktionsnetzwerken werden lediglich zwei Arten unterschiedlicher Kanten verwendet: (1) Aktivierungen und (2) Inhibitionen [14, 15, 38].

Die Anzahl der Knoten und Kanten, sowie deren Verhältnis, welches auch als Netzwerkdichte bezeichnet wird, folgt in biologischen Netzwerken dabei einem festgelegten Muster: Auf je einen Knoten kommen im Durchschnitt 1,4 – 2,75 Interaktionen, bzw. Kanten [39].

2.2 Regulation der Stammzellendifferenzierung

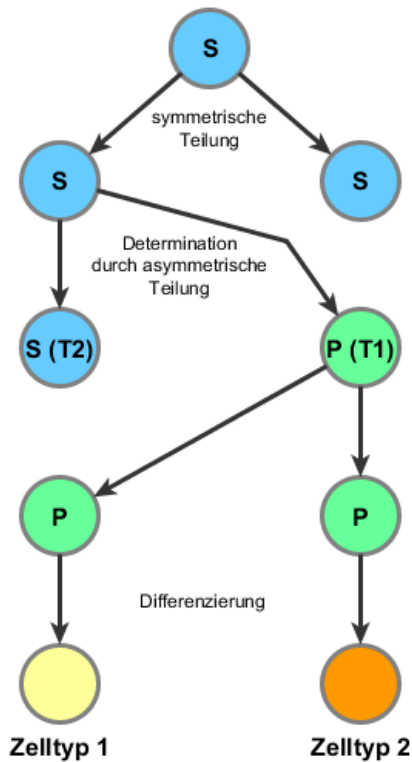


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Zelldeterminierung und Zelldifferenzierung von Stammzellen mittels asymmetrischer Zellteilung.

Stammzellen werden dadurch definiert, dass sie einerseits selbstregenerative Fähigkeiten besitzen und sich somit selbst mittels symmetrischer Teilung vermehren können, und andererseits mittels asymmetrischer Teilung die Entwicklung spezialisierter Zellen einleiten [40, 41]. Die Fähigkeit sich in diverse Zelltypen teilen zu können wird als Potenz bezeichnet und legt die Grundlage für die Entwicklung jeden höheren Lebewesens und aller komplexen Organe und diverser Gewebetypen [40, 41]. Während eine Tochterzelle (T2, Abbildung 1: **Schematische Darstellung der Zelldeterminierung und Zelldifferenzierung** von Stammzellen mittels asymmetrischer Zellteilung.

Die ursprüngliche Stammzelle behält die Charakteristika der Mutterzelle, während die zweite Tochterzelle (T1) zu einer Progenitorzelle wird, deren Potenz durch die bei der Teilung geschehende Determination eingeschränkt wird und die Entwicklungsrichtung der Zelle bereits vorgibt. Die Progenitorzelle differenziert sich anschließend in den benötigten Zelltyp.

Die Determination und Differenzierung von Stammzellen kann durch unzählige intrazelluläre Signalwege und extrazelluläre Signale beeinflusst werden. Rezeptorproteine in der Zellmembran können externe Stimuli wahrnehmen und intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren. Dies zeigt, dass neben den internen Regulationsmechanismen auch externe Faktoren berücksichtigt werden müssen, wenn die Stammzellendifferenzierung untersucht wird.

Stammzellen können in verschiedene Potential-Klassen eingeteilt werden [42], wobei unterschiedliche Stammzelltypen generell nach ihrem Herkunftsgewebe bezeichnet werden: (1) Totipotente oder pluripotente Stammzellen (Bsp.: embryonale Stammzellen [43]) kommen während der embryonalen Entwicklung aller höheren Lebewesen vor und

können sich in alle Zellen aller drei Keimblätter differenzieren (Endoderm, Mesoderm und Ektoderm) und sind daher fähig einen vollständigen Organismus zu entwickeln [43–45].

Hämatopoetische Stammzellen, die sich in Zelltypen wie Monocyten, Lymphozyten und neutrophile Granulozyten differenzieren können [40–42, 46], aber auch mesenchymale Stammzellen, die sich in Knorpelgewebe (Chondrozyten), Knochen (Osteoblasten) und Fettzellen (Adipozyten) differenzieren können [47, 48], zählen zu den (2) multipotenten Stammzellen. Sie können sich eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen entwickeln.

Oligopotente Stammzellen hingegen sind sehr stark auf bestimmte Zelltypen eingeschränkt und werden auch als Progenitorzellen bezeichnet [49].

2.2.1 Mesenchymale Stammzellen und multipotente Stromazellen

In den vergangenen Jahrzehnten war ein demografischer Wandel zu einer zunehmend alternden Gesellschaft zu verzeichnen, die zukünftig voraussichtlich ebenso fortschreiten wird. Damit geht einher, dass die Verbreitung und Häufigkeit von altersbedingten Krankheiten zunehmen wird [50].

Da Stammzellen im adulten Menschen für die Zellerneuerung und somit für die allgemeine Regenerationsfähigkeit eine herausragende Rolle spielen, stellen sie in Hinsicht auf altersbedingte Krankheiten ein Schlüsselbaustein für die Gesundheit der weltweiten Bevölkerung dar [51–59].

Vor allem Erkrankungen am lokomotorischen Apparat sind logische Folge einer langjährigen mechanischen Belastung jedes menschlichen Lebens: Osteoporose und Arthrose sind bereits heute unter den häufigsten Erkrankungen und werden in Zukunft noch zunehmen [60, 61].

Mesenchymalen Stammzellen, auch bekannt als multipotente Stromazellen [62] sind differenzierungsfähige Zellen, die auch im adulten Menschen noch in vielen Geweben in relativ hoher Zahl vorzufinden sind. MSCs besitzen die Fähigkeit sich in eine limitierte Anzahl unterschiedlicher Zellen zu differenzieren, die vor allem mit dem lokomotorischen Apparat zusammenhängen [63, 64]. Dazu gehören unter anderem Osteoblasten [63, 65, 74, 66–73], Chondrozyten [54, 67, 75–81] und Adipozyten [64, 67, 69, 72, 82–84].

Die ursprünglichsten verfügbaren MSCs können aus Fruchtwasser, sowie Nabelschnur- gewebe (Wharton-Sulze [85]) oder Nabelschnurblut postnatal gewonnen werden [86]. Adulte MSC-Quellen stellen adiposes Gewebe, Blut und Knochenmark, sowie Molarzel- len dar [87, 88]. Die gute Verfügbarkeit dieser multipotenten Zellen selbst im adulten Menschen begründet das große wissenschaftliche Interesse: MSCs können bei einer ge- planten regenerativen Therapie aus körpereigenem Gewebe gewonnen werden, was das Risiko für Abstoßungsreaktionen und anderen Nebenwirkungen auf ein Minimum reduziert [89].

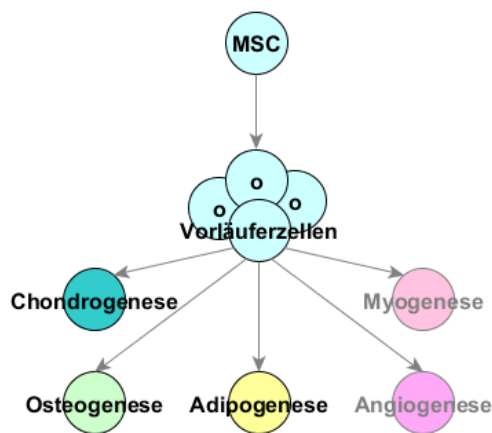


Abbildung 2: Wege der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen.

Verschiedene biotische Stimuli wie Cytokine [90, 91], Chemokine [92], Hormone und mRNAs, sowie abiotische Stimuli wie physika- lische Kräfte (Druck, Zugspannung [81, 93– 95]) und biologisch aktive Moleküle (bspw. Reaktive Sauerstoff Spezies (ROS, *reactive oxygen species*) [57, 96]) steuern die Initia- tion der Differenzierung und determinieren gleichzeitig die Richtung der Entwicklung durch die Auslösung intrazellulärer Signa- laskaden. Durch die Signalkaskaden werden

Transkriptionsfaktoren (TFs) aktiviert, die dafür sorgen, dass spezifische Effektorgene von der DNA abgelesen werden, welche die Differenzierung der MSC organisieren [94, 97–102].

2.2.2 Zentrale Regulatoren der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen

Die Erkenntnisse der vergangenen Jahre konnte Schlüsselkomponenten in der Differen- zierung von MSC identifizieren und bestätigen. Es hat sich gezeigt, dass einzelne Fakto- ren nicht ausreichend sind um das Entwicklungsschicksal einer Zelle zuverlässig zu be- einflussen. Für eine spezifische Steuerung der Zellentwicklung ist das Zusammenspiel vieler verschiedener Signalwege von großer Bedeutung [54, 57, 67, 103–105]. Viele Sig- naltransduktionsprozesse basieren dabei auf wenigen, mittlerweile gut erforschten,

zentralen Signalwegen [106–114]. Spezifische Signalfaktoren, welche an diese Signalwege anknüpfen, beziehungsweise in diese eingehende oder ausgehende Signale vermitteln, konstituieren die vielen individuellen Verhaltensweisen, die es einem Organismus erlauben auf unterschiedlichste äußere und inneren Reize reagieren zu können [98, 115–123] (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Zentrale Regulatoren der Differenzierung Mesenchymaler Stammzellen.
(angepasst gemäß: Houschyar et al. 2019* [124]; Sarjeant et al. 2012 #: [125])

	FUNKTION	WIRKUNG	
EXTRAZELLULÄRE LIGANDEN			
IL1, IL6, TNF	inflammatorische Faktoren	hemmen Osteogenese	*
TGFB	osteogener Faktor	induzieren osteoblastogene Differenzierung (frühe Phase), hemmen in später Phase	*
BMP2	osteogener Faktor	osteochondrogener Faktor, kann weitere BMPs induzieren	*
BMP4	osteogener Faktor	osteochondrogener Faktor	*
BMP7	osteogener Faktor	osteochondrogener Faktor, v.a. späte Phase	*
NOGGIN	spezifischer Inhibitor für BMP2,4,7	inhibiert Osteoblastogenese	*
FGF	osteogener Faktor	Kann SOX9 aktivieren	*
IGF1, IGF2	osteogener Faktor	Osteogener Faktor, induziert Ossifikation	*
VEGF	angiogener und vaskulogener Faktor		*
WNTS	osteogener Faktor	induziert Osteogenese von MSC, kann finale Osteoblastogenese inhibieren	*
IHH	osteochondrogener Faktor	kann Osteogenese inhibieren	*
PTHRP	osteochondrogener Faktor	kann Osteogenese inhibieren oder aktivieren	*
INTRAZELLULÄRE MARKERPROTEINE			
MAPKS	Transduktion osteogener Faktoren		*
BCATENIN	Transduktion osteogener Faktoren	Transduktion osteogener Signale	*
RUNX2	osteogener Transkriptionsfaktor, frühe Phase	Master Regulator für frühe Osteogenese	*
OSX	osteogener Transkriptionsfaktor, späte Phase	Master Regulator für Osteogenese, inhibiert Chondrogenese	*
NFKB	Transduktion inflammatorischer Faktoren	Inhibiert MSC-Differenzierung	*
C/EBP	adipogener Faktor	Master Regulator für Adipogenese	#
PPARG	adipogener Faktor	Master Regulator für Adipogenese	#

2.3 WNT-Signalwege

Die WNT-Signalwege stellen eine Gruppe sehr weit verbreiteter und hoch konservierter Signalwege tierischer Organismen dar und dienen der Transduktion von extrazellulären Signalen in eine Zielzelle.

Die Gemeinsamkeit der drei bekannten WNT-Signalwege besteht darin, dass ein Extrazellulär wahrgenommenes WNT-Protein als Ligand für einen membrangebundenen Rezeptor der Frizzled-Familie (Fzd) dient [126]. Proteine der Frizzled-Familie interagieren direkt mit Dishevelled (Dsh) [127], welches die intrazelluläre Signalübermittlung übernimmt [128, 129].

WNT-Signalwege sind in einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt und bestimmen so maßgeblich über das Schicksal einer Zelle. Zu den von WNT-Signalwegen gesteuerten Prozessen zählt neben der Kontrolle von Entwicklungsprozessen der Körperachse, der Steuerung der Zellmigration und -proliferation [130], auch die Steuerung der Entwicklung von Knorpelgewebe, Knochen und von Muskelgewebe [124] und reguliert so unter anderem die Kardiogenese von Tieren [131, 132]. Eine Fehlregulation der WNT-Signalwege konnte für eine Vielzahl von Krankheitsbildern, einschließlich Krebs und Autoimmunerkrankungen [133], als mögliche Ursache identifiziert werden.

2.3.1 kanonischer WNT-Signalweg

Der kanonische WNT-Signalweg, wird auch als β -Catenin-abhängiger Signalweg bezeichnet. Bei Aktivierung des Kanonischen Signalwegs wird bei Anwesenheit eines WNT-Signals GSK3 β gehemmt [134, 135]. Die von GSK3 β induzierte Ubiquitinierung von β -Catenin, welche dessen Degradierung einleitet [136], wird so unterbrochen, dass eine Akkumulation von β -Catenin ermöglicht wird, was unter anderem die Osteogenese der Zielzelle einleiten kann [137].

2.3.2 nicht kanonischer planarer Zellpolaritäts-Signalweg

Im nicht kanonischen planaren Zellpolaritäts-Signalweg -(PCP) induziert WNT eine Umformatierung des Zytoskeletts via *jun N-Terminale Kinase* (JNK) und leitet die Polarisation und asymmetrische Organisation einer Zelle ein [138]. Der PCP überlappt an einigen

Punkten mit Komponenten des kanonischen WNT-Signalwegs (bspw. Fzd und JNK) weshalb viele Prozesse nicht eindeutig ausschließlich einem dieser Signalwege zugeteilt werden können [139].

2.3.3 nicht-kanonischer WNT/Calcium-Signalweg

Der nicht-kanonische WNT Signalweg auch Calcium (WNT/Ca²⁺)-Signalweg genannt stellt den am wenigsten bekannten der drei WNT-Signalwege dar und dient hauptsächlich der intrazellulären Calcium-Ausschüttung. Es konnte nachgewiesen werden, dass der WNT/Ca²⁺-Signalweg essentiell für die Induktion von ventralem Gewebe während der embryonalen Entwicklung ist [140, 141].

Da der kanonische WNT-Signalweg den größten Einfluss auf die Entwicklung und Regeneration von Knochenstrukturen besitzt, wird diesem WNT-Signalweg die größte Bedeutung im Zusammenhang mit der Steuerung der Entwicklung von mesenchymalen Stammzellen zugerechnet [142].

2.4 TGF- β / SMAD-Signalweg

Die *Transforming-Growth-Factor β* (TGF β) Superfamilie, umfasst eine große, hoch konservierte und bedeutende Gruppe von Wachstumsfaktoren, die eine zentrale Funktion in der Steuerung von embryonalen, und regenerativen Entwicklungsprozessen einnimmt, sowie allgemeine zelluläre Prozesse beeinflusst (bsp. Apoptose, Differenzierung und Proliferation) [106]. Bekannte Vertreter dieser Gruppe sind unter anderem TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3, *Growth Differentiation Factors* (GDFs) [143], sowie alle Vertreter der *Bone Morphogenic Proteins* (BMPs) die wie Ihr Name bereits andeutet eine bedeutende Rolle in der skelettalen Entwicklung einnehmen [144, 145]. Die vielfältigen Vertreter dieser Gruppe deuten bereits die diversen Funktionen an, die die Vertreter der TGF β /BMP-Superfamilie in der zellulären, sowie entwicklungsbiologischen Regulation einnehmen [146]. Die Wahrnehmung der TGF β /BMP-Faktoren erfolgt stets durch Bindung an einen jeweils spezifischen Typ-II-Rezeptor, welcher in Folge der Liganden-Bindung einen entsprechenden Typ-I-Rezeptor rekrutiert [147]. Der so entstandene Rezeptorkomplex leitet eine Signalkaskade ein, die letztendlich zur Phosphorylierung der entsprechenden

Rezeptor-Smads (R-Smad) führt. Die Kombination der phosphorylierten R-Smads unterscheidet sich dabei je nach auslösendem Wachstumsfaktor: Während TGFβs im Allgemeinen die Phosphorylierung der R-Smads Smad2 und Smad3 induzieren, sind dies bei den Vertretern der BMPs Smad1, Smad5 und Smad8. Die phosphorylierten R-Smads binden im Anschluss an den Co-Faktor Smad4 (auch Co-Smad genannt) [106] und wandert in den Zellkern um an die Promotoren der Zielgene zu binden und deren Transkription zu aktivieren [145]. Neben dem traditionellen Signalweg kann TGFβ/BMP auch eine nicht-kanonische, von Smad unabhängige Signalkaskade via des MAP-Kinase-Signalwegs in Gang setzen [148]. In diesem Fall erfolgt die Signaltransduktion unter anderem über JNK und ERK1/2 [143], die beide ebenso den WNT-Signalweg beeinflussen können [149, 150].

2.5 Adipogenese

Adiposes Gewebe kommt bei Vertebraten in zwei generell unterschiedlichen Ausprägungen vor: dem weißen adipösen Gewebe (WAT, *white adipose tissue*) und dem braunen adipösen Gewebe (BAT, *brown adipose tissue*). Der Unterschied dieser beiden Gewebetypen besteht zum einen in der Größe der Zellen: Zellen des WATs sind 10-100 µm groß, während BAT-Zellen in der Regel 15-50 µm groß sind [125]. Zum anderen besitzen WAT-Zellen einen großen, Morphologie bestimmendes Lipidtropfen und nur wenige Mitochondrien, während BAT-Zellen viele kleine Lipid-Tropfen und eine große Anzahl an Mitochondrien enthalten [125]. Die Physiologie der beiden Fettzelltypen gibt auch einen Hinweis auf deren differierende Funktion: Während BAT vor allem mit der von Kältezeiten unabhängige Thermogenese in Zusammenhang gebracht wird und im adulten Menschen einen nur geringen prozentualen Anteil einnimmt, stellt WAT den in adulten Menschen überwiegend vorkommenden Fettzelltyp dar und dient in erster Linie der Energiespeicherung [151].

Die Adipogenese beider Fettzelltypen ist abhängig von den gleichen Wachstumsfaktoren:

Die beiden wichtigsten Regulatoren sind PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor γ*) und C/EBP (*CCAAT/enhancer-binding proteins*). Neben diesen Master-Regulatoren können weitere Faktoren die Adipogenese einer MSC (AP-1, STATs, etc.) weiter begünstigen.

Braune Adipozyten können sich nur aus einem speziellen mesenchymalen Vorläuferzelltyp entwickeln (Myf5) [125]. Weiße Adipozyten entwickeln sich im Gegensatz dazu allgemein aus mesenchymalen Vorläuferzellen, wie beispielsweise den MSCs [152, 153]. Da unter anderem das Signaltransduktionsnetzwerk der MSC zentrales Thema dieser Dissertation ist, steht lediglich die Differenzierung weißer Adipozyten aus MSCs im Fokus dieser Arbeit.

2.6 Chondrogenese und Osteogenese

Knorpelwachstum (chondrogene Differenzierung von MSC) und Knochenregeneration (osteogene Differenzierung von MSC) stellen regenerative Fähigkeiten dar, die im menschlichen Körper auch im adulten Alter noch vorhanden sind und bilden die Grundlage für die Heilfähigkeiten unseres Körpers von Gelenkverschleiß und Knochenbrüchen [87, 104, 154].

Die chondrogene und osteogene Differenzierung von MSC hängt eng miteinander zusammen. Es konnte sogar gezeigt werden, dass in vielen Fällen der Osteogenese eine Chondrogenese vorausgeht und das neu entstandene Knorpelgewebe in Knochengewebe umwandelt wird [76, 155] (siehe Abbildung 3). Die Chondrogenese stellt somit einen intermediären Zustand dar, welcher von den gegenwärtigen Faktoren einerseits aufrechterhalten werden kann und andererseits zur fortschreitenden Kalzifizierung (Verkalkung des Gewebes inklusive der extrazellulären Matrix) und Ossifikation (Verknöcherung) angeregt werden kann [76, 155].

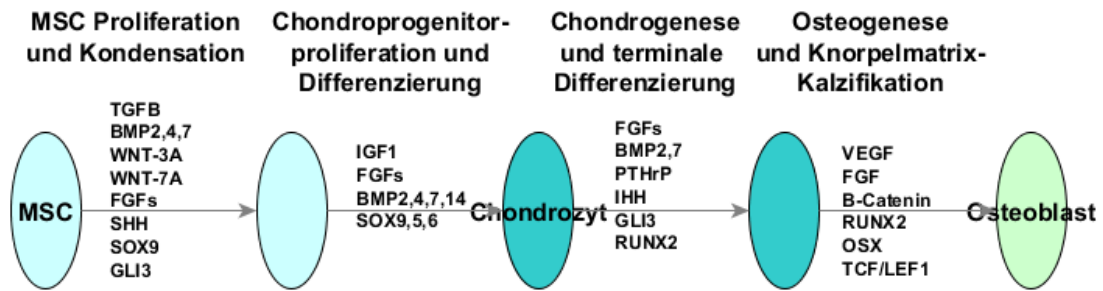


Abbildung 3: Zeitlicher Abfolge der Chondrogenese und Osteogenese modifiziert nach Goldring et al. 2006 [155]. Oberhalb der Verbindungspfeile sind die Wachstums- und Differenzierungsfaktoren für den jeweiligen Schritt, unterhalb der Verbindungspfeile die Markerproteine für die jeweilige Differenzierungsphase aufgelistet.

Für die chondrogene Determinierung von MSCs ist ein Abfallen der Konzentration des adipogenen Faktors C/EBP notwendig, der die chondrogene Differenzierung inhibiert [155]. TGFβ, BMPs und WNT-3A, WNT-7A, sowie einige Vertreter der FGFs fungieren als chondrogene Faktoren und leiten die Chondrogenese der MSC ein. Während der Differenzierung steigt der Level des chondrogenen Marker Proteins SOX9. SOX9 inhibiert dabei zusätzlich (mit SOX5,6 und weiteren inhibitorischen Faktoren) die weiterführende osteogene Differenzierung [155]. Bei Abfallendem SOX9-Level und mit erhöhter RUNX2-Konzentration, sowie weiteren osteogenen Faktoren kann die weiterführende Differenzierung angestoßen werden, was letztendlich in der Ossifikation der ehemaligen Chondrozyten resultiert.

Die negative Regulierung durch C/EBP zeigt, dass die Adipogenese in antagonistischer Beziehung zur osteochondrogenen Differenzierung von MSC steht [69].

Die beteiligten Signalwege (WNT, TGFβ, und weitere) verdeutlichen die komplexe Verschaltung und Abhängigkeit der Entwicklung von Knochen und Knorpel auf intra- und vor allem extrazellulärer Ebene [69].

2.7 Dendritische Zellen des Menschen und *Aspergillus fumigatus*

Der Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) ist ein Saprophyt, ein Lebewesen, welches seine Nährstoffe durch das Zersetzen biologischer Abfallprodukte gewinnt [156]. Er zählt zu den am weitesten verbreiteten Lebewesen unserer Erde [157]. Seine Sporen, auch als Konidien bezeichnet, sind allgegenwärtig und werden zu hunderten von

jedem Menschen tagtäglich eingeatmet [156]. Er nimmt eine wichtige ökologische Rolle in der Zersetzung von biologischem Material und der Wiederverwertung von Kohlenstoff und Stickstoff ein [158]. Das Immunsystem eines gesunden Menschen erkennt die Konidien von *A. fumigatus* bereits von Geburt an und verhindert so eine Infektion zuverlässig [159].

Obwohl *A. fumigatus* für den Menschen in den meisten Fällen keine Gefahr darstellt, können unter speziellen Umständen teils lebensbedrohliche Erkrankungen entstehen, welche in drei Kategorien eingeteilt werden können [159]:

- (1) Die allergische, bronchopulmonale Aspergillose
- (2) Die nicht-invasive Aspergillose, bei der Schleimhäute zwar kolonisiert, das umliegende Gewebe aber nicht infiltriert wird [158] und
- (3) Die invasive Aspergillose, die vor allem bei bereits immungeschwächten Patienten auftritt.

Letzteres Krankheitsbild steht hier im Fokus. Bei einer invasiven Aspergillose erfolgt die Infiltrierung des umliegenden Gewebes, was dazu führt, dass die Keimschläuche des Schimmelpilzes in den Blutkreislauf gelangen können [159]. Bei einem derartigen Verlauf der Infektion kann sich der Pilz weiträumig verbreiten und ruft im umliegenden Gewebe intravaskuläre Thrombosen, hämorrhagische Infarzierungen und Nekrotisierungen aus. Anfällig und am meisten gefährdet für eine derartige Erkrankung sind vor allem bereits immungeschwächte Patienten, wie beispielsweise Leukämie-, Organtransplantations- oder Stammzelltransplantations-Patienten [158].

In diesen Risikogruppen kann das Immunsystem Konidien, welche die Lungenbläschen (Alveoli) erreicht haben nicht mehr abwehren. Eine Infiltration des Gewebes ist unvermeidlich, was letztendlich in der Verbreitung der Konidien über den Blutkreislauf resultiert [156].

Die Immunzellen der Lunge stehen aufgrund dessen im Fokus der Erforschung des Krankheitsverlaufs einer invasiven Aspergillose und neuer Therapien.

Makrophagen stellen, als größte Immun-Zellpopulation der Lunge, die erste Schicht der Immunantwort gegen *A. fumigatus* [160]. Von diesen werden die Konidien des Pilzes,

welche noch mit einer Schicht Rodlet-Proteinen umhüllt sind, komplett ohne eine inflammatorische Antwort getötet und phagozytiert [161]. Konidien, welche bereits angeschwollen sind und ihre Rodlet-Schicht abgestoßen haben, lösen eine auf diese Proteine spezifische rezeptorabhängige Immunantwort aus. Das Immunsystem wird angeregt, neutrophile und Antigen-präsentierende Zellen in das befallene Gewebe einzuschleusen [160, 162].

Dendritische Zellen (DC) sind die einzigen Immunzellen, die in der Lage sind naive (nicht aktivierte) T-Zellen zu aktivieren [163] und zählen zu den effektivsten Antigen-präsentierenden Zellen des menschlichen Immunsystems [164]. DC können Pathogene erkennen, diese phagozytieren und abbauen, während sie in die Lymphknoten wandern [163]. Während der Wanderung der DC in die Lymphknoten reifen diese heran, was durch eine verminderte Fähigkeit zur Phagozytose und einer Anreicherung der Oberfläche mit den CD-Antigenen (Cluster of Differentiation) CD40, CD80, CD83 und CD86 führt. Dieser Prozess dient der Vermittlung zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort. Diese Vermittlung erfolgt allerdings nur, wenn die angeborene Immunantwort alleine nicht ausreicht, um die Infektion zu neutralisieren [165].

Neben den DC sind noch eine ganze Reihe weiterer Zellpopulationen an der Immunreaktion gegen *A. fumigatus* beteiligt: Makrophagen, Neutrophile Granulozyten, Eosinophile, Mastzellen und natürliche Killerzellen, zusätzlich hat sich gezeigt, dass Thrombozyten (Blutplättchen, im weiteren auch als Platelets bezeichnet) eine zentrale Rolle in der inflammatorischen Antwort spielen [165]. Die Bekämpfung von *A. fumigatus* geschieht mittels der Produktion von Zytokinen, chemotaktischer Faktoren, welche die Migration weiterer Leukozyten an den Infektionsort induzieren und zusätzlich Auswirkungen auf die weitere Zytokinproduktion, die Antigenpräsentation, sowie die Angiogenese zeigen [162].

Da sich in den vergangenen Jahren Indizien erhärtet haben, dass Platelets unter anderem eine wichtige Rolle als immunologische Mediatoren einnehmen (u.a. bei Verletzungen verschiedener Gewebe, Sepsis und der Verteidigung des Wirt-Organismus) rückt die Untersuchung derer Funktion mehr und mehr in den Fokus [166].

Für eine wichtige Funktion der Platelets im Immunsystem spricht auch, dass Thrombozytopenia als weiterer Risiko-Faktor für invasive Aspergillose identifiziert werden konnte.

Eine mögliche Wirkung der Thrombozyten kann auf deren Andocken an die Zellwand der Hyphen von *A. fumigatus* resultieren. Diese Interaktion kann den pathogenen Pilz nachhaltig schädigen und unterstützt so die Immunantwort [167]. Eine weitere Reaktion von Platelets auf den direkten Kontakt mit *A. fumigatus* ist die Ausschüttung von Chemokinen, wie Chemokin-(C-C Motiv)-Ligand-5 (CCL5/RANTES) und des CD40 Liganden [168]. Obwohl das antimykotische Potential von Thrombozyten bekannt ist, ist es noch weitestgehend unbekannt, wie die Wirkmechanismen im Detail aufgebaut sind und wie diese mit anderen Faktoren des Immunsystems interagieren [21].

Um die Zusammenhänge zwischen Thrombozyten und dem menschlichen Immunsystem während einer invasiven Aspergillose besser zu verstehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein regulatorisches Interaktionsnetzwerk der Kernbestandteile der menschlichen Immunantwort unter Einfluss von *A. fumigatus* rekonstruiert und mittels dynamischer Simulation und Analyse der resultierenden stabilen Systemzustände (SS) untersucht.

2.8 Immunregulation von *Arabidopsis thaliana*

Pflanzen haben als sesshafte Lebewesen nicht die Möglichkeit vor widrigen Lebensumständen zu fliehen. Sie sind drauf angewiesen alle zum Wachstum und Überleben wichtigen Stoffe selbst und an Ort und Stelle aus ihrer Umgebung zu gewinnen. Nährstoffe und Wasser gewinnen Pflanzen über die Wurzeln aus dem Boden in dem Sie wachsen, während die Energie über die Photosynthese bereitgestellt wird. Obwohl Pflanzen für uns in der Regel teilnahmslos wahrgenommen werden, sorgen in jeder Pflanze komplex verschaltete Interaktionen und Signalkaskaden für ein optimales Wachstum [169–172] und regulieren Abwehrreaktionen gegen vielfältige Schädliche Einflüsse, inklusive pathogenem Befall [169, 173–177]. Die Fähigkeit der Pflanzen auf inter- und intrazellulärer, molekularer Ebene auf Änderungen der Umgebung reagieren zu können, seien diese biotischen oder abiotischen Ursprungs, ist eine zentrale Eigenschaft, die deren Überleben sichert [178–180]. Dabei ist es für die Pflanze essentiell, während hohen Aktivitäten des Immunsystems auch das eigene Wachstum und die Versorgung des ganzen Organismus mit den benötigten Nährstoffen sicherzustellen – ein Dilemma betreffend der Ver-

wendung verfügbarer Ressourcen, dessen optimale Auflösung über das Leben einer befallenen Pflanze entscheiden kann [181–183]. Aufgrund der vielfältigen Mechanismen, welche die entsprechenden pflanzlichen Prozesse steuern, sind die genauen, molekularen Zusammenhänge bis heute nur unvollständig erforscht [184–186]. Bekannt ist jedoch, dass pflanzliche Hormone in den entsprechenden Signalwegen eine bedeutende Rolle für das Immunsystem spielen. Cytokinine (CKs), Auxin, Gibberellinsäure (GA, *Gibberellic Acid*), Jasmonsäure (JA, *Jasmonic Acid*) und Salicylsäure (SA, *Salicylic Acid*) sind hier als zentrale Faktoren bekannt [182–184, 187–190].

2.8.1 Cytokinine

Cytokinine sind eine in höheren Pflanzen weit verbreitete Phytohormon-Familie, deren chemische Zusammensetzung einerseits Derivate der Nukleinbase Adenin sind, sowie chemisch nicht näher mit ersteren verwandten regulatorischen Molekülen des Phenylurea-Typs umfassen. Wie ihr Name bereits andeutet, zeigen Cytokinine unter anderem einen stimulierenden Einfluss auf die Zellteilung, der Cytokinese. So sind Cytokinine aktiv in der Steuerung der pflanzlichen Embryogenese, des Wachstums des Wurzelapikalmeristems (RAM) und des Sprossapikalmeristem (SAM), sowie der Entstehung von Wurzelknoten beteiligt [191–193]. Außerdem konnte deren Beteiligung in stressinduzierten (sowohl biotischen, als auch abiotischen) Reaktionen von Pflanzen nachgewiesen werden [194–196].

Cytokinine werden von der Pflanze, im Beispiel des Modelorganismus *A. thaliana*, mittels eines Zwei-Komponenten-Systems wahrgenommen [191, 192].

Zwei-Komponenten-Systeme bestehen in der Regel aus zwei miteinander interagierenden Proteinen, wovon in den meisten Fällen eine membrangebundene Proteinkinase (Histidin Kinase) die für die Wahrnehmung von spezifischen Umweltbedingungen/Signalbotenstoffen außerhalb der Zelle zuständig ist, und einem entsprechender *Response Regulator*, welcher für die gezielte Auslösung der Transkription von Zielgenen in der Zielzelle verantwortlich ist [197].

Zwei-Komponenten-Systeme konnten bisher, mit Ausnahme der Tiere, in allen Reichen der Lebewesen nachgewiesen werden und nehmen eine zentrale Funktion in vielen Signaltransduktionsvorgängen ein [197].

Cytokinin bindet in *A. thaliana* an die Histidin Kinasen 2-4, was eine Phosphotransfer-Kaskade auslöst [191, 192, 198] und letztendlich in der Phosphorylierung der Arabidopsis Response Regulatoren (ARR) resultiert [22]. *A. thaliana* besitzt zwei Typen von ARRs, die beide durch Cytokinin aktiviert werden, jedoch unterschiedlich auf den weiteren Verlauf der Cytokinin-induzierten Signaltransduktion einwirken. ARRs vom Typ A (A-ARRs) wirken hemmend auf Cytokinin, während B-ARRs die positive Signaltransduktion einleiten und wiederum A-ARRs hemmen [22, 191]. Die Aktivierung der A-ARRs führt downstream zu einer Induktion des Resistenzgens PR1 mittels der Signaltransduktion über den TGA-Transkriptionsfaktor [23].

2.8.2 Auxine

Neben den Cytokinin, zählen auch Auxine zu wichtigen pflanzlichen Regulatoren, die ebenso entwicklungsbiologische Funktionen einnehmen und somit eine bedeutende Rolle in der Steuerung des Wachstums einer Pflanze spielen. Sowohl im Stammwachstum in Form der Kontrolle der apikalen Dominanz, der Steuerung des Wachstums des Blattstieles, als auch bei der Kontrolle des Gravitropismus während des Wurzelwachstums, sowie der reaktionären Kontrolle von strukturbezogenen, temperatur- und stressbedingten Anpassungen zählen Auxine mit zu den wichtigsten Regulatoren [199–203]. Der gängige Regulationsmechanismus und die Induktion der Expression von Zielgenen erfolgt mittels Auxin über die Bindung an entsprechende Auxin-Responsive-Faktors (ARFs) [204]. Die Bildung vieler immunabhängigen, in Pflanzen ausgeschütteten antimikrobieller Verbindungen welche gezielt das Wachstum von Pathogenen hemmen, wird über diesen Mechanismus aktiviert [205, 206].

Hierzu gehören beispielsweise Camalexine und Glucosinolate, die selektiv das Wachstum sowohl biotropher als auch nekrotropher Krankheitserreger hemmen und so die Resistenz der Wirtspflanze erhöhen [23]. Neben der häufigsten Auxin-Vorstufe Tryptophan, welche mittels des Proteins YUCCA zu dem natürlich vorkommenden Auxin Indol-3-essigsäure (IAA) umgewandelt wird [22], dienen ebenso Indole-3-acetamid, Tryptamin und Indole-3-acetonitril als Vorstufe zur Biosynthese pflanzlicher Auxine.

2.8.3 Gibberellin

Das pflanzliche Hormon Gibberellin (GA) besitzt aus entwicklungsbiologischer Sicht eine in großen Teilen analoge Funktionen wie Auxine. So gehören die Regulation des pflanzlichen Längenwachstums, die Samenkeimung, Dormanz, die Induktion der Blüte und ebenso die Seneszenz von Blättern und Früchten zu pflanzlichen Mechanismen, die stark von der Aktivität von GA beeinflusst werden. Aus chemischer Sicht sind Gibberelline tetrazyklische Diterpensäuren und lassen sich in zwei Gruppen mit je 19 oder 20 Kohlenstoffmolekülen (19C/20C) weiter unterteilen, wobei die 19C-Gibberellin-Spezies die Gruppe mit den hauptsächlich in biologischen Prozessen aktiven Gibberellinen darstellen.

Die am besten untersuchte GA-Spezies stellt Gibberellinsäure, auch als GA₃ bezeichnet, dar, welches im weiteren synonym mit GA bezeichnet wird.

Die bedeutende Rolle von GA in der entwicklungsbiologischen Steuerung in Pflanzen konnte unter anderem durch den Nachweis hoher GA-Produktion in sich im Wachstum befindlichen Teilen der Pflanze bestärkt werden [207].

2.8.4 Jasmonsäure

Das Phytohormon Jasmonsäure (JA) dient Pflanzen in erster Linie als ein wichtiger Signalbotenstoff in der Immunreaktion gegen herbivore Insekten, sowie nekrotrophe Pathogene [208]. JA-responsive Gene werden in Pflanzen vor allem von JAZ, (*Jasmonate ZIM-Domain*) gehemmt, welches durch die Bindung mit dem Transkriptionsfaktor MYC2 die Expression von Zielgenen der JA hemmt [209].

JA-Ile wird in Folge einer Pathogeninfektion sowohl am Ort der Infektion, als auch in entfernteren Regionen der Pflanze synthetisiert [210, 211].

Die von JA vermittelte Signalantwort erfolgt dabei über die Perzeption via Jasmonyl-Isoleucin (JA-Ile), welches eine physische Interaktion zwischen COI1 (*Coronatine Insensitive 1*) und JAZ induziert, was eine Ubiquitinierung der JAZ zur Folge hat und somit zu einer Aufhebung der Hemmung der Expression von JA-abhängigen Genen führt, da MYC2 diese nicht weiter beeinträchtigt [212–214].

Am Beispiel der Zusammenhänge zwischen Mechanismen des JA-Signalwegs und den Signalwegen von CK und Auxin, ist erkennbar, dass JA neben seiner immunregulatorischen Funktion weitere Regulationsprozesse in Pflanzen beeinflussen kann. So zeigt JA erheblichen Einfluss auf weitere physiologische Prozesse der Pflanze, wie des abiotischen Stress und der Regulation von reproduktiven Entwicklungsprozessen einer Pflanze, sowie der Steuerung des primären und sekundären Metabolismus [215, 216]. Es konnte beobachtet werden, dass eine hohe Aktivität von JA zwar das Wachstum einer Pflanze verlangsamt, aber mit einer eindeutigen Erhöhung der Resistenz gegen nekrotrophe Pathogene einher geht. Ein Grund dieser erhöhten Immunität konnte in der synergistischen Wirkung zwischen Auxin und JA identifiziert werden, die eine positive Wirkung auf die Aktivität von PDF1.2 gemein haben [217].

2.8.5 Salicylsäure

Die Phenolsäure Salicylsäure spielt in Pflanzen eine zentrale Rolle in der regulatorischen Anpassung an vielfältige Extremsituationen, denen eine Pflanze ausgesetzt sein kann [37, 184, 185, 218–220]. Neben abiotischen Stresssituationen wie Hitze, Kälte und Trockenheit zählt auch osmotischer Druck zu Auslösern einer SA-vermittelten Reaktion, welche eine pflanzliche Anpassungsreaktion in Gang setzen kann [37, 218, 220]. Obwohl deren große Bedeutung in einer Vielzahl pflanzlicher Stress-Signalwegen bekannt ist, war lange Zeit nicht eindeutig geklärt, wie Pflanzen SA im Detail wahrnehmen [221]. Mittlerweile ist bekannt, dass Pflanzen zur Wahrnehmung von SA unter anderem auf NPR1, sowie dessen Paraloge NPR3 und NPR4 angewiesen sind [186, 221, 222]. Pflanzen halten auch in Abwesenheit pathogener Einflüsse stets einen basalen Level von SA aufrecht [186, 223, 224]. Die dadurch resultierende Grundresistenz kann im Fall einer Infektion lokal sehr schnell mit einer Steigerung der SA-Konzentration erhöht werden [190, 225, 226]. Eine stark erhöhte SA-Konzentration induziert eine verstärkte Interaktion zwischen NPR1 und NPR3. NPR3 wiederum kann zusätzlich als Adapter zur Cul3-E3-Ubiquitin-Ligase fungieren, welche die proteasomale Degradierung von NPR1 einleitet [22, 186, 227–229]. Durch diese Degradierung wird eine apoptotische Reaktion der betroffenen Zellen eingeleitet. So können befallene Zellen zuverlässig eliminiert und die Infektion weiterer Zellen verhindert werden [186, 221]. Dieser Mechanismus, bei dem

eine weitere Infektion durch eine Eindämmung der befallenen Zellen durch programmierten Zelltod eingeleitet wird, wird auch als *Elicitor Triggered Immunity* (ETI) bezeichnet. Zusätzlich kann eine geringe Konzentration von NPR1 in benachbartes Gewebe gelangen, was dort zu Anpassungsreaktionen und einer Erhöhung der Immunabwehr via PR1 führt. Diese Hochregulierung der Immunität in distalem Gewebe unter Einfluss geringer Konzentrationen von pathogeninduzierten Proteinen wird auch als *Systemic Acquired Resistance* (SAR) bezeichnet [186, 221].

In den vergangenen Jahren konnten noch weitere Proteine identifiziert werden, die an SA binden können und somit einen Einfluss auf die detaillierte Signalantwort von SA besitzen [230].

Im Gegensatz zu seiner positiven Wirkung auf pflanzliche Resistenzmechanismen zeigt SA eine wachstumsbeeinträchtigende Wirkung [182, 231].

Dieser antagonistische Mechanismus zeigt, wie wichtig ein tieferes Verständnis der Zusammenhänge zentraler pflanzlicher Signalwege ist. Besonders im Hinblick auf moderne Methoden der Pflanzenzüchtung [232] ist es relevant, dass Detailkenntnisse über Interaktionsmechanismen eine frühzeitige Aussage über die Auswirkung einer Veränderung der Genexpression ermöglichen.

2.9 Ziele der Arbeit

Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist es, einen eigenen Ansatz zu etablieren um Netzwerkmodelle auf Basis der aktuellen Wissenslage über regulatorische Interaktionen biologischer Systeme zu rekonstruieren, zu simulieren und somit Vorhersagen des Verhaltens eines Netzwerkmodells zu formulieren. Mit Hilfe der angewandten iterativen Validierung mit experimentellen Daten wird ein vereinfachtes aber dennoch aussagekräftiges Model angestrebt. Ein so erstelltes Netzwerk ermöglicht die Identifikation komplexer Wirkungszusammenhänge, sowie einzelner essentieller Steuerelemente innerhalb der Netzwerktopologie.

Durch die hier von mir vorgelegte Kombination verschiedener Netzwerkanalysetechniken wird eine standardisierte Vorgehensweise bei der systembiologischen Untersuchung regulatorischer Netzwerke etabliert und das Potential dieser Methodik an drei

unterschiedlichen Modellen aufgezeigt: (1) Untersuchung der Regulation der Stammzellendifferenzierung, (2) die Regulation der intrazellulären Abwehrreaktion in Menschen (3) Analyse des Immunsystems von *A. thaliana*.

In diesen Beispielen wird außerdem eine selbst erarbeitete Vorgehensweise der Rekonstruktion, Validierung und Analyse der Anwendung eines semiquantitativen regulatorischen Netzwerke mittels der Analyse- und Simulationssoftware Jimena [14, 15, 38, 233] vorgestellt.

3 Methoden

3.1 Regulatorische Netzwerke

3.1.1 Identifizierung funktionell relevanter Gene mit Hilfe von Gene Ontology Annotationen

Die Erkenntnisse aus der Analyse von regulatorischen Signalnetzwerken sind essenziell von der Qualität der rekonstruierten Interaktionen abhängig. Um zielgerichtet Gene und Proteine zu identifizieren, die in der zu untersuchenden Thematik eine Rolle spielen, stellt die „Gene Ontology“-Initiative (GO) eine Datenbank bereit [234, 235], mit deren Hilfe die Suche nach Funktions-spezifischen biologischen Komponenten ermöglicht wird. Das selbst-erklärte Ziel der GO ist es die Nomenklatur und Beschreibung von Genen und Proteine speziesübergreifend zu vereinheitlichen und so die Übersicht und Vergleichbarkeit von Genen und Proteinen in vielen biologischen und medizinischen Fragestellungen zu gewährleisten [236]. Um die Vielfalt der Eigenschaften von Genen und Proteinen adäquat abzubilden charakterisiert GO die bereitgestellten Annotationen in drei Themenkomplexe:

1. Biologische Prozesse (*biological processes*), welche wichtige zelluläre und/oder organismische Funktionen darstellen.
2. Zelluläre Komponenten (*cellular components*), die Informationen über die Lokalisation des Gens/Proteins innerhalb der Zelle im Organismus benennt und beispielsweise ein intra- oder extra- zelluläres Vorkommen der Komponente spezifiziert.
3. Molekulare Funktionen (*molecular function*), welche die Rolle des Gens/Proteins in molekularen Interaktionen mit anderen Komponenten beschreibt (bspw. Katalyse, Bindung, Phosphorylierung, etc.) [236] Die GO-Eigene Suchfunktion AmiGO2 stellt eine Möglichkeit dar die GO-Datenbank in mehrerlei Hinsicht zu durchsuchen und erlaubt die Analyse von Genen und Proteinen hinsichtlich Ihrer GO-Charakteristika aber zusätzlich auch die Umgekehrte Suche nach Genen und Proteinen basierend auf Ihre assoziierten Eigenschaften (biologische Prozesse,

zelluläre Komponenten, molekulare Funktionen). AmiGO2 wurde verwendet um initial Gene und Proteine zu identifizieren, welche mit den untersuchten Funktionen in Verbindung stehen: Am Beispiel des MSC-Models sind dies auszugsweise:

1. „ossification and osteoblast“ (Knochenbildung und Osteoblasten)
2. „adipogenesis and adipocyte“ (Fettgewebegenese und Adipozyten)
3. „chondrogenesis and chondrocyte“ (Knorpelbildung und Chondrozyten)
4. „MSC and mesenchymal stem cell“ (MSC)

Die resultierenden Gene und Proteine wurden anschließend inklusive ihrer Annotation exportiert und als Grundlage für die weitere Netzwerkrekonstruktion verwendet.

3.1.2 Erfassung der Interaktionsdaten

1. Interaktionsdaten KEGG-Pathways

Die bioinformatische Datenbank KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) [237–240] stellt mit seinen vielfältigen Funktionen und enthaltenen kuratierten Informationen eine der umfassendsten Datenbanken über biologische und medizinische Zusammenhänge einer Vielzahl von Organismen dar. In seiner derzeitigen Version ermöglicht KEGG die Analyse jeglicher Omics-Technologien, metabolische Reaktionen, sowie regulatorischer biologischer Interaktionen [237, 238, 240]. Das vorrangige Ziel von KEGG ist die Bereitstellung einer Plattform um die Zusammenhänge und Eigenschaften biologischer Systeme besser verstehen und so die emergente Funktionsweise höherer Systeme besser erklären zu können. Die regulatorischen Interaktionsdaten werden von der untergeordneten Datenbank KEGG Pathway bereitgestellt und umfasst alle zentralen Signaltransduktionswege vieler Modellorganismen, inklusive des Menschen. Da viele Signalwege Überschneidungspunkt in Form von Genen oder Proteine besitzen, die in beiden Kaskaden eine Rolle spielen, können die Signalmodell ein einziges, umfassendes Netzwerkmodell zusammengefasst werden. Da die in KEGG aufgeführten Informationen auf kuratierten Daten basieren, kann von der allgemeinen Gültigkeit der Zusammenhänge ausgegangen werden. In vielen Fällen sind die von KEGG bereitgestellten Daten

ausreichend um ein rudimentäres regulatorisches Netzwerkmodell zum Zweck der Analyse und Simulation zu rekonstruieren - in tiefgreifenden, gezielteren Fragestellungen stößt die Datenbank allerdings schnell an seine Grenzen: Während die Signaltransduktionspathways umfassend beschrieben sind und auch Informationen bezüglich humaner Krankheiten regelmäßig ergänzt werden, fehlt in vielen Fällen detailliertes Wissen über die Regulation von spezifischen Faktoren, wie die Immunantworten auf vielfältige externer Stimuli, sowie die Steuerung von Wachstumsfaktoren in der Differenzierung von diversen Stammzellen. KEGG wurde in dieser Arbeit primär für die Implementierung und Verifizierung ubiquitärer humaner Signalwege in das rekonstruierte Netzwerk verwendet (TGF β -, Notch-, Wnt-, mTOR-, Hedgehog-Signalweg, sowie die Regulation von Zellzyklus, Proliferation und Apoptose). Da insbesondere spezielle Differenzierungsfaktoren nur selten in KEGG enthalten sind, ist die Einbeziehung weiterer Interaktionsdatenquellen notwendig.

2. Analyse von Protein-Protein-Netzwerken mit STRING

Die STRING-Datenbank (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) [241–244] fasst durch die Verwendung verschiedener Methoden alle derzeit bekannten Protein-Protein-Interaktionen zusammen und stellt diese visuell und interaktiv zur detaillierten Recherche bereit. STRING umfasst direkte, physikalische Interaktionen und indirekte, funktionelle Interaktionen, die entweder bereits nachgewiesen werden konnten, oder deren molekulare Protein-Protein-Interaktion fundiert vorhergesagt werden kann [27].

Die zur Rekonstruktion des Netzwerks verwendeten Informationen stammen dabei sowohl aus bereits bekannten, kuratierten Pathways und experimentellen Erkenntnissen und Gen-Fusion-Versuchen, als auch aus systematischen Vorhersage-Methoden wie Ko-Expression, Gleichzeitiges Vorkommen, Gennachbarschaft auf dem Genom und automatisiertem Text-Mining nach gleichzeitigem Auftreten zweier Proteine in wissenschaftlichen Veröffentlichungen. Die Suchfunktion von STRING stellt unterschiedliche Zugriffsarten auf die Datenbanken bereit: Je nach bekannter Information kann STRING einzelne Proteine basierend auf ihre Namen (Funktion: Search→Protein by name) oder ihrer Pro-

teinsequenz (Funktion:Search→Proteinbysequence) suchen. Auch die Suche nach mehreren Proteinen und deren gegenseitiger Interaktionen kann via Proteinname (Funktion: „Search“→ „Multiple Proteins“) oder -sequenz erfolgen (Funktion: „Search“→ „Multiple Sequences“). Zusätzlich zu einer gezielten Suche nach Genen oder Proteinen erlaubt STRING eine Schlagwortsuche. Je nach verwendeter Webfunktion können ein (bei der Einzelsuche) oder mehrere passende Suchergebnisse (bei der Mehrfachsuche) ausgewählt werden um diese im interaktiven Netzwerk weiter zu untersuchen. Nach Eingabe der gesuchten Proteine/Schlagworte und der Auswahl des gewünschten Organismus in dem die Interaktionen untersucht werden sollen, wird das Netzwerk von STRING rekonstruiert und visuell und interaktiv angezeigt. Die Netzwerkansicht an sich ermöglicht die manuelle Anpassung des Netzwerklayouts durch Verschieben einzelner Proteine (Netzwerknoten). Durch einen Mausklick wird ein Kontextmenü des betreffenden Knotens aufgerufen, das weiterführende Informationen zum Protein auflistet und Proteindetails (Beschreibung) anzeigt, sowie auf die Einträge des Proteins in diversen etablierten Proteindatenbanken (ensembl [245], GeneCards [246], KEGG [240], nextprot [247], UniProt [248]) verweist. Außerdem wird die Sekundärstruktur des Proteins mit enthaltenen Domänen aus dem betreffenden SMART-Eintrag [243, 249](3.1.2.5), sowie eine passende 3D-Proteinstruktur aus der pdb-Datenbank [250] angezeigt basierend auf einem Homologie-Vergleich. Bei Auswahl einer der Interaktionen (Kanten) erscheint eine kurze Zusammenfassung der Interaktionspartner, sowie eine Auflistung der Nachweise die zur Erstellung der Interaktion gefunden werden konnten. Durch Auswahl des Buttons „Show“ kann eine detaillierte Auflistung aller Quellen der betreffenden Interaktion aufgerufen werden.

3. Enzymreaktionen aus der REACTOME-Datenbank

Die REACTOME-Datenbank[251, 252] hat den Anspruch kuratierte biochemische Reaktionen, Signalwege und biologische Prozesse in einer Plattform zusammenzufassen und frei zur Verfügung zu stellen. Die verfügbaren Reactome können in unterschiedlichen Datenformaten direkt von der Datenbank bezogen werden [252]. Die visuellen Daten sind dabei ähnlich der Gene Ontology nach biologischer Funktion klassifiziert. Neben der Interaktiven Online-Ansicht stellt REACTOME zusätzlich diverse Mapping-Dateien auf

alle gängigen Proteindatenbanken, sowie eine komplette Listenübersicht über die enthaltenen Signalwege (Homo sapiens) zur Verfügung. Verwendung fand die REACTOME-Datenbank hauptsächlich zur Ergänzung von Interaktionen und deren Signalrichtung, welche nicht ausreichend in KEGG oder STRING dokumentiert waren, von denen aber eine allgemeine, gegenseitige Beeinflussung bekannt ist. Die von REACTOME regelmäßig zusammengestellten humanen „Funktionellen Interaktionen“(FIs) wurden außerdem zur experimentellen automatisierten Rekonstruktion von Interaktionsnetzwerken verwendet. „Liste“→ „autoRecon.pl“

4. Vergleich der Datenbanken

Jede der verwendeten Datenbanken hat einen eigenen Fokus, der die Anwendung in der Rekonstruktion jeweils unterschiedlich beeinflusst. In Tabelle 2 sind die drei größten Datenbanken verglichen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, um deren bereitgestellte Daten zu verdeutlichen.

Tabelle 2: Vergleich verschiedener Datenbanken und der jeweils enthaltenen Interaktionsdatentypen bzw. Nachweisarten

Datenbank	PPI	Metabolisch	Textmining	Kuratiert
KEGG [240]	Ja	Ja	Nein	Ja
STRING [241]	Ja	Nein	Ja	Nein
REACTOME [252]	Ja	Nein	Nein	Ja

5. Domänenanalyse mit SMART

Die Website SMART („Simple Modular Architecture Research Tool“) [243, 249] ermöglicht die Identifizierung und Annotation von Proteindomänen. Die Datenbank umfasst mehr als 1200 unterschiedliche Proteindomänen, welche mit Datenbanken Ensembl [245], STRING [241] und UniProt [248] synchronisiert sind. Und erlaubt die Untersuchung des Aufbaus von Proteinen und deren Domänen. Stand 2015 enthält SMART [243, 249] mehr als 1200 Proteindomänen von 2031 Spezies (<http://smart.embl.de/>) [243].

Mittels der Suchfunktion (stets angezeigt in der oberen rechten Ecke) kann entweder nach Proteinen gesucht werden um deren Zusammensetzung der Domänen zu betrachten oder einzelnen ausgewählte Domänen aufgerufen werden um spezifische Details zu untersuchen.

Die Proteindomänen werden dabei in Form von farbigen Formen dargestellt. Jede einzelne Form steht dabei für eine einzelne Domänenfamilie und beschreibt deren spezifische Funktion.

Anhand dieser vereinfachten Illustration wird die individuelle Funktion eines Proteins ersichtlich, die durch das emergente Zusammenspiel der einzelnen Domänenfunktionen entstehen. SMART verdeutlicht so, dass einzelne Proteinfunktionen sehr stark konserviert sein können und in unterschiedlichen Proteinen zum Einsatz kommen. Es hat sich gezeigt, dass sich dieses Baukastenprinzip in der Natur bewährt hat um aus einem einmal erfolgreichen Mechanismus aufbauend durch unterschiedliche Kombinationen unzählige verschiedene Proteine und Funktionen zusammenzustellen.

6. UniProt

Die Datenbank Uniprot ist eine der bekanntesten Plattformen die das derzeitige Wissen über individuelle Proteine zusammenfasst [248]. Uniprot ermöglicht eine vielfältige Untersuchung aller bekannten Proteine hinsichtlich deren Proteinsequenz, der dreidimensionalen Struktur (soweit bekannt), sowie deren Phylogenie. Darüber hinaus fasst die Datenbank auch Informationen bezüglich der molekularen Funktionsweise des Proteins, und dessen zellulärer Funktion und Wirkung auf andere Proteine zusammen. Uniprot diente in dieser Arbeit in erster Linie der Verifizierung und Vereinheitlichung von Gen-Namen, sowie der erweiterten Suche nach potentiellen Interaktionspartnern und der Identifizierung von vielversprechenden Signaltransduktionswegen und deren Verknüpfung.

7. Organismenspezifische Datenbanken

In einigen Fällen hat sich die Arbeit mit Organismenspezifischen Datenbanken bewährt, um zusätzliche, ergänzende Informationen zu einzelnen Netzwerkverbindungen zu erlangen. Der Grad der Spezialisierung differiert dabei je nach Datenbank. Während die

bereits erwähnte Plattform REACTOME eine Vielzahl an Organismen abdeckt, ist ein klarer Fokus auf Humane Interaktionen zu erkennen. REACTOME ist somit ein hervorragender Einstiegspunkt zur Rekonstruktion humaner Modelle [251, 252].

Doch auch vollkommen auf einen einzelnen Organismus spezialisierte Datenbanken sind zu beobachten, die mittlerweile auch häufig als zentrale Forschungsplattform eines Fachgebiets dienen können. Bei dem pflanzlichen Modelorganismus *Arabidopsis thaliana* stellt die TAIR-Datenbank (*The Arabidopsis Information Resource*) eine solche Plattform dar.

Die Erfahrung hat gezeigt, dass der Umfang und die Qualität einer solchen spezialisierten Datenbank eine gute Grundlage für die Rekonstruktion regulatorischer Signalnetzwerke bieten.

8. Gen- und Proteininteraktionsnetzwerke in der Literatur: Explizite Validierung der Interaktionen aus Datenbanken

Basierend auf den oben genannten Datenbanken (STRING, KEGG, REACTOME [239, 241, 252]) wurden die Interaktionsdaten anhand der dort genannten Literaturquellen verifiziert. In den meisten Fällen konnte jeder einzelnen Interaktion eine oder mehrere individuelle Quelle/n zugewiesen werden. In einzelnen Ausnahmefällen wurden die Interaktionen lediglich direkt von einer kuratierten Datenbank übernommen (v.a. KEGG).

9. Aufbau der Interaktionslisten

Um eine Einheitliche Datenstruktur der Interaktionslisten über die ganze Arbeit zu gewährleisten wird die in Tabelle 3 vorgestellte Struktur als Standard definiert.

Tabelle 3: Schema des Strukturellen Aufbaus einer Zusammenfassung des Netzwerks, inklusive aller verwendeten Literaturnachweise für die verwendeten Interaktionen.

Quellknoten	Interaktion	Zielknoten	Literaturnachweis
Beispiel			
ProteinA	inhibition	ProteinB	Kaltdorf M et al. 2017
ProteinC	activation	ProteinA	Kaltdorf M et al. 2017

3.1.3 Konstruktion eines Netzwerks zur Verwendung in Jimena

1. Erstellung eines Netzwerkgraphen mit yEd

Um das Netzwerk in ein Format zu konvertieren, das in die Simulationssoftware Jimena eingelesen werden kann, wurde die yEd von yWorks verwendet [253]. Mit Hilfe von yEd können beliebige Arten von Diagramm-Schaubildern erstellt und in unterschiedliche Zielformate exportiert werden. Das Standardformat von yEd, „.graphml“ kann direkt von Jimena importiert werden – die Einhaltung einiger Richtlinien vorausgesetzt:

1. Netzwerkknoten werden durch einfache Formen dargestellt (keine Gruppierung mehrerer Knoten)
2. Netzwerkkanten enden entweder in T- oder pfeilförmigen Endpunkten
3. Alle Knoten müssen einem einzelnen gemeinsamen Netzwerk angehören (unverbundene sekundäre Netzwerke können nicht analysiert werden).

Pfeilförmige Kantenendpunkte werden von Jimena als aktivierende gerichtete Interaktion interpretiert, während T-förmige Kantenendpunkte als inhibierende, gerichtete Interaktionen erkannt werden. Da alle Interaktionsdaten gemäß der Formatvorlage 3.1.2.9 vorliegen, wurde die Konvertierung mit Hilfe eines Perl-Skripts umgesetzt, um Fehler aus der manuellen Übertragung der Daten vorzubeugen (siehe Anhang 6.6). Nach Erstellung der Netzwerktopologie kann das Layout durch Verwendung der Entsprechenden yEd-Funktion den individuellen Anforderungen angepasst werden (vorzugsweise verwendete Layout-Optionen: Organisch oder Hierarchisch). Das so erstellte Netzwerklayout wird von Jimena ebenfalls übernommen und garantiert eine übersichtliche Darstellung während der Netzwerkanalyse.

3.1.4 Netzwerkanalyse und dynamische Simulation

1. Jimena

Das von Stefan Karl [38] eingeführte Softwarepaket Jimena ermöglicht die Untersuchung regulatorischer Signalnetzwerke mittels semi-quantitativer Modellierung. Die Kernfunktion, die Berechnung der stabilen Systemzustände (*Stable Steady States*, SSS) basiert im Allgemeinen auf bereits etablierten Algorithmen aus SQUAD (*Standardized Qualitative*

Analysis of Dynamical Models) [14, 15]. Da die Ausführung von SQUAD von einigen mittlerweile veralteten Computerprogrammen abhängt und nicht mehr weiterentwickelt wird, kann Jimena als der alleinige Nachfolger von SQUAD angesehen werden. Die von Jimena berechneten Systemzustände entsprechen im biologischen Sinn zellulären und organismischen Gleichgewichtszustände, die das System basierend auf den einbezogenen Interaktionen einnehmen kann. Mit den stabilen Systemzuständen als Anfangszustand kann das zeitliche Verhalten des Netzwerks auf externe und interne Stimuli dynamisch simuliert werden und erlaubt somit eine direkte Untersuchung diverser Einflüsse und deren Wirkung auf das Netzwerk. Jimena ermöglicht für die dynamische Simulation das Umschalten zwischen mehreren Algorithmen, welche jeweils zu geringfügig unterschiedlichen Ergebnissen führen können. In dieser Arbeit gilt der SQUAD-Algorithmus als Standard. Eine weitere zentrale Funktion von SQUAD ist die Berechnung des Einflusses einzelner Knoten auf das Gesamtnetzwerk mittels der *Control Centrality*-Werte [233], die eine Messgröße der Allgemeinen Kontrollwirkung und Stabilität (*Value Control Centrality, VCC*), der Anfälligkeit gegen einzelne Loss-Of-Function-Mutanten (Proteine, die Ihre natürliche Funktion aufgrund einer veränderten Tertiärstruktur nicht mehr wahrnehmen können) (*Total Control Centrality, TCC*), sowie die Beteiligung der Knoten in wichtigen Signalkaskaden der Netzwerktopologie (*Dynamic Control Centrality, DCC*)

2. Berechnung der Stabilen Systemzustände

Die Berechnung der stabilen Systemzustände (SSS) erfolgt in der Regel in zwei aufeinanderfolgenden Schritten:

Berechnung der diskreten SSS: Während der Berechnung der diskreten Zustände wird das Netzwerk in einen Booleschen Entscheidungsbaum (*Boolean Decision Diagram, BDD*) umgewandelt und stellen so ein System miteinander verbundener Elemente dar, die jeweils entweder den Wert 0 (inaktiv) oder 1 (aktiv) annehmen können [15] (Detaillierte Erläuterung der Gleichung siehe [38]). Die Eigenschaft der Kanten wird dabei mit in die Erstellung der Struktur des BDDs einbezogen. Die drei unterschiedlichen Einflüsse, welche auf einen Knoten wirken können ergeben sich aus den möglichen Kombinationen aus eingehenden aktivierenden und hemmenden Interaktionen (nur hemmend, nur

aktivierend, beides). Für jeden diese Fälle wird eine andere Topologie in das BDD eingebaut. Da reine boolesche Werte für eine realistische Darstellung komplexer biologischer Systeme nicht ausreichen, fungieren die aus der diskreten Berechnung resultierenden stabilen Systemzustände als Startwerte für die Ermittlung der kontinuierlichen stabilen Systemzustände basierend auf Differenzialgleichungen (Schritt 2). Wie bereits im ersten Schritt für die BDD-Struktur entscheidet auch im zweiten Schritt die Art der eingehenden Knoten über die detaillierte Formulierung der Differenzialgleichungen (detaillierter Beschreibung der Gleichung siehe [38]). Durch diese Kombination zweier grundsätzlich unterschiedlicher Berechnungsmodelle werden deren jeweilige Einschränkungen gelöst: Da eine kontinuierliche Berechnung stabiler Systemzustände extensive Rechenleistung benötigt, kann durch die Verwendung der Ergebnisse aus den diskreten Berechnungen die Anzahl möglicher Lösungen auf nur wenige Zustände eingeschränkt werden. Da die Ermittlung der diskreten Systemzustände allerdings nur mit einer Netzwerkgröße von maximal ~ 150 Knoten möglich ist, kann dieser kombinierte Ansatz ausschließlich in Netzwerken dieser Größenordnungen verwendet werden. Für Netzwerke 150 unterstützt Jimena auch die alleinige Durchführung der kontinuierlichen Berechnung, was allerdings mit einem deutlich größeren Rechenaufwand verbunden ist.

3. Simulation des Netzwerkverhaltens

Die kontinuierliche Berechnung stabiler Systemzustände kann einerseits als zweiter Schritt folgend auf die diskrete Berechnung stabiler Zustände erfolgen oder kann als isolierte Analyse ausgeführt werden. Letzteres ist vor allem bei sehr großen Netzwerken ($\gg 100$ Komponenten) von Vorteil, die aufgrund ihrer oftmals sehr komplexen Verknüpfungsmuster nicht mittels diskreter Berechnung untersucht werden können, da die Umformung in ein entsprechendes boolesches System aufgrund widersprüchlicher logischer Werte in einzelnen Knoten scheitern kann. Wird die kontinuierliche Analyse in Folge auf der diskreten Berechnung durchgeführt, so werden die aus der ersten Berechnung erhaltenen diskreten stabilen Systemzustände als Initiationswerte für die Berechnung der kontinuierlichen stabilen Systemzustände verwendet, was in eine sehr performante Berechnung und eine minimale Berechnungszeit resultiert. Eine alleinstehende kontinuier-

liche stabile Systemzustands-Berechnung führt zu einer signifikanten Erhöhung des benötigten Berechnungsaufwands und -zeit, da die Initiation mittels zufällig vergebener Werte für alle Netzwerkknoten vorgenommen wird und zu einer theoretisch unbegrenzten Anzahl von stabilen Systemzuständen führen kann. Jimena berechnet dabei für jeden Knoten den von der vorherigen Aktivität interagierender Komponenten abhängigen Wert, indem der Algorithmus die Art des Einfluss ermittelt und die davon abhängige Formel verwendet um den neuen Wert des zu berechnenden Knotens zu ermitteln. Die Modi eines Knotens ergeben sich ausschließlich aus der Art der eingehenden Interaktionen: (a) nur aktivierende Verknüpfungen ($\omega_i = a$), (b) nur inhibierende Verknüpfungen ($\omega_i = b$) und (c) sowohl aktivierende, als auch inhibierende eingehende Interaktionen ($\omega_i = c$) (Details siehe Gleichung (1)).

$$\frac{dx_i}{dt} = \frac{-e^{0.5h} + e^{-h(\omega_i)}}{(1 - e^{0.5h})(1 + e^{-h(\omega_i-0.5)})} - g_i x_i$$

$$\omega_i = \begin{cases} \left(\frac{1 - \sum a_n}{\sum a_n} \right) \left(\frac{\sum a_n c_n^a}{1 + \sum a_x x_n^a} \right) \left(1 - \left(\frac{1 + \sum b_m}{\sum b_m} \right) \left(\frac{\sum b_m x_m^i}{1 + \sum b_m x_m^i} \right) \right) & \mathbf{a} \\ \left(\frac{1 - \sum a_n}{\sum a_n} \right) \left(\frac{\sum a_n c_n^a}{1 + \sum a_x x_n^a} \right) & \mathbf{b} \\ \left(1 - \left(\frac{1 + \sum b_m}{\sum b_m} \right) \left(\frac{\sum b_m x_m^i}{1 + \sum b_m x_m^i} \right) \right) & \mathbf{c} \end{cases}$$

$$0 \leq x_i \leq 1$$

$$0 \leq \omega_i \leq 1$$

$$h, a_n, b_m > 0$$

$$g_i \geq 1$$

$\{x_n^a\}$ ist das Set der Aktivatoren von x_i

$\{x_n^i\}$ ist das Set der Inhibitoren von x_i

a wird verwendet, wenn x_i sowohl Aktivatoren als auch Inhibitoren besitzt

b wird verwendet, wenn x_i ausschließlich Aktivatoren besitzt

c wird verwendet, wenn x_i ausschließlich Inhibitoren besitzt

(1)

4. Berechnung der Kontrollzentralität

Die Berechnung der Kontrollzentralitäten (*CC, Control Centrality*) stellt eine neue analytische Methode dar, den Einfluss einzelner Knoten auf das Gesamt-Netzwerk zu ermitteln [233]. Im Gegensatz zu klassischen Berechnungsmethoden von Netzwerk-Zentralitäten werden bei der Berechnung der Kontroll-Zentralitäten die regulatorischen Zusammenhänge mit einbezogen. Die drei unterschiedlichen CCs erlauben eine umfassende Einschätzung der regulatorischen Einflüsse eines Knotens.

Die TCC (siehe Gleichung (2)) gibt den Einfluss, den ein Funktionsverlust des betreffenden Knotens auf das Gesamtnetzwerk hat und impliziert somit die Vulnerabilität oder Anfälligkeit eines Netzwerks bezogen auf einen einzelnen Knoten, auf Englisch auch *Susceptibility* genannt.

$$TC(x_a) = \Delta(N, N_{del(x_a)}) \quad (2)$$

$$V = n^{-1} \times \sum_{x_i} TC(x_i) \quad (3)$$

Basierend auf den TCC-Werten aller Knoten kann die Allgemeine Vulnerabilität V des Netzwerks aus deren Mittelwert berechnet werden (siehe Gleichung (3)).

Die Robustheit R kann als die inverse Vulnerabilität beschrieben werden (siehe Gleichung (4)):

$$R = 1 - V \quad (4)$$

Die VCC gibt den kontrollierenden Einfluss der Aktivität eines Knotens auf das Gesamtnetzwerk an (siehe Gleichung (5)).

$$VC(x_a) = \int_{x \in [0,1]^{n-1}} \int_{a \in [0,1]} \int_{b \in [0,1]} \mu(\partial_N(x, a), \partial_N(x, b)) db da dx \quad (5)$$

Der Mittelwert der VCC-Werte kann als allgemeine Steuerbarkeit (*Controllability*) angesehen werden und wird durch Gleichung (6) beschrieben.

$$n^{-1} \times \sum_{x_i} VC(x_i) \quad (6)$$

Aufgrund der Definition von VCC und TCC kann ein Netzwerk gleichzeitig ausgezeichnete kontrollierbar und robust gegen zufällige Mutationen sein, Eigenschaften, die sich in der Natur oft gegenseitig ausschließen.

Die DCC definiert die Einbindung eines jeden Knotens in die zentralen Signaltransduktionswege des untersuchten Netzwerks. Je wichtiger eine Komponente und je wichtiger eine Signalkaskade, desto größer der DCC-Wert. Knoten mit einem großen DCC-Wert sind somit von großer Bedeutung für eine funktionstüchtige Signalweiterleitung in zentralen Regulationsmechanismen innerhalb des untersuchten biologischen Systems (siehe Gleichung (7)).

$$DC(x_a) = \int_{x \in [0,1]^n} \min \left\{ \mu \left(\partial_{Y(x_a \rightarrow x_b)_{del(x_{n+1} \rightarrow x_b)}}(x, y), \partial_{Y(x_a \rightarrow x_b)}(x, y) \right) \mid y \in [0,1] \right\} dx$$

(7)

- (1) Die *Total Control Centrality* beschreibt den Einfluss einer Null-Mutante des betrachteten Knotens, d.h. dem Kompletterlust seiner Funktion. Die allgemeine Anfälligkeit eines Netzwerks (*V* für *Vulnerability*, Anfälligkeit) wird gemäß der Definition nach Karl und Dandekar 2015 durch den Mittelwert aller *Total Control Centrality*-Werte eines Netzwerks beschrieben. Im Umkehrschluss ergibt sich hiermit die Stabilität des Netzwerks: **Stabilität = 1- V**
- (2) Die *Value Control Centrality* beschreibt den regulatorischen Einfluss eines Knotens auf das Gesamtnetzwerk, was in einem regulatorischen Netzwerk in einer dadurch induzierten Veränderung der Aktivität von einem oder mehreren anderen Knoten resultiert (im biologischen Kontext meist Gene oder Proteine). Der Mittelwert aller *Value Control Centrality* Werte eines Netzwerks beschreibt in diesem Kontext die allgemeine Steuerbarkeit eines Netzwerks.
- (3) Die *Dynamic Control Centrality* beschreibt den Einfluss eines Knotens auf den Signalfluss in einem Netzwerk. Knoten mit hohen DCC-Werten sind gemäß der Definition (Karl & Dandekar 2015) in wichtige Signaltransduktionskaskaden eingebunden. Die DCC kann im biologischen Kontext folgendermaßen beschrieben werden:
- Wenn ein beliebiges Protein X im Normalzustand eine Funktion wahrnimmt, und Protein X aufgrund einer Null-Mutation nicht mehr aktiv sein kann gibt es zwei Möglichkeiten, wie ein Netzwerk/ eine Zelle darauf reagieren kann:
- a) Sie kann die weggefallene Funktion von Protein X kompensieren, indem ein alternativer Signalfluss verstärkt → Protein X besitzt in der Netzwerktopologie einen kleinen DCC-Wert
 - b) Das Wegfallen der Funktion von Protein X kann nicht kompensiert werden. Alle Komponenten Downstream von Protein X sind vom Wegfallen der Komponente betroffen → in diesem Fall besitzt Protein X einen hohen DCC-Wert

4 Ergebnisse

Zunächst sind hier die eigenen Publikationen aufgelistet welche während der Zeit der Promotion erschienen sind:

- 1) Naseem M, **Kaltdorf M**, Dandekar T. The nexus between growth and defence signalling: auxin and cytokinin modulate plant immune response pathways. *J Exp Bot.* 2015;66:4885–96. doi:10.1093/jxb/erv297.
- 2) Czakai K*, Dittrich M*, **Kaltdorf M***, Müller T, Krappmann S, Schedler A, et al. Influence of Platelet-rich Plasma on the immune response of human monocyte-derived dendritic cells and macrophages stimulated with *Aspergillus fumigatus*. *Int J Med Microbiol.* 2016. doi:10.1016/j.ijmm.2016.11.010.
- 3) **Kaltdorf M**, Srivastava M, Gupta SK, Liang C, Binder J, Dietl A-M, et al. Systematic Identification of Anti-Fungal Drug Targets by a Metabolic Network Approach. *Front Mol Biosci.* 2016;3:22. doi:10.3389/fmolb.2016.00022.
- 4) **Kaltdorf M**, Dandekar T, Naseem M. Reconstruction of an Immune Dynamic Model to Simulate the Contrasting Role of Auxin and Cytokinin in Plant Immunity. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 2017. p. 83–92. doi:10.1007/978-1-4939-6831-2_6.

*equally contributing first Authors/gleichwertig beitragende Erstauthoren

Aufgrund der Vielfalt der im Rahmen der Promotion bearbeiteten Themen dient die hier vorliegende Thesis dazu die bioinformatischen Hintergründe der in diesen Publikationen angewandten Ansätze detailliert aufzuzeigen. Jegliche Netzwerksimulation und Analyse wurde von mir, Martin Kaltdorf, selbst durchgeführt. Mit Ausnahme von Marcus Dittrich, der die bioinformatische Analyse der Micro-Array Datensätze in 2) durchgeführt hat, wurden zudem alle weiteren bioinformatischen Analysen von mir, Martin Kaltdorf, durchgeführt.

Alle Tabellen und Abbildungen der folgenden Resultate basieren auf eigene Berechnungen und Analysen und wurden, falls nicht abweichend in den Beschriftungen vermerkt, von mir selbst angefertigt.

4.1 Die Steuerung der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen

Die Rekonstruktion des regulatorischen Signalnetzwerks der Mesenchymalen Stammzelle besteht aus 161 Knoten, die durch 346 Interaktionen miteinander verbunden sind. Daraus ergibt sich eine Netzwerkdichte (Density) von $346/161=2,149$. Das gesamte Netzwerk ist in Abbildung 4 einzusehen (Quellen der Interaktionen siehe Anhang 6.2.1). Signalwege, die den Kern des Netzwerks bilden sind: WNT, TGFB/Smad, MAPK, BMP, PI3K, Zellzyklus, sowie die Kontrolle der Apoptose. Die entsprechenden einzelnen KEGG-Pathways dienen als Grundlage für das Gesamtnetzwerk. Nicht benötigte Knoten wurden entfernt und die einzelnen Signalwege an Ihren Verknüpfungspunkten verbunden. Durch die Ergänzung des Netzwerks durch Wachstumsfaktoren (BMP, IGF, SHH, TGFB, WNT) und weitere Stimuli (Energiedefizit, Kompression der Zellen, Hypoxie, TNF, ITPR) sowie deren Verknüpfung mit dem bestehenden Netzwerk wurde das Netzwerk vervollständigt.

Die Netzwerktopologie in Abbildung 4 zeigt das Ergebnis der Rekonstruktion. Die Farben der Interaktionen verdeutlichen deren Wirkung, die Endpunkte stellen zusätzlich die Wirkung der Verbindung dar: grüne Pfeile bilden aktivierende Einflüsse ab, während rote Pfeile mit T-Endung die inhibierenden Interaktionen darstellen.

Die Proteine und weitere molekulare Komponenten sind durch kreisförmige Knoten dargestellt.

Wichtige Knoten sind zusätzlich farblich hervorgehoben und erleichtern deren Identifizierung im Netzwerk:

- a) Der Türkis gefüllte Knoten markiert den allgemeinen Knoten für Chondrogenese, der durch alle Chondrogenese-induzierenden Faktoren aktiviert wird.
- b) Blass-orange gefüllte Knoten verdeutlichen potentielle Stimuli wie Wachstumsfaktoren (BMP4, TGFB, WNT, IGF, ITPR, TNF, SHH), aber auch physikalische Einflüsse wie erhöhter Druck auf das Gewebe („*CompForce*“, abgekürzt für *Compressive Forces*), chemische Einflüsse und die Wirkung von allgemeinen Umweltfaktoren wie Sauerstoffmangel (*Hypoxia*) und Energiedefizit (*Energy Deficit*)

- c) Hellgrün hinterlegt ist der allgemeine Knoten für Osteogenese, der von allen Osteogenese-induzierenden Faktoren angeregt wird.
- d) Blau gefüllte Knoten zeigen die allgemeinen systemischen Reaktionen des Netzwerks. Apoptose, Zellzyklus, aber auch ECM Mineralisierung oder die allgemeine Differenzierung und die Lipidbildung zählen hierzu.
- e) Gelb gefüllt ist der Knoten für die allgemeine Adipogenese, der durch alle Adipogenese-induzierenden Faktoren angeregt wird.
- f) Braun umrandete Knoten sind Faktoren, die eine bedeutende Rolle in der Apoptose spielen.

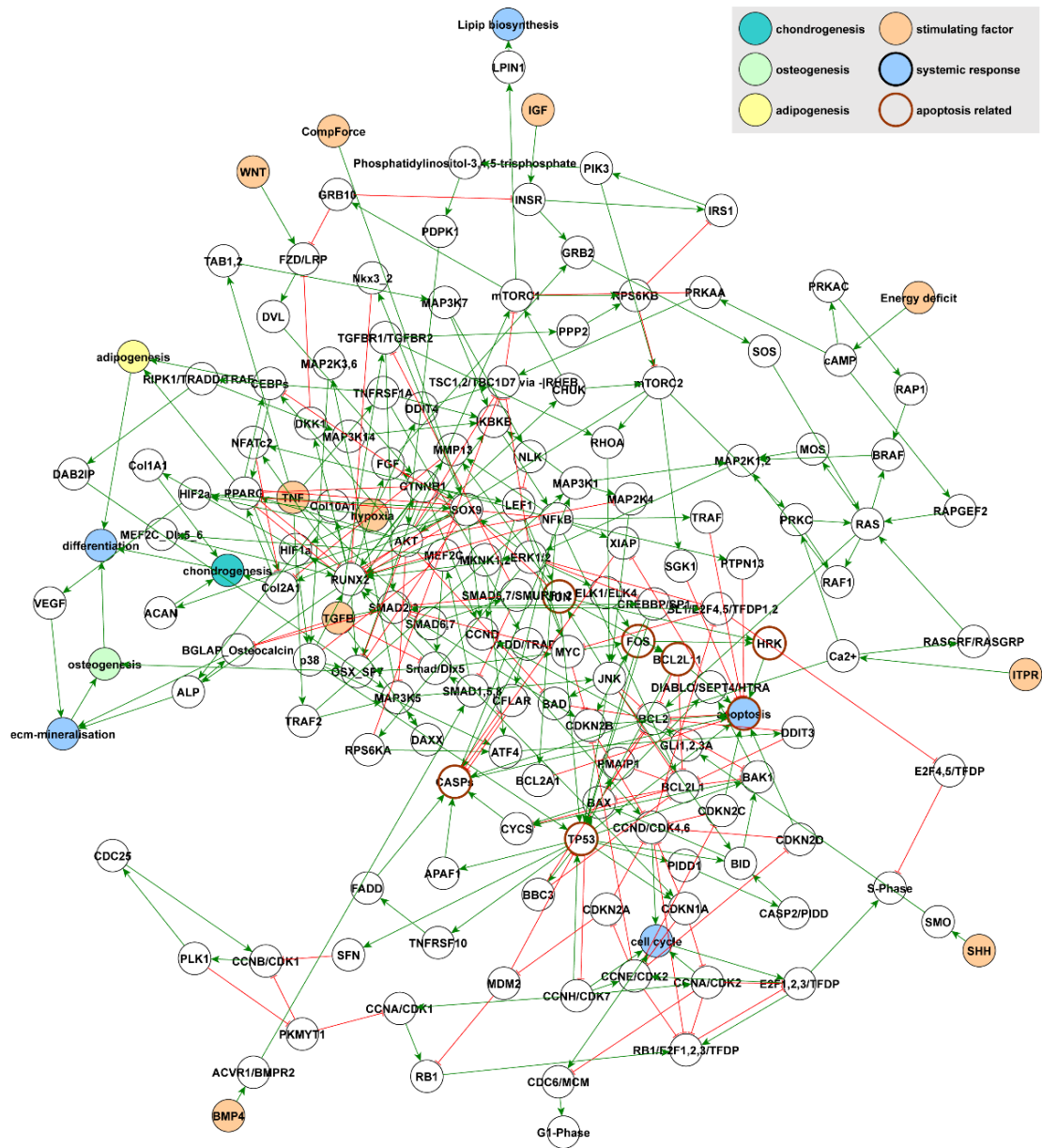


Abbildung 4: Netzwerktopologie eines rekonstruierten regulatorischen Interaktionsmodells der mesenchymalen Stammzelle im Menschen. Die Farben und die Form der Endpunkte jeder Interaktion verdeutlicht die Art der Verbindung. Grüne Kanten mit pfeilförmigen Enden stellen positive, aktivierende gerichtete Interaktionen dar, während rote Kanten mit T-förmigen Endpunkten negative, inhibierende gerichtete Interaktionen verdeutlichen. Das Netzwerk besteht zu einem Großteil aus Proteinen diverser beteiligter Signaltransduktionswege (runde, ungefüllte Knotenpunkte). Die hervorgehobenen Knoten illustrieren unterschiedliche Kategorien einflussreicher Faktoren: potentielle Stimuli wie Wachstumsfaktoren wurde in orange; zentrale zelluläre Reaktionen in blau, sowie die möglichen Differenzierungswege in Gelb (*Adipogenese*), Grün (*Osteogenesis*), Petrol (*Chondrogenesis*). Faktoren die eine zentrale Rolle in der Apoptose-Steuerung einnehmen wurden zusätzlich durch eine braune Kantenumrandung markiert.

Die Berechnungsergebnisse der in der MSC-Netzwerktopologie existierenden stabilen Systemzustände (SSS) mit Jimena ist in Form der Heatmap (R-Skript zur Erstellung der

Abbildungen siehe Anhang 6.6) in Abbildung 5 illustriert (vollständige Tabelle der Ergebnisse, siehe Anhang 6.3.1) .

Da Jimena die relativen Aktivitätswerte berechnet und so eine semiquantitative Aussage über die Aktivität ermöglicht, wurden die Resultate vor einem Abgleich mit experimentellen Daten transformiert: Die Heatmap zeigt die logFC transformierten Werte der Differenzen der relativen Aktivitätswerte zum jeweiligen Mittelwert über alle SSS. Gelbe Zellen zeigen in der Heatmap stark aktive Knoten an ($\logFC \geq +1$), während dunkelblau für eine stark negative Regulation im entsprechenden SSS steht ($\logFC \leq -1$). Die Zwischenwerte werden durch die jeweiligen Zwischenfarbschattierungen (in der Reihenfolge blau-violett-türkis-grün-gelb) visualisiert.

Die SSS-Analyse ergibt neun unterschiedliche SSS (siehe Abbildung 5), die in drei Gruppen zusammengefasst werden können: Gruppe 1 bestehend aus den SSS 8 und 9 zeigen eine deutlich erhöhte Aktivität der adipogenese-spezifischen Gene CEBPA und PARG bei gleichzeitiger Aktivierung des Zellzyklus, während alle anderen Komponenten inaktiv bleiben. Gruppe 2 (SSS 1-4) zeigt eine erhöhte Aktivierung der Osteogenese, und der Osteogenese-Markergene ALPL, RUNX2 und CTNNB1. Zusätzlich zeigen die Faktoren aus Gruppe 1 eine starke Aktivität. Die SSS der Osteogenese können wiederum in zwei Untergruppen eingeteilt werden, deren Unterschiede sich in der Aktivität der Antagonistischen Aktivität des Zellzyklus und der Apoptose zeigen: während die SSS 2 und 3 einen beständigen Zellzyklus unterstützen (durch bspw. CFLAR und MYC), existieren in den SSS 1 und 4 starke apoptotische Signale(hier vertreten durch TP53 und CDKN1A). Die dritte Gruppe bestehend aus drei SSS zeigt hohe Aktivität der Chondrogenese der MSC, sowie eine hohe Aktivität von ACAN, SOX9, ALPL, RUNX2, Apoptose, TP53 und CDKN1A. Die Knoten PARG und CEBPA, Adipogenese, sowie Zellzyklus (engl. *Cell Cycle*) sind komplett inaktiv, während die Faktoren Osteogenese, CTNNB1 und CFLAR nur sehr schwache Aktivität zeigen. Auch hier können aufgrund der differentiellen Aktivität des Zellzyklus und der Apoptose zwei Untergruppen identifiziert werden (Apoptose: SSS 5; Zellzyklus: SSS 6 und 7).

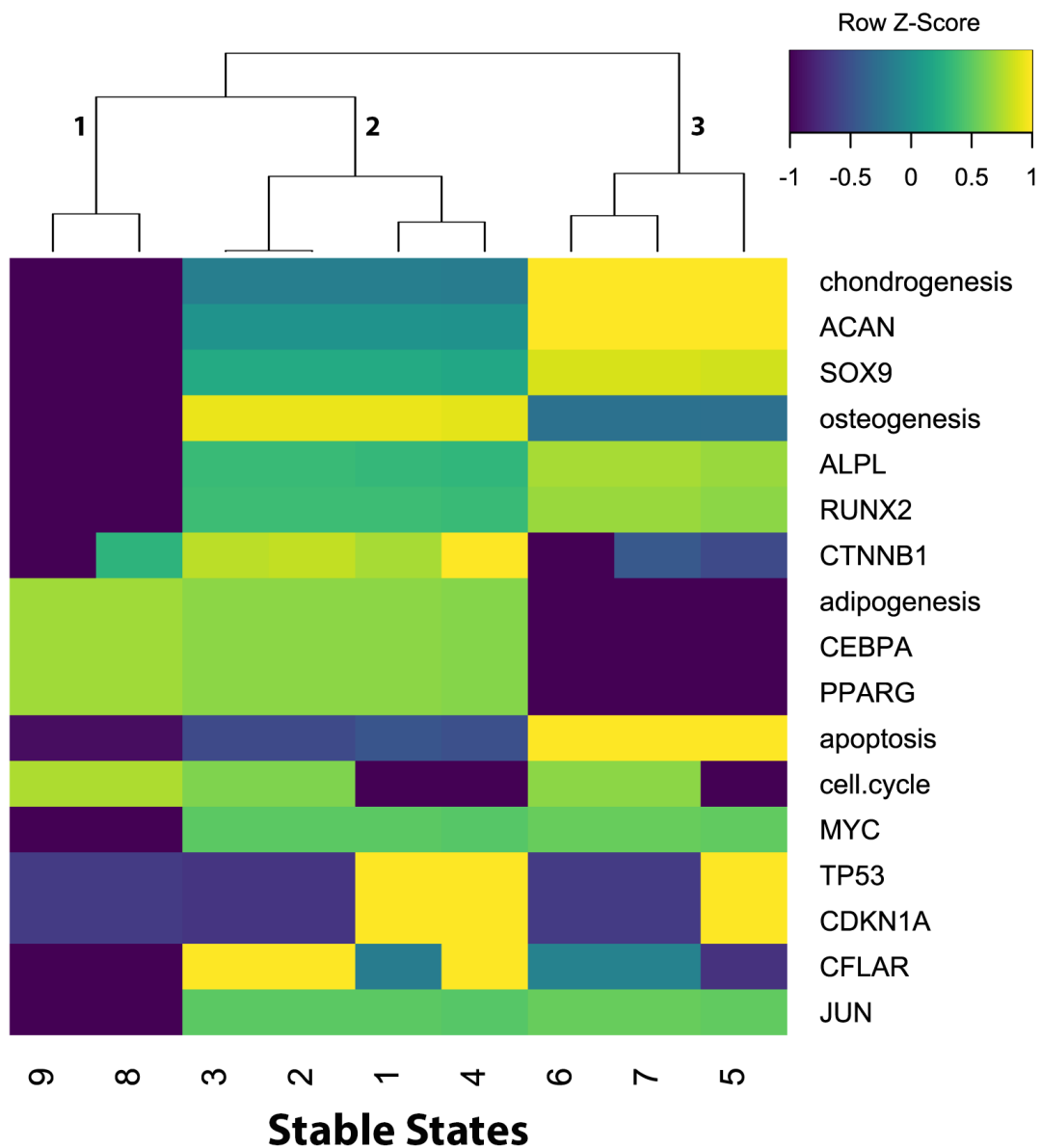


Abbildung 5: Heatmap der stabilen Systemzustände des MSC-Modells. Die Illustration zeigt die Aktivitätswerte von 17 Netzwerkknoten, die direkten Einfluss auf den Status der Zelle zeigen. Darunter sind Faktoren der Osteogenese, der Chondrogenese, der Adipogenese, sowie der Zellzyklussteuerung und Apoptose-Kontrolle. Die Jeweiligen Aktivitätswerte sind Farbcodiert: gelb steht für erhöhte Aktivität ($\log_{FC} > 1$), dunkelblau für verringerte Aktivität ($\log_{FC} \leq -1$) im log-transformierten Vergleich zum Mittelwert eines jeden Knotens. Die Zahlen im Dendrogramm markieren die drei Gruppen mit jeweils ähnlichem Netzwerkverhalten.

Zur Validierung der Simulationsergebnisse wurden entsprechende experimentelle Daten der GEO-Datenbank (*Gene Expression Omnibus*) verwendet (siehe Anhang 6.5). Jeder der sechs Datensätze wurde mittels GEO2R verglichen um die signifikant differentiell exprimierten Gene zu ermitteln. Dazu wurden die Ergebnisse anhand ihrer p-Values eingegrenzt (Grenzwert: $<0,05$) und die logFC transformierten Aktivitätsunterschiede ausgewählter Knoten/Gene in einer Tabelle den Simulationsergebnissen gegenübergestellt (siehe Tabelle 4). Um den Vergleich zu vereinfachen sind alle Aktivitätswerte durch eine eindeutige Symbolsprache ersetzt: im Vergleich hochregulierte Komponenten werden durch einen grünen Aufwärtspfeil dargestellt, herunterregulierte Komponenten durch einen roten abwärts-gerichteten Pfeil und Nicht-Eindeutige Komponenten durch einen gelben Horizontalpfeil. Zellen, für die aufgrund zu großer p-Values keine Werte zurate gezogen werden können sind mit „na“ ausgefüllt. Um die Übereinstimmung der Simulationsdaten mit den Experimenten zu verdeutlichen wurden für alle Entwicklungsschicksale die entsprechenden Vergleiche zusammengefasst und den berechneten Werten gegenübergestellt. Eine allgemein große Übereinstimmung wird dabei durch einen grünen Haken symbolisiert, widersprüchliche Daten werden durch ein rotes Kreuz markiert und unklare Fälle, bei denen in den Experimenten kein allgemeiner Konsensus festzustellen ist durch einen gelben Balken.

Bei 12 untersuchten Knoten und drei unterschiedlichen Fällen ergibt sich im Gesamten 36 Gegenüberstellungen: 17 von 36 Stimmen (47,2 %) zwischen Berechnung und Experimenten überein; 10 von 36 sind widersprüchlich (27,7%) und weitere 9 nicht weiter auswertbar (25 %; aufgrund inkonsistenter oder fehlender experimentellen Datengrundlage).

Tabelle 4: Vergleich der Simulationsergebnisse in MSC (logFC transformiert zum Mittelwert aller stabilen Systemzustände) mit den Experimentellen Daten aus Gene Expression Omnibus. Für jeden der Differenzierungstypen wurden bekannte Marker-Gene zum Vergleich verwendet.

network nodes / GEO datasets	chondrogenesis				osteogenesis				adipogenesis					
	GSE9451	GSE18394	GSE19664	Simulation	GSE9451	GSE28205	GSE42352	Simulation	GSE9451	GSE10192	Simulation			
chondrogenesis factors				→				↓			↓			
ACAN	↑	↑	na	↑	✓	↑	na	na	↓	×	↑	↑	↓	×
SOX9	↑	na	↑	→	—	↓	↓	↓	↓	✓	na	na	↓	?
osteogenesis factors				↓				↑					↓	
ALPL	na	↑	na	↓	×	↑	na	↑	↓	×	↑	↓	↓	—
RUNX2	na	na	↓	↓	✓	↑	na	→	↓	×	↓	na	↓	✓
CTNNB1	↑	na	na	↓	×	↑	na	↓	↓	—	↓	↓	↓	✓
adipogenesis factors				↓				↑					↑	
CEBPa	na	na	na	↓	?	↑	↓	↑	↑	✓	↑	↑	↑	✓
PPARG	↓	↓	na	↓	✓	na	↑	↑	↑	✓	↑	↑	↑	✓
apoptosis/cellcycle fact				↑				↓					↓	
MYC	na	na	na	↑	?	na	na	↑	↑	✓	↑	↓	↓	—
TP53	na	↓	na	↓	✓	na	na	→	↓	—	↓	na	↓	✓
CDKN1A	na	na	↓	↓	✓	na	na	↑	↓	×	na	↓	↓	✓
CFLAR	↓	↓	→	↓	✓	↑	↑	↑	↓	×	↑	↓	↓	—
JUN	na	↓	na	↑	×	↓	na	↓	↑	×	↓	na	↓	✓

Die Plastizität regulatorischer Netzwerke spielt eine essentielle Rolle für Adaptationsprozesse des Organismus an seine Umwelt. Abbildung 6 zeigt das plastische Verhalten des MSC-Modells unter Einfluss einer variierenden Anzahl an permanenten Stimuli. Mit Zunahme der möglichen Anzahl induzierender Faktoren ist ein exponentieller Anstieg der existierenden SSS zu beobachten (blaue Balken im Diagramm), der sogar noch die theoretischen Richtwerte gemäß 2^n (orange Balken) übertrifft. Bereits bei zehn potentiellen Stimuli ergibt sich eine Zahl von mehr als 1800 verschiedenen möglichen SSS.

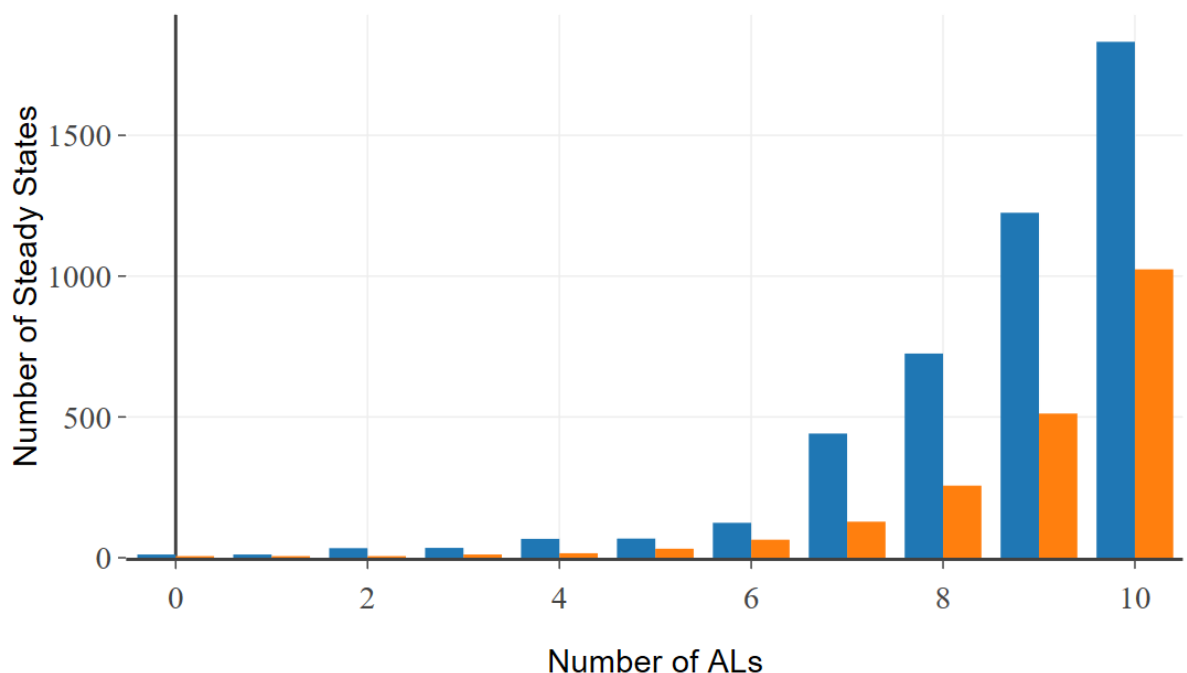


Abbildung 6: Die Plastizität von regulatorischen Netzwerken. Das Histogramm zeigt in Blau die Entwicklung der Anzahl der SSS eines regulatorischen Modells in Abhängigkeit einer variablen Menge autokriner Stimuli/Autoaktivierender Rückkoppelungen (Loops) (ALs), die entweder an oder aus sein können. Die theoretische Menge der möglichen SSS nach der Regel 2^n ist in Orange angezeigt.

Jede Komponente eines regulatorischen Netzwerks hat unterschiedlichen Einfluss auf das Gesamtverhalten des Netzwerks. Die Kontrollzentralitätscharakteristika erlauben die Messung von drei Kernkompetenzen eines Netzwerks basierend auf dem Einfluss eines jeden einzelnen Knotens (gesamte Liste der CC-Werte, siehe Anhang 6.3.1): der Steuerbarkeit der Gesamtopologie (VCC), der Anfälligkeit eines Defekts eines Knotens

auf die Gesamttopologie (TCC) und die Integration in Signalkaskaden eines Knotens (DCC).

Abbildung 7 bildet die Kontrollzentralitätswerte (CC) des MSC-Modells ab. A) und B) fassen die Zusammenhänge zwischen VCC und DCC zusammen, während C) und D) die DCC in Relation zur TCC darstellt. Betrachtet man die CC von wichtigen Marker-Genen des Netzwerks, so zeigt sich, dass ein Großteil davon einen sehr starken Einfluss auf das gesamte Netzwerkverhalten hat. Folgende Knoten sind in Abbildung 7 explizit hervorgehoben: 1. RUNX2; 2. ALPL; 3. OSX/SP7; 4. CTNNB1; 5. SOX9; 6. ACAN; 7. CEBPA; 8. PPARG; 9. TP53. Alle diese Komponenten haben eine starke bis mittlere Einbindung in Signalkaskaden; vier davon sogar gleichzeitig eine sehr starke DCC und eine sehr starke kontrollierende Wirkung (1, 3, 5, 9; siehe Abbildung 7B).

Die Analyse der TCC-Werte in Bezug auf die DCC-Werte ergibt nochmals erheblich stärkere Werte: sieben der neun Knoten zeigen sehr starke TCC und DCC-Werte gleichzeitig (1, 2, 3, 4, 5, 8, 9; siehe Abbildung 7D); die verbleibenden zwei (6, 7; siehe Abbildung 7C) offenbaren einen ebenfalls noch starken bis mittleren Einfluss.

Kombiniert man letztendlich alle Ergebnisse, so erhält man vier Knoten, die in der Literatur bereits bekannt sind das Verhalten einer MSC maßgeblich beeinflussen zu können: 1. RUNX2; 3. OSX/SP7; 5. SOX9 sowie 9. TP53.

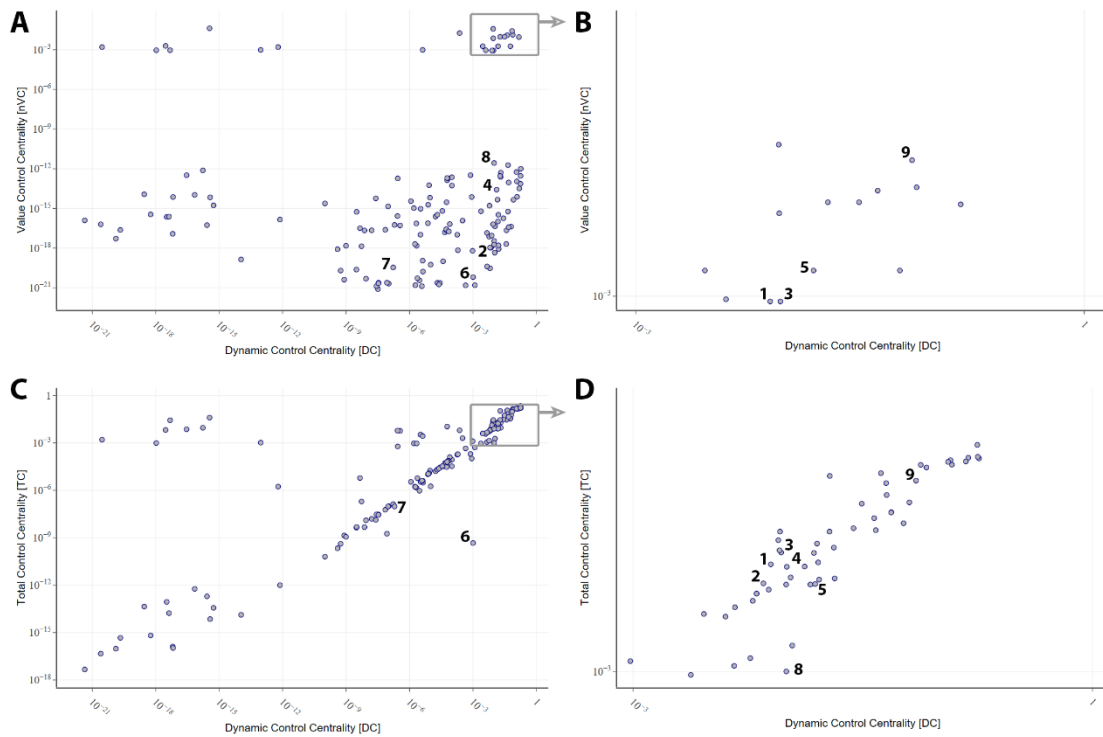


Abbildung 7: Kontroll-Zentralitäts-Werte der Knoten des MSC-Modells. A und B) Auftragung der VCC gegen die DCC ermöglicht die Identifizierung von Knoten, die sowohl eine zentrale Rolle in der Steuerung des Netzwerks spielen, als auch in wichtigen Signalkaskaden integriert sind. B) zeigt dabei eine Detailaufnahme der stärksten Werte aus A: VCC und DCC $> 10^{-3}$. C und D) verdeutlichen die Kombination der Kaskadenintegration mit der Anfälligkeit des Netzwerks auf eine Mutation bestimmter Knoten (TCC $> 10^{-3}$). Faktoren die eine wichtige Rolle in einer der Differenzierungsmechanismen spielen sind durch Nummern markiert: 1. RUNX2; 2. ALPL; 3. OSX/SP7; 4. CTNNB1; 5. SOX9; 6. ACAN; 7. CEBPA; 8. PPARG; 9. TP53).

4.2 *Aspergillus fumigatus* und dendritische Zellen

Die Interaktionen des Netzwerks verdeutlichen den Einfluss von drei zentralen Rezeptoren auf die Zielknoten TLR2, TLR4 und Dectin-1 (auch CLEC7A genannt) (Quelle der Interaktionen, siehe Anhang 6.2.2):

Rote T-förmige Pfeile stellen eine gerichtete Hemmung dar; grüne Linien mit Pfeilspitze verdeutlichen aktivierende Interaktionen. Die beiden Stimuli *A. fumigatus* und Blutplättchen (*Platelets*) sind rot hervorgehoben; alle inflammatorischen Komponenten des Netzwerks sind rosa unterlegt. Proteine/Gene, die Teile der zellulären Immunantwort darstellen, sind grün unterlegt, während Entwicklungsprozesse orange hervorgehoben sind. Faktoren, die im Netzwerk die Regulation der Apoptose übernehmen sind blau-grau unterlegt.

Das Netzwerk verdeutlicht die enge Verknüpfung verschiedener zellulärer Prozesse (siehe Abbildung 8): Die 86 Knoten, die durch 177 Interaktionen miteinander verknüpft sind decken bereits eine große Anzahl der wichtigsten Signalwege und Faktoren die im menschlichen Organismus von Bedeutung sind, obwohl diese nur einen winzigen Anteil des gesamten menschlichen Interaktoms darstellen.

Neben dem NFκB-Signalweg und dem Akt/PKB-Signalweg sind dies die Yamanaka Faktoren MYC, SOX2, OCT4, die Apoptoseregulatoren TP53, TNF und CASPs, Interleukine (IL1, IL4, IL6 und IL10), sowie Maturationsmarker, die essentiell für die Reifungsprozesse und Spezialisierung der Zelle sind. Die Oberflächenmarker CD80, CD83 und CD86 stehen dabei im Fokus der Untersuchung da diese eine essentielle Rolle in der Reifung der dendritischen Zellen einnehmen.

Untersucht man die Struktur des Netzwerks mittels der Kontrollzentralitätsanalyse, so fallen drei primäre Faktoren als Master-Regulatoren ins Auge: 1- *A. fumigatus* Germ Tubes; 2. Platelets; 3. TNF. 1, 2 und 3 zeigen sehr starkes Potential zur Kontrolle des Netzwerks und sind zentrale Knoten der wichtigsten Signalwege (VCC und DCC $>10^{-3}$, siehe Abbildung 9 A). Die Tatsache, dass sich diese drei Komponenten zusätzlich durch sehr starke TCC- Werte auszeichnen (TCC $> 10^{-3}$, siehe Tabelle 5) verdeutlicht die Anfälligkeit des Netzwerks durch einen Verlust der Funktion einer dieser Knoten.

Die Untersuchung der Kontrollzentralität aller Knoten ergab keine weiteren Auffälligkeiten, die eine besondere Funktion andeuten. Alle anderen Knoten, die für die Analyse von Interesse sind zeigen keine erhöhten Effekte und bewegen sich im mittleren bis schwachen Bereich (CCs $<10^{-6}$) (gesamte Liste der CC-Werte, siehe 6.3.2).

Die Heatmap der stabilen Systemzustände des Netzwerks (Abbildung 9B) verdeutlicht den Einfluss der zwei Stimuli-Komponenten *A. fumigatus* und Platelets. Beide Knoten sind so integriert, dass sie jeweils eine permanente Aktivität aufrechterhalten können und so die Berechnung ihrer individuellen und kombinierten Auswirkungen auf das Verhalten des gesamten Netzwerks ermöglichen. Die farbkodierten Zellen visualisieren die Aktivität eines Gens/Proteins. Dunkelblaue Zellen zeigen Inaktivität eines Knotens (Aktivitätswert = 0,00). Gelbe Zellen visualisieren eine sehr starke Aktivität (Aktivitätswert 1,00). Alle entsprechenden Zwischenwerte werden durch die natürlichen Farbübergänge dargestellt und ermöglichen so eine Einschätzung der individuellen Aktivität. Die so verdeutlichten Aktivitätsmuster der ausgewählten Knoten lassen Rückschlüsse auf den jeweiligen zellulären Zustand zu.

Die Analyse der SSS resultiert in 10 stabilen Systemzuständen, SSS 1-4 zeigen für keinen der untersuchten Faktoren eine nennenswerte Aktivität auf. Lediglich in SSS 4 ist eine hohe Aktivität von Platelets zu erkennen, ohne die Werte der anderen Knoten zu verändern. SSS 5 und 6 zeigen sehr starke Aktivität von allen Knoten von Interesse, inklusive *A. fumigatus*, außer jeweils eines Knotens: SSS 5 und SSS 6 unterscheiden sich nur anhand des antagonistischen Verhaltens zwischen IL6 (SSS 5: aktiv; SSS 6 inaktiv) und Platelets/Plättchen (SSS 5: inaktiv; SSS 6: aktiv). Ein ähnliches, antagonistisches Verhalten jedoch unter Inaktivität von *A. fumigatus* zeigen SSS 7 und 10 zueinander. Bei Aktivität

von CD80, CD83 und CD86 unterscheiden sich diese SSS nur in der gegensätzlichen Aktivität von IL6 und Platelets/Plättchen. SSS 8 und 9 zeigen Aktivität von *A. fumigatus* bei Inaktivität der Reifemarker CD80, CD83 und CD86. Beide SSS unterscheiden sich nur in ihren Aktivitätsprofilen der Platelets/Plättchen (vollständige Tabelle der SSS, siehe Anhang 6.4.2).

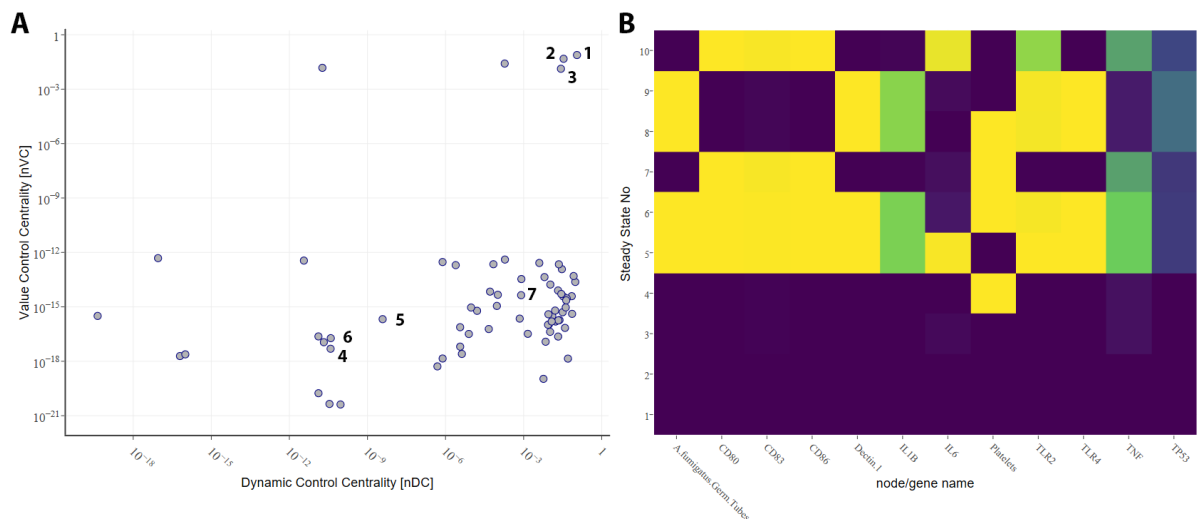


Abbildung 9: Kontrollzentralitätswerte und Aktivitätsprofil der stabilen Systemzustände in DC. A) Auftragung der VCC gegen die DCC der DC-Netzwerktopologie. Die Kombination dieser Werte lässt Rückschlüsse auf die Bedeutung einzelner Knoten innerhalb des Netzwerks, bezüglich deren Eignung als Steuerelemente des Gesamtnetzwerks (VCC), sowie deren Beteiligung in wichtigen Signalkaskaden des Netzwerks (DCC) zu. Markierte Datenpunkte sind: 1- *A. fumigatus* Germ Tubes; 2. Platelets; 3. TNF; 4. CD80; 5. CD83; 6. CD86; 7. TP53. 1, 2 und 3 zeigen sehr starkes Potential zur Kontrolle des Netzwerks und sind zentrale Knoten der wichtigsten Signalwege (VCC und DCC $>10^{-3}$). B) Heatmap der stabilen Systemzustände des Netzwerks unter Einfluss der zwei Stimuli-Komponenten *A. fumigatus* und Platelets. Beide Knoten sind so integriert, dass sie jeweils eine permanente Aktivität aufrechterhalten können und die Simulation ihrer individuellen und kombinierten Einflüsse ermöglichen. Die Aktivitätswerte werden hier durch Farben kodiert: Dunkelblau für keine Aktivität (0,00), gelb für volle Aktivität (1,00). Die Zwischenwerte werden durch die natürlichen Farbübergänge dargestellt und ermöglichen so eine Einschätzung der individuellen Aktivität. Die primären Knoten von Interesse: CD80, CD83, CD86, TLR2, TLR4 und IL6 sind nur in zwei der 10 SSS (SSS 5, 10) gleichzeitig aktiv. Die SSS 1-3 zeigen durchgehende Inaktivität bei allen beobachteten Komponenten. SSS 4 hebt sich durch die einzelne Aktivität der Platelets hervor. SSS 6 und 7 unterscheiden sich jeweils an einem bedeutenden Punkt von 5 bzw. 10: die antagonistische Aktivität von Platelets und IL6. SSS 8 und 9 fallen durch die Inaktivität der Faktoren CD80, CD83 und CD86 bei gleichzeitiger Aktivierung von Dectin-1, IL1B, TLR2 und TLR4 auf

Die erweiterte Kontrollzentralitätsanalyse der wichtigsten Komponenten der Immunantwort zeigt, dass eine Mehrzahl davon sehr starke TCC Werte aufweisen, was deren essentielle Rolle in dieser Signalantwort verdeutlicht: Neben den bereits erwähnten primären Kontrollknoten AF Germ Tubes, Platelets/Plättchen und TNF, die gleichzeitig zu den hohen TCC auch hohe VCC und DCC Werte präsentieren, zeigen CCL5, Dectin-

1/CLEC7A, IL1, IL6, TLR2 und TLR4 auffällig hohe TCC- und DCC-Werte (Details siehe Tabelle 5).

Weitere Untersuchung der Arbeitsgruppe haben ergeben, dass die Genauigkeit der Ergebnisse weiter erhöht werden kann, wenn die Berechnung auf sehr viele Simulationen ausgeweitet wird. Durch eine ausreichenden hohen Anzahl an Simulationen ist es möglich konvergente Simulationsergebnisse zu berechnen. Solche konvergenten Ergebnisse konnten bei der hier verwendeten begrenzten Anzahl an Simulationen nur durch sehr großen Zufall zu beobachtet werden. Diese Erkenntnisse werden bei der noch ausstehenden Publikation der hier vorliegenden Ergebnisse berücksichtigt während hier zuerst einmal das vorläufige Ergebnis präsentiert wird um die Hintergründe aufzuzeigen.

Tabelle 5: Ausgewählte Kontrollzentralitätswerte des Netzwerks der dendritischen Zelle mit Fokus auf immunrelevante Komponenten. Tabellenzelle mit starken CCs sind rot hinterlegt, mittlere CCs blass-grün und schwache in sattem Grün.

Node	VC	TC	DC
AF Germ Tubes	1,02E-01	1,27E-01	1,09E-01
CCL2	3,32E-21	0,00E+00	0,00E+00
CCL5	1,10E-16	8,12E-03	6,59E-03
CD80	6,10E-16	2,38E-11	3,37E-11
CD83	5,40E-19	1,15E-09	2,41E-10
CD86	2,05E-16	1,25E-11	1,05E-11
CXCL10	1,33E-18	0,00E+00	0,00E+00
Dectin-1	5,97E-13	9,08E-02	9,17E-02
IL1	6,51E-13	2,38E-02	5,23E-04
IL6	2,41E-15	1,12E-02	7,92E-03
Platelets	4,61E-02	8,75E-02	2,28E-02
TLR2	1,93E-14	4,34E-02	3,47E-02
TLR4	1,12E-16	3,46E-02	3,07E-02
TLR6	1,13E-19	6,84E-06	3,57E-06
TNF	1,32E-02	3,45E-02	2,49E-02
TP53	1,58E-15	3,06E-04	4,26E-04

Die semiquantitative dynamische Simulation des Verhaltens des regulatorischen Netzwerks in dendritischen Zellen unter Einfluss von *A. fumigatus* (AF) Germ Tubes und Platelets/Plättchen (siehe Abbildung 10) offenbart einen Schwellwert der Aktivität von AF Germ Tubes, der überschritten werden muss, um die Immunantwort auszulösen.

Die Simulationsergebnisse sind zunächst als simulationsinterne Zeitlänge definiert, welche anhand der Vergleiche mit experimentellen Ergebnissen in ihrer exakten Länge festgelegt werden können. In dem hier vorliegenden Fall entspricht einer Einheit der simulationsinternen Zeitlänge in etwa einem Zeitraum von zwei Stunden.

Bei einer Aktivität von 0,18 (= 18%) reagieren die entsprechenden Rezeptoren lediglich mit einer leichten dauerhaften Erhöhung ihrer Aktivität (siehe Abbildung 10 A). Bei einer *AF Germ Tubes* Aktivität von 0,19 (siehe Abbildung 10 B) zeigt sich zu Anfang ein analoges Verhalten wie in Abbildung 10 A. Zwischen Zeitpunkt 7 und 10 jedoch erhöht sich das Signal der Rezeptoren TLR2 und TLR4, der Maturationsmarker CD80, CD80 und CD86, sowie von TNF stetig bis zu einem Wert von 0,9 -1,0 (TLR2, IL6, CD80, CD83, CD86) beziehungsweise 0,6-0,7 (TNF). Dectin-1 und TLR4 zeigen nur schwach erhöhte Werte ($\sim 0,2$).

Bei einem Stimulationswert von *AF Germ Tubes* von 0,5 reagieren die beobachteten Komponenten der Immunantwort mit einer unverzüglichen Erhöhung ihrer Aktivität (siehe Abbildung 10 C) auf Werte von 0,9 -1,0 (TLR2, sCD80, CD83, CD86, IL6) beziehungsweise auf Werte von $\sim 0,65-0,8$ (Dectin-1, TLR4, IL1B, IL1R1, TNF) (siehe Abbildung 10).

Die Unterschiede des simulierten Verhaltens von IL6 auf die Anwesenheit des primären Stimulators *AF Germ Tubes* in Abhängigkeit von Platelets/Plättchen sind in Abbildung 10 D dargestellt. Die alleinige Anwesenheit von *AF Germ Tubes* führt zu einer sehr starken Aktivität von IL6. Bei gleichzeitiger starker Aktivität von Plättchen ist eine auf ein Minimum reduzierte Antwort von IL6 zu beobachten (maximale Aktivität $\sim 0,06$).

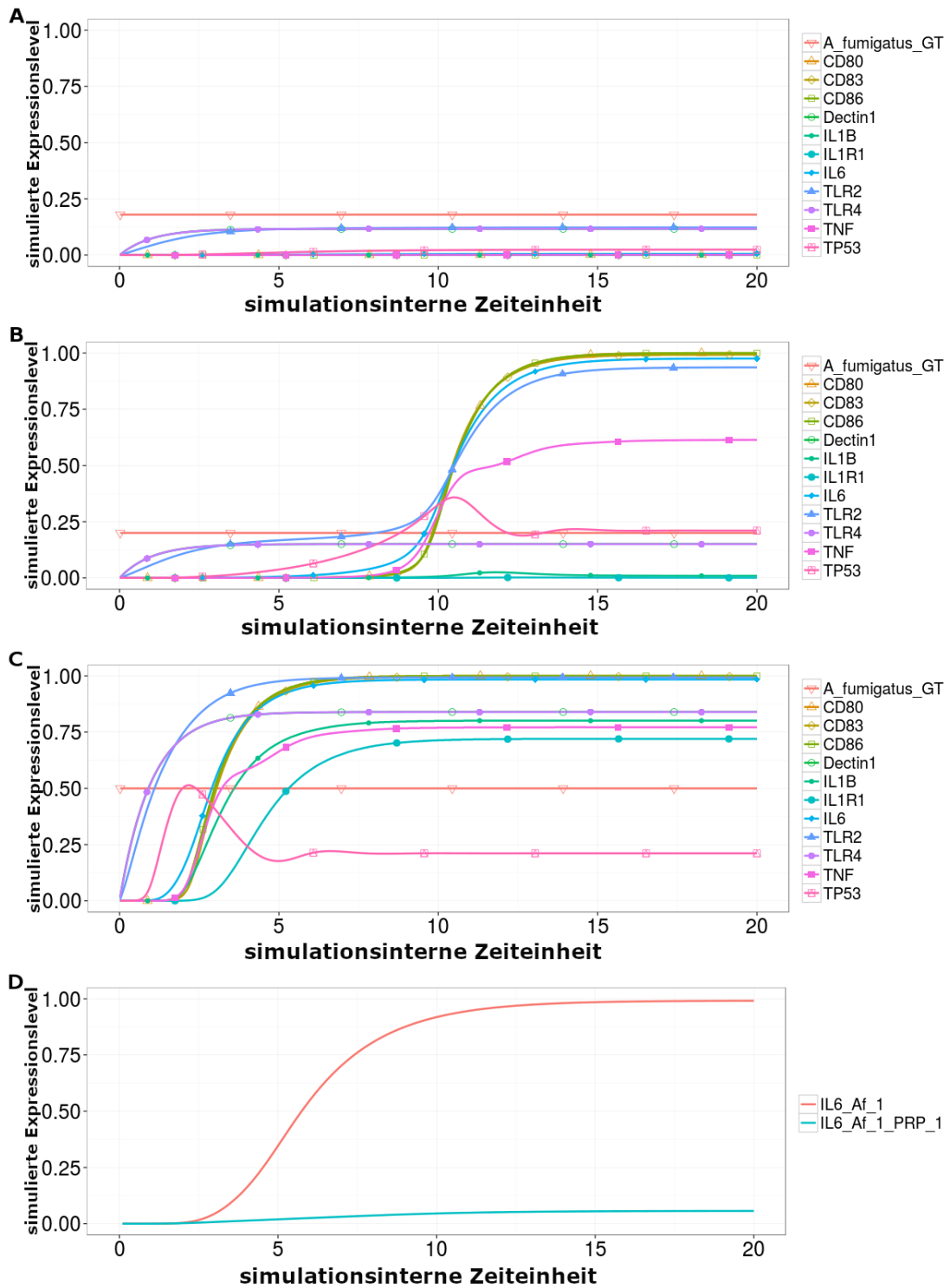


Abbildung 10: Dynamische Simulation des DC-Modells zur Ermittlung des Kritischen Zustands. A) zeigt eine unterschwellige Aktivität des Stimulators *A. fumigatus*. B) zeigt die Reaktion des Netzwerks mit *A. fumigatus* am Schwellwert. C) illustriert das Verhalten des Netzwerks bei einer überschüssigen Aktivität von *A. fumigatus*. D) zeigt die dynamische Entwicklung des IL6 Levels bei gleichzeitiger Aktivität von *A. fumigatus* und Platelets (PRP). Der ganze Zeitraum bis zu Zeiteinheit 20 entspricht etwa 40 h.

4.3 Die Regulation der pflanzlichen Immunantwort am Beispiel *A. thaliana*

Die Rekonstruktion des regulatorischen Netzwerks der Immunantwort in *A. thaliana* nach Nasseem et al. 2012, 2015 [22, 23, 254] besteht aus 104 Knoten, die durch 161 Kanten miteinander verbunden sind (siehe **Abbildung 11**), Quelle der Interaktionen, siehe Anhang 6.2.3). Dies ergibt eine Netzwerkdichte von 1,548. Komponenten des pflanzlichen Organismus sind in der Visualisierung kreisförmig, während pathogene Komponenten des Organismus *PstDC3000* durch rechteckige Knoten verdeutlicht werden, die zusätzlich rot und orange hervorgehoben sind. Pflanzliche Komponenten, die von besonderem Interesse für die Untersuchung waren sind Türkis (für pflanzliche Hormone) und Grün (für Bestandteile der systemischen Resistenz der Pflanze) verdeutlicht. Aktivierungen werden durch grüne Pfeile dargestellt, inhibierende Interaktionen durch rote Linien mit T-förmigen Enden.

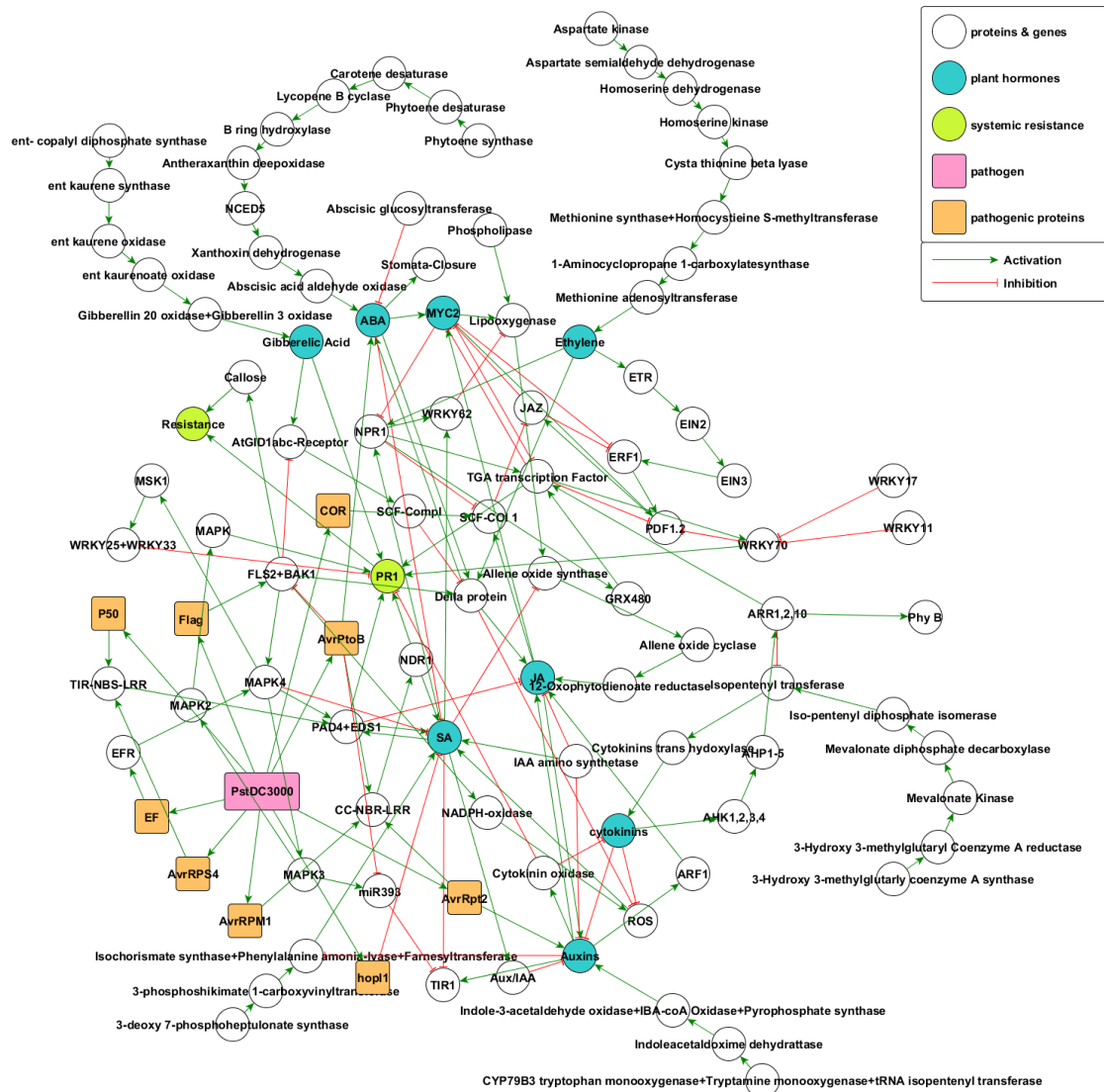


Abbildung 11: Netzwerktopologie des Immunsystems von *A. thaliana* unter Infektion von *Pseudomonas SyringaeDC3000*. Wichtige Pflanzenhormone sind Türkis gefüllt. Proteine/Gene für die eine zentrale Bedeutung in der systemischen Resistenz auf Basis dieses Netzwerks nachgewiesen werden konnten sind grün dargestellt. Das Pathogen ist Rosa unterlegt und weitere Faktoren des Pathogens sind orange hervorgehoben. Die Interaktionen verdeutlichen die Art der jeweiligen Verbindung: rot mit T-förmigem Ende: Inhibition und grün mit Pfeilspitze: Aktivierung.

Basierend auf dem Netzwerk in **Abbildung 11** ergibt die Berechnung der Kontrollzentralitäten fünf Netzwerkkomponenten, die sowohl VCC Werte, als auch DCC Werte größer als 10^{-3} aufweisen:

- TGA Transkriptionsfaktor
- Jasmonsäure
- Ent-Kaurenoate-Oxidase
- Ent-kaurene-Synthase
- Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase.

Weitere vier Knoten zeigen sehr hohe VCC-Werte ($>10^{-3}$) aber keine erhöhten DCC-Werte:

- Ent-Copalyl-Diphosphate-Synthase
- Phytoene-Synthase
- Aspartat-Kinase
- *PstDC3000*

Weitere 44 Knoten weisen hohe DCC Werte ($>10^{-3}$), bei gleichzeitig kleinen VCC-Werten auf diese sind in Abbildung 12A abgebildet, aber nicht einzeln benannt (detaillierte Werte: siehe Anhang 6.3.3).

Die Berechnung der stabilen Systemzustände im *A. thaliana* Immunnetzwerk ergibt 3 unterschiedliche Zustände (vollständige Tabelle der SSS, siehe Anhang 6.4.3). Abbildung 12B fokussiert sich auf acht wichtige pflanzliche Hormone und Proteine, sowie dem Pathogen *PstDC3000*:

- | | |
|-----------------------|-------------------------|
| - Abscisinsäure (ABA) | - Gibberellinsäure (GA) |
| - Auxin | - Jasmonsäure (JA) |
| - Zytokine | - PR1 |
| - Ethylen | - Salicylsäure (SA) |
| - <i>PstDC3000</i> | |

Zustand 1) zeigt in keinem der untersuchten Komponenten Aktivität (blau). Zustand 2) besitzt mit Auxin ($>0,8$) und Jasmonsäure ($\sim 1,0$) zwei aktive Knoten, während Zustand 3) mit ABA ($\sim 1,0$), Auxin ($>0,8$) und Jasmonsäure ($\sim 1,0$) drei aktive Knoten aufweist.

Die dynamische, semiquantitative Simulation des Netzwerks zeigt als Antwort auf eine initiale Aktivierung von *PstDC3000* zwei Kategorien von Knoten: die erste Kategorie mit ABA und Auxin, sowie SA und JA, die insgesamt nur eine Signalantwort aufweisen und die zweite Kategorie, die nach der primären Signalantwort zeitverzögert ein sekundäres Aktivitätsmaximum aufweisen. Zu diesen Komponenten ist unter den untersuchten Knoten lediglich ein Vertreter zu erkennen: PR1.

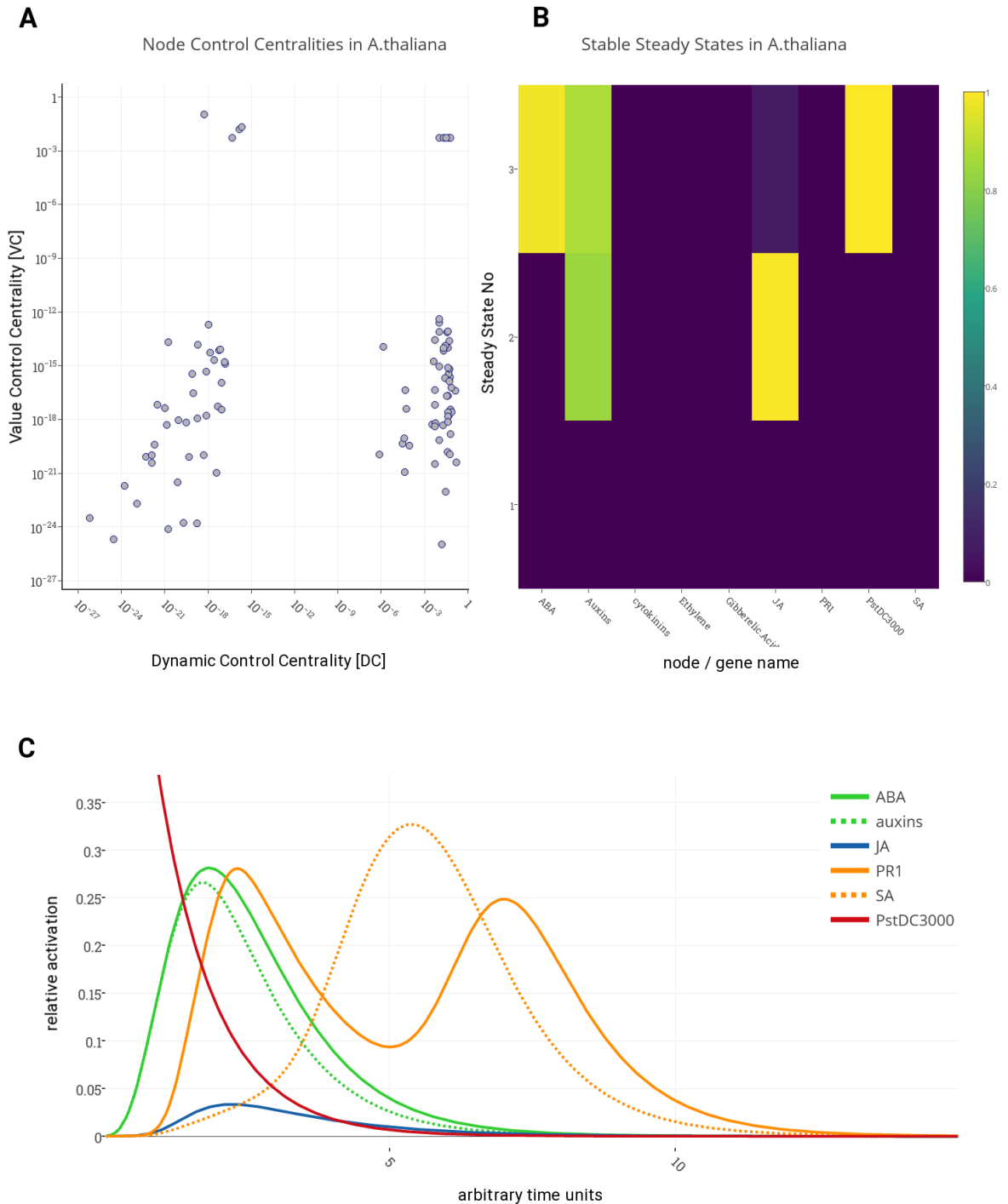


Abbildung 12: Auftragung der VCC gegen die DCC der Netzwerktopologie. Die Kombination dieser Werte lässt Rückschlüsse auf die Bedeutung einzelner Knoten innerhalb des Netzwerks bezüglich deren Eignung als Steuerpunkte des Gesamtnetzwerks (VCC), sowie deren Beteiligung in wichtigen Signalkaskaden des Netzwerks (DCC). Details der Einzelwerte siehe Tabelle 6. B) Heatmap der Stablen Systemzustände des Netzwerks unter Einfluss von *PstDC3000*. Die Aktivitätswerte werden hier durch Farben kodiert: Dunkelblau für vollständige Inaktivität (0,00), gelb für volle Aktivität (1,00). Die Zwischenwerte werden durch die natürlichen Farbübergänge dargestellt und ermöglichen so eine Einschätzung der individuellen Aktivität. C) Dynamische Simulation der Immunantworte von *A. thaliana* auf eine Infektion durch *PstDC3000* gemäß Naseem et al. 2012 [255].

Die bereits in Abbildung 12B untersuchten Komponenten sind in Tabelle 6 nochmals hinsichtlich aller Kontrollzentralitätswerte aufgelistet. Während eine Mehrzahl dieser Komponenten jeweils sehr großen Einfluss (CC-Wert $>10^{-3}$) in TCC und DCC zeigen (ABA, Auxin, Ethylen, Gibberellinsäure, NPR1) ergeben sich für *PstDC3000* hohe Werte für TCC und VCC. JA ist der einzige Knoten, der in allen drei Kategorien sehr hohe Werte besitzt (TCC, VCC und DCC). PR1 und SA zeigen durchgehend sehr kleine Werte.

Tabelle 6: Ausgewählte Kontrollzentralitätswerte der Immunregulation in *A. thaliana*. Starke CCs sind Rot hinterlegt, mittlere und schwache Grün

Node	TC	VC	DC
ABA	6,62E-02	1,02E-14	4,23E-02
Auxins	1,77E-02	2,08E-17	3,51E-02
Ethylene	5,35E-03	2,58E-18	7,69E-02
Gibberelic Acid	3,60E-02	6,05E-17	7,21E-02
JA	1,06E-02	5,28E-03	5,28E-02
NPR1	5,28E-03	6,90E-15	2,11E-02
PR1	3,24E-13	1,61E-24	1,71E-19
PstDC3000	1,91E-01	1,07E-01	5,39E-19
SA	1,74E-06	3,59E-18	8,67E-18

5 Diskussion

Altersbedingte, degenerative Erkrankungen spielen in unserer Gesellschaft eine zunehmende Rolle. Mit stetiger Verbesserung der Gesundheitssysteme weltweit und der damit einhergehenden steigenden mittleren Lebenserwartung steigt ebenfalls die Wahrscheinlichkeit, des Auftretens degenerativer Erkrankungen [256]. Um solche Erkrankungen vorzeitig und gezielt behandeln zu können ist ein fundiertes Wissen der intra- und inter-Zellulären Vorgänge und vor allem der Zusammenhänge unzähliger verschiedener Signale im Organismus notwendig. Neben Erkrankungen des Bewegungsapparats treten auch viele Tumorerkrankungen bei Menschen höheren Alters auf [256]. Ein Schritt zu einem besseren Verständnis dieser vielfältigen Krankheiten und der Entwicklung von Präventions- und Therapie-Strategien ist die Rekonstruktion der Vorgänge innerhalb einzelner Zellen innerhalb des Organismus, sowie deren Wechselspiel innerhalb ihres jeweiligen Gewebes und Organs. Die hier vorliegende Arbeit zeigt das Potential verschiedener Methoden der Bioinformatik und Systembiologie und verdeutlicht wie wichtig die Kenntnisse der Signalprozesse im Organismus für deren Verständnis sind. Ein solch tiefgehendes Verständnis ist unabdingbar für die Entwicklung individualisierter Therapien – und verspricht vor allem in der Tumorthherapie eine deutliche Steigerung der Erfolgsquote. Mit Gewinn des Forschungsverbunds FORTHiTher der Universität Würzburg konnte die hier vorgestellte Methodik bereits einen Beitrag zur Erforschung und Entwicklung der „Tumordiagnostik für individualisierte Therapie“ leisten.

Die Vielfalt und Vielzahl der während der Promotion erarbeiteten Ergebnisse und Erkenntnisse wurde in bisher vier Publikationen veröffentlicht. Alle während der Zeit der Promotion veröffentlichten Ergebnisse bilden die Basis dieser Thesis und sind für diese von großer Relevanz. Alle hier vorgestellten Ergebnisse wurden von mir, Martin Kaltdorf, selbstständig erarbeitet. Lediglich die weiterführende Entwicklung der verwendeten Algorithmen wurde mit meiner Unterstützung maßgeblich von Tim Breitenbach vorangetrieben.

Die Rekonstruktion, sowie die Simulation von biologischen Systemen trifft auf vielfältige Schwierigkeiten, die auch die hier detaillierte Arbeit beeinflussen.

Diese Schwierigkeiten, die erheblichen Einfluss auf eine probate Vorhersage des Verhaltens der simulierten Zelltypen haben, können in vier Klassen eingeteilt werden, auf die im folgenden Kapitel eingegangen wird, bevor die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen tiefergehend bewertet werden:

1. Die Rekonstruktion des Netzwerks aus Interaktionsdaten
2. Die Konsolidierung des Kern-Netzwerks, das zur Simulation verwendet wird
3. Die Validierung und der Vergleich der *in silico* Ergebnisse mit den entsprechenden experimentellen gewonnenen Daten
4. Die Anwendung der Kontrollzentralität zur Identifizierung bedeutender Netzwerkkomponenten

Neue Erkenntnisse deuten auf eine nicht unerhebliche Rolle von *Subcircuits*, regulatorischen Untereinheiten, in der Steuerung von GRNs hin. Regulatorische Elemente unterschiedlichster Organismen zeigen in vielen Fällen eine ähnliche Verschaltung. Diese Muster scheinen evolutionär sehr stark konserviert zu sein, wohingegen einzelne regulatorische Einflüsse starken Unterschieden in verschiedenen Organismen unterworfen sein können [257].

5.1.1 Rekonstruktion des Netzwerks aus Interaktionsdaten

Die Rekonstruktion des Gesamtnetzwerks, das als Basis für die Simulationen dient, ist stets von einigen Limitierungen betroffen:

Es existiert derzeit eine sehr große Menge an Interaktionsdaten, die sich in den meisten Fällen auf die reine Interaktion zweier Proteine konzentrieren, unter Umständen zusätzlich die Wirkweise dieser Interaktion untersuchen, d.h. des aktiven, dreidimensionalen Interaktionszentrum der beteiligten Proteine, aber in sehr vielen Fällen die weiterreichenden Auswirkungen dieser Interaktion nicht detaillierter beleuchten. Da für die Simulation in der hier vorgestellten Arbeit die reine Qualität der Interaktion essentiell notwendig ist (aktivierende, oder inhibierende Wirkung) konnten viele Quellen inklusive vieler Datenbanken nicht für die Rekonstruktion zurate gezogen werden. Aus diesem

Grund wurden nur eindeutig identifizierte „qualitative“ Interaktionen in das Netzwerk integriert. Deshalb erschwert sich die Rekonstruktion eines Netzwerks zusätzlich, da nur eine eingeschränkte Anzahl an Quellen verwendbar sind, deren Identifizierung jedoch aufgrund der Anzahl der allgemein zu Interaktionsdaten verfügbaren Quellen sehr aufwändig ist.

Der Einsatz einiger Datenbanken (KEGG [239], REACTOME [252]) erleichtert diese Arbeit, da die kuratierten Interaktionen die benötigten Informationen enthalten und so auf die ursprünglichen Quellen dieser Interaktionen verweisen. Diese durchgeführte Cross-Validierung der Interaktionen basierend auf den Datenbankquellen, sowie der betreffenden Literaturquellen, inklusive weiterer Referenzen, die über Querverweise aus der STRING-Datenbank [241, 244] gewonnen wurden ermöglicht eine möglichst adäquate Implementierung der Interaktionen in das rekonstruierte Gesamtnetzwerk. Aus diesem Grund wurden nur Interaktionen übernommen, für die entweder (1) genügend überzeugende Quellen für die betreffende Interaktion identifiziert werden konnte, oder (2) im Fall von widersprüchlichen Informationen eine Wirkung der Interaktion nachweislich widerlegt wurde und somit die alternativen Informationen bestätigt werden konnten. Auf diese Weise wurde die höchstmögliche Absicherung der Netzwerkstruktur durch entsprechende Quellen erzielt, welche für gültige Simulationen und realitätsnahe Vorhersagen des Verhaltens einer Zelle benötigt wird.

Eine weitere Schwierigkeit in diesem Zusammenhang manifestiert sich in dem rasanten Fortschritt des Kenntnisstandes: Durch neue Erkenntnisse können bisher sicher geglaubte Interaktionen zwischen zwei Komponenten widerlegt oder weitere Faktoren entdeckt werden, welche essentiell für die richtige Funktionsweise dieser Netzwerkverbindung sind. Diese Tatsache konnte nachträglich vielen der widersprüchlichen Quellen zugrunde gelegt werden. Deshalb basieren alle hier beschriebenen Netzwerke auf dem Kenntnisstand, der zum Ende der Arbeit gültig war (Dezember 2017). Neue Erkenntnisse und damit verbundene Veränderungen der bekannten Netzwerktopologie können nicht ausgeschlossen werden. Da bei der Rekonstruktion der Netzwerke allerdings ein Fokus auf allgemein etablierte und akzeptierte Signalwege gelegt wurde, die durchgehend sehr gut untersucht sind, können die Ergebnisse als robust angesehen werden. Verän-

derungen in der Netzwerktopologie und damit zusammenhängende Abweichungen einzelner Knoten von den hier vorgestellten Ergebnissen können somit vernachlässigt werden.

5.1.2 Konsolidierung des Kernnetzwerks

Neben der initialen Rekonstruktion, sind auch beim Schritt der Konsolidierung und Kompaktierung Einschränkungen zu beachten, die Auswirkung auf das Verhalten des Netzwerkes während der Simulationen nach sich ziehen können:

Beim Reduzieren der Netzwerkgröße gilt es, unwichtige Interaktionen zu entfernen ohne die allgemeine Funktion des Netzwerkes und aller wichtigen Signalwege zu beeinträchtigen. Die Struktur eines Netzwerkes ist mit zunehmender Größe zunehmend schwieriger zu überblicken. Deshalb werden die etablierten Signalwege, die im Netzwerk enthalten sind weitestgehend nicht verändert, da diese bereits durch vielfache Nachweise inklusive des Kuratierens der großen Datenbanken (KEGG, STRING, REACTOME) nachgewiesen sind. Die bei der aktuellen Fragestellung im Fokus liegenden Netzwerkkomponenten außerhalb dieser Kernsignalwege sollten möglichst direkt mit diesen verbunden sein. Einzelne Knoten, die lediglich einzelne ein- oder ausgehende Verbindungen in das Netzwerk bringen und für die Untersuchung nicht relevant sind wurden für die Simulation entfernt, da deren Einfluss als nicht relevant zu betrachten ist. Als Nebeneffekt resultiert daraus eine Beschleunigung der Berechnung der SSS und die Reduktion von Artefakt-Verhalten des Netzwerkes. Es gilt jede einzelne Interaktion des Netzwerkes auf Basis von Referenzliteratur zu validieren, und falls nicht möglich, fundiert zu begründen.

Mendoza [15] und DiCara [14] gelang der Nachweis, dass das simulierte Verhalten von Netzwerken durch eine Reduktion auf ein Bruchteil aller in einem Organismus aktiven Komponenten in allen untersuchten Beispielnetzwerken nahe genug an das im realen Organismus/Experiment beobachtete Verhalten der Zelle heranreicht. Vor allem unter der Prämisse, dass der hier verwendete Simulationsalgorithmus lediglich Ergebnisse im semi-quantitativen Rahmen zulässt, können die Ergebnisse der Simulation mit Hilfe des von Mendoza entwickelten Algorithmus als vollständig valide angesehen werden[38].

Auch Naseem et al [255] konnte nachweisen, dass das Verhalten der Simulierten Arabidopsis-Zelle auf Basis eines reduzierten Immunnetzwerks dem *in vivo* Verhalten der Pflanze entspricht.

5.1.3 Vergleichbarkeit der SSS mit experimentellen MicroArray-Daten

Die Validierung eines Netzwerk-Modells erfolgte in der hier vorgestellten Arbeit in erster Linie über die Resultate von MicroArray-Experimenten, bei denen das Transkriptom einer Zellkultur oder einer Gewebeprobe des untersuchten Organismus erfasst wird.

Der Hauptgrund ist hier in der guten Verfügbarkeit von Datensätzen zu unterschiedlichsten Fragestellungen gegeben (v.a. über Gene Expression Omnibus [258]). Die Anzahl an RNASeq-Datensätzen, sowie Proteomics Datensätze die zum Zeitpunkt dieser Arbeit frei zugänglich waren, waren stark begrenzt. Da RNASeq-Analysen aber zunehmend die MicroArray-Analysen ersetzen können diese in Zukunft verstärkt für derartige Analysen verwendet werden.

Eine MicroArray-Analyse stellt immer eine Momentaufnahme vom Zeitpunkt der Probenentnahme dar. Ob ein stabiler Dauerzustand erreicht wurde kann im lebenden Organismus nur bedingt festgestellt werden. Die Ermittlung eines *in vitro* Gleichgewichtszustandes ist allein deshalb beinahe unmöglich festzustellen, da durch die Änderungen eines einzigen Umgebungsparameters ein möglicher Gleichgewichtszustand verfälscht werden kann, bzw. wieder vollständig aus einem bereits etablierten Gleichgewicht gebracht werden kann.

Die SSS-Analyse eines Netzwerk-Modells mit Jimena hingegen ermittelt die finalen stabilen Systemzustände. Ein stabiler Zustand ist erst dann erreicht, wenn sich die Aktivität in allen Knoten im Netzwerk nicht mehr verändert.

Diese Tatsache gilt es bei der Validierung zu beachten und kann in vielen Fällen unterschiedliche Beobachtungen zwischen Simulation und Experiment erklären. Zusätzlich gilt mit einzubeziehen, dass die Präsenz einer mRNA nicht garantiert deren Transkription zum entsprechenden Protein nach sich zieht, da weitere Regulationsmechanismen auf Ebene der Transkription existieren, die in den hier detaillierten Fragestellungen nicht weiter mit einbezogen wurden.

Da die Simulationsergebnisse zunächst semi-quantitativer Natur sind können diese nicht direkt mit entsprechenden experimentellen Daten verglichen werden. Um die Datentypen vergleichbar zu machen, wurden die Simulationsdaten derart konvertiert, dass diese der in experimentellen MicroArray-Ergebnissen (Transkriptom-Datensätze) vorzugsweise verwendeten logFC-Daten entsprachen. Die zur Konvertierung verwendete Grund-Aktivität wurde für jeden Knoten auf den Mittelwert über alle berechneten SSS gesetzt. Ausgehend von diesem Wert wurden anschließend die logFC-Abweichungen ermittelt.

Mit Hilfe dieser Transformation können auch die relativen Werte der Simulationsergebnisse, die im Bereich 0-1 liegen mit den absoluten logFC der MicroArray-Experimente verglichen werden.

Die Validierung der *in silico* Berechnung (Simulation und SSS-Berechnung) mit experimentellen *in vitro* Daten wird durch diverse Batch-Effekte erschwert. Zu den Batch-Effekten gehören alle Abweichungen, die durch die spezifischen Unterschiede der Umgebungs-Bedingungen hervorgerufen werden, welche bei der Durchführung eines Experiments gelten. Batch-Effekte zwischen verschiedenen Experimenten über die gleichen Fragestellungen unterscheiden sich grundsätzlich minimal, auch wenn auf eine Einhaltung der exakten Replikation der protokollierten Bedingungen eines Experiments geachtet wird.

Faktoren, die hier zu beachten sind, sind:

- Temperatur
- Umgebungsdruck
- Kulturzeit
- Zelltyp und Zellherkunft
- Verwendete Medien und deren exakte Konzentration
- Minimale Unterschiede bei der Probenbehandlung des Experimentators

Bereits minimale Abweichungen können bei *in vitro* Experimenten zu Unterschieden führen, die eine Übertragbarkeit der Resultate zur Validierung von Simulationsmodellen erschweren oder gänzlich unmöglich machen.

Die in dieser Arbeit verwendete Validierung fand ausschließlich unter Einbeziehung der stabilen Systemzustände statt. Eine Validierung des dynamischen Netzwerkverhaltens

mittels zeitabhängiger Simulation wurde nur in Ausnahmefällen mit einbezogen (*A. thaliana*, [255]).

In der Simulation kann intermediäre Erhöhung eines Gens zwar nachgewiesen werden, jedoch nicht mit SSS-Analyse. Die SSS-Analyse dient lediglich einer Einschätzung der möglichen Entwicklungsschicksale des Modells.

Eventuell vorbelastete Erwartungshaltungen, die auch Unterbewusst existieren können, wurden durch die Verwendung von möglichst vielen Quellen für die Interaktionen auf ein Minimum reduziert.

Die Berechnung hingegen verläuft immer objektiv, da sie nicht beeinflussbar ist. Zusätzlich ist durch die schiere Größe der analysierten Netzwerkstrukturen eine Beeinflussung in eine bestimmte Richtung nahezu ausgeschlossen.

Durch die iterative Erstellung der Netzwerkmodelle und einer Anpassung von Berechnungsparametern, wie der Degeneration von Netzwerkknoten kann die Simulation mit der Basis von weiteren experimentellen Daten weiter angepasst werden. Dies wurde im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit aufgrund der dafür notwendigen Zusatzaufwände, die nicht zur Verfügung standen jedoch nicht vorgenommen.

Letztendlich stellt die hier beschriebene Vorgehensweise eine sehr stabile Methode dar, die auf der Reduktion auf das Wesentliche aufbaut und den Einfluss instabiler Störgrößen nachweislich vernachlässigt [14, 15, 38]. Somit eignet sich die hier verwendete Methode sehr gut um die tendenziellen Verhaltensweisen eines regulatorischen Netzwerks in biologischen Zellen zuverlässig zu beschreiben.

5.1.4 Kontrollzentralitäten zur Identifizierung bedeutender Netzwerkkomponenten

Da in gerichteten, regulatorischen biologischen Netzwerken gänzlich andere Wirkmechanismen gelten, als in allen anderen Netzwerken, die zudem meist ungerichteter Natur sind, kann die Mehrheit der etablierten Zentralitätsmaße keinen Mehrwert zur Analyse der Netzwerktopologie beitragen.

Die von Stefan Karl & Thomas Dandekar (2015) [233] vorgestellten *Kontrollzentralitäten* ermöglichen es erstmals drei spezifisch dynamisch definierte Zentralitätsmaße unter Einbeziehung der jeweiligen Rolle und des Einflusses eines jeden Knotens eines Netzwerks zu berechnen. Die Ergebnisse der Berechnung der Kontrollzentralität lassen eine

Klassifizierung der Knoten hinsichtlich Ihres Einflusses auf die (1) Stabilität (\rightarrow *Total Control Centrality*), (2) Steuerbarkeit (\rightarrow *Value Control Centrality*) und (3) Ihre Einbettung in eine der zentralen Signalkaskaden des untersuchten Netzwerks zu (\rightarrow *Dynamic Control Centrality*) (wie in Methoden 3.1.4 (4) beschrieben). Mit Hilfe der unterschiedlichen Kontrollzentralitäts-Maße lässt sich somit zuverlässig die Bedeutung eines jeden Knotens in der Gesamt-Topologie des untersuchten Netzwerks ermitteln. Weitere, noch unveröffentlichte Untersuchungen der Arbeitsgruppe, haben gezeigt, dass alternierende Berechnungszeiten zu geringen Abweichungen dieser Ergebnisse führen können. Mit einer sehr langen Rechenzeit können diese Schwankungen jedoch annulliert werden und sind reproduzierbar.

Allgemein gilt, dass Kontrollzentralitätswerte folgenden Regeln folgen: Sehr starken Einfluss in der entsprechenden Eigenschaft besitzen Knoten, die eine Kontrollzentralität von 10^{-3} oder größer besitzen. Starken Einfluss besitzen Knoten mit einem Kontrollzentralitätswert zwischen 10^{-6} und 10^{-3} , mittleren Einfluss Knoten mit Werten von 10^{-9} bis 10^{-6} und schwachen Einfluss Werte kleiner als 10^{-9} (siehe **Tabelle 7**).

Tabelle 7: Kategorisierung von Kontrollzentralitätswerten nach der Stärke des Einflusses eines Knotens mit einem Wert im entsprechenden Bereich.

SEHR STARK	STARK	MITTEL	SCHWACH
> 10^{-3}	10^{-6} bis 10^{-3}	10^{-9} bis 10^{-6}	< 10^{-9}

5.2 Mesenchymale Stammzellen

Das Potential der MSC für regenerativ-medizinische Therapien basiert auf ihrer allgemein guten Extrahierbarkeit aus dem adulten Körper. Die damit möglichen Ansätze zur Verwendung bei der Therapie mit körpereigenen Stammzellen profitieren stark von dem Differenzierungspotential des verwendeten Stammzelltyps deren therapeutischer Anwendung vor allem im Zusammenhang mit altersbedingten Erkrankungen sehr gute Heilungschancen bieten.

Obwohl der menschliche Organismus durch ein Konzert von mehr als 20.000 bekannten proteinkodierenden Genen reguliert wird, können viele Vorgänge und Zellschicksale auf

nur einen kleinen Bruchteil dieser Gene reduziert werden. Die Mechanismen, deren Zusammenspiel den zukünftigen Weg einer MSC beeinflussen werden aus nur sieben allgemein bekannten Signalwegen gebildet.

Das im Rahmen dieser Arbeit rekonstruierte regulatorischen Signalnetzwerks der MSC hat gezeigt, dass lediglich 161 Gene ausreichen um das Schicksal der multipotenten Zellen gezielt zu beeinflussen. Diese 161 Gene werden durch 346 Interaktionen miteinander verknüpft und bilden gemeinsam ein einerseits ausreichend engmaschiges Netzwerk um eine effektive Kontrolle der regulatorischen Verschaltungen zu gewährleisten. Andererseits ist das Netzwerk nicht zu lose verknüpft ist, sodass einzelne zufällige Fehlfunktionen keine kritischen Auswirkungen nach sich ziehen. Es hat sich gezeigt, dass ein Verhältnis V der Interaktionen I zu den Knoten K eines Netzwerks ($V = I/K$) zwischen 1,4 und 2,75 einen optimalen Bereich bildet (hier $346/161=2,149$) [233], der von natürlich vorkommenden Netzwerken in den meisten Fällen eingehalten wird. Die Topologie des Netzwerks ist im Detail in Abbildung 4 zu sehen (Quellen der Interaktionen siehe Anhang 6.2.1).

Untersuchungen haben gezeigt, dass bereits wenige Proteine und Gene ausreichen um den Kern der meisten Signalwege und Regulierungsmechanismen in allen Lebewesen abzubilden, was ebenso auf die mesenchymale Stammzelle zutrifft:

Der Kern des Netzwerks wird durch lediglich sechs unterschiedlichen Signalwege gebildet: dem WNT-Signalweg, dem TGFB/SMAD Signalweg, wozu auch die BMPs gehören, dem MAP-Kinase Signalweg, dem PI3-Kinase Signalweg, sowie der Regulation des Zellzyklus und der Zellteilung, sowie des kontrollierten Zelltods (= Apoptose).

Die Signalwege wurden entsprechend der hinterlegten Information in KEGG umgesetzt und an Überschneidungspunkten der verschiedenen etablierten Signalwege miteinander verknüpft. Zusätzliche Verbindungen sind weiteren Datenbanken wie REACTOME [251, 252] und STRING [27, 244], sowie einschlägiger Literatur entnommen um eine möglichst vollständige Integration der Teilnetzwerke zu erreichen. Zusätzlich wurden bekannte Stimuli und Marker-Faktoren dem Netzwerk hinzugefügt und ebenso wie oben beschrieben in das Netzwerk eingebunden.

Knoten, die nicht direkt mit den untersuchten Fragestellungen in Verbindung stehen und keinen weiteren Einfluss auf das Gesamtverhalten des Netzwerks hatten, wurden entfernt. Durch eine derartige Fokussierung des Netzwerks wird es erst möglich das Verhalten einer Zelle mit vertretbarem Aufwand (Rechenzeit/Rechenleistung) zu realisieren. Das resultierende Netzwerk besitzt mit einer Netzwerkdichte von 2,149 einerseits die Eigenschaft gut genug kontrolliert werden zu können (je kleiner die Dichte, desto besser) aber dennoch stabil genug zu sein um auf zufällige Störfaktoren robust reagieren zu können (je größer die Dichte, desto stabiler das Netzwerk)[233, 259].

Auf Basis des so entstandenen Netzwerks lässt sich die individuelle Aktivität eines jeden Knotens zwar nicht absolut quantitativ berechnen, die Genauigkeit ist aber so groß, dass eine fundierte Vorhersage der tendenziellen Aktivität möglich ist. Es hat sich gezeigt, dass die Ergebnisse aus allen bisherigen Anwendungsfällen des Algorithmus durch die entsprechenden experimentellen Daten unterstützt wird [21, 206, 260, 261].

Auffällig ist, dass das Netzwerk (siehe Abbildung 4) zum Kern hin eine sehr dichte Struktur aufweist und viele hochgradig verknüpfte Komponenten aufweist, während die Knoten zum Rand hin immer weniger Verbindungen besitzen. Dies entspricht der allgemeinen Eigenschaft von Scale-Free-Netzwerken und ist ein Kennzeichen von sehr robusten Netzwerken.

Die Ergebnisse der Berechnung der SSS mit seinen neun Systemzuständen, resultiert in drei unterschiedliche Gruppen, die durch eine Kategorisierung durch Clustering offenbart wurden. Jede einzelne dieser Gruppen steht für eine der untersuchten Differenzierungsrichtungen: Gruppe 1 zeigt mit einer erhöhten Präsenz von PPARG und CEBPA die Aktivität adipogenese-spezifischer Vorgänge. Obwohl diese Faktoren keine extreme Erhöhung anzeigen, können alle weiteren untersuchten Entwicklungsvorgänge in der Zelle ausgeschlossen werden, da diese sehr stark verringerte Aktivität aufweisen. Die beiden SSS dieser Adipogenese-spezifischen Gruppe 1 unterscheiden sich lediglich im Verhalten von β -Catenin (CTNNB1), das in SSS 8 eine leicht höhere Funktionsaktivität aufweist als in SSS 9. Allgemein betrachtet zeigt diese Gruppe somit tendenziell eine Differenzierung der MSC in Adipozyten und somit die Entwicklung von Fettgewebe [67, 72, 262].

Die zweite Gruppe ist mit 4 verschiedenen Vertretern gleichzeitig die größte: Allen SSS (1-4) ist die sehr starke Aktivität des Knotens „osteogenesis“ bzw. Osteogenese gemein,

der die generelle Aktivität von Osteogenese-spezifischen Faktoren zusammenfasst. Die wichtigsten Vertreter dieser Faktoren sind mit ALPL, RUNX2 und CTNNB1 ebenfalls in der Heatmap vorhanden. Obwohl die Erhöhung der Aktivität von ALPL und RUNX2 gemäß logFC nur sehr schwach ist, kann sich die Aktivität der Osteogenese langfristig durchsetzen, was durch die allgemein hohe Aktivität dieser Knoten in allen SSS erklärt werden kann. Ein zentraler Faktor hierfür könnte CTNNB1 sein, welches in allen vier Zuständen leicht bis stark erhöhte Werte besitzt, was in Einklang mit [124, 263, 264] steht. Obwohl ALPL und RUNX2 in den hier aufgelisteten Zuständen nur schwach positive logFC-Werte besitzt steht das aufgrund der allgemein hohen Aktivität nicht zwangsläufig dafür, dass deren Funktion zu vernachlässigen ist, da diese erwiesenermaßen sehr wohl für die Initiation der osteogenen Differenzierung von essentieller Bedeutung sind [67, 98, 273–275, 265–272]. Neben den erhöhten Werten für Osteogenese und CTNNB1 zeigen alle vier SSS zusätzlich eine leicht erhöhte Aktivität der adipogenen Marker-Faktoren CEBPA und PPARG. Die Differenzierung der MSC in adipogene Zellen kann aber aufgrund der antagonistischen Beziehung zwischen adipogenen und osteogenen Einflüssen ausgeschlossen werden, da bei osteogener Tendenz die Adipogenese unterdrückt wird [276–281]. Diese nachgewiesene entgegengesetzte Beziehung scheint durch die rekonstruierte Netzwerktopologie nicht vollständig abgedeckt zu sein, kann aber aufgrund der allgemeinen Wissenslage so postuliert werden. Die SSS der zweiten Gruppe können auf Basis des dendrographisch aufgezeigten Clusterings in der Abbildung 3 in zwei Untergruppen kategorisiert werden, die sich im Wesentlichen in der Aktivität der allgemeinen Zellzyklusfaktoren (hohe Aktivität des Zellzyklus bei Abwesenheit von CDKN1A und TP53, beziehungsweise reverses Verhalten bei deren Anwesenheit), sowie des Apoptose-Suppressors CFLAR. Trotz der Aktivität der generell als Apoptose induzierende Faktoren geltenden Proteine TP53 und CDKN1A, beides Faktoren in der negativen Regulation der Zellteilung, kann sich die Apoptose in keinem der vier SSS durchsetzen. Diese allgemeine Inaktivität der Apoptose kann einerseits auf die Präsenz von CFLAR zurückgeführt werden, welches eine anti-apoptotische Wirkung mittels einer Hemmung von CASP8 entfaltet. Bei Abwesenheit von CFLAR kann ein solches Verhalten durch die Aktivität einer der Knoten BCL2A1, PTPN1B, TRAF, SGK1 oder BCL2 erklärt werden, die alle hemmende Wirkung auf eine Entfaltung der Apoptose besitzen. Generell betrachtet

stellt diese Gruppe somit mögliche Aktivitätsmuster von MSC in tendenziell osteogene Entwicklungsstadien.

Die dritte Gruppe, bestehend aus drei SSS, präsentiert die Knorpeldifferenzierung (Chondrogenese) der MSC: eine hohe Aktivität von ACAN und SOX9, kombiniert mit Faktoren der Osteogenese sorgen für eine starke Erhöhung dieses Entwicklungsschicksals der MSC. Diese dritte Gruppe zeigt eine komplette Inaktivität der Adipogenese-spezifischen Entwicklung. Auch hier können aufgrund der differentiellen Aktivität des Zellzyklus und der Apoptose zwei unterschiedliche Gruppen unterschieden werden (Apoptose: SSS 5; Zellzyklus: SSS 6 und 7).

Zur Validierung der Simulationsergebnisse wurden entsprechende experimentelle Daten der GEO-Datenbank *Gene Expression Omnibus* verwendet (siehe Anhang 6.5). Jeder der sechs Datensätze wurde mittels GEO2R verglichen um die signifikant differentiell exprimierten Gene zu ermitteln. Dazu wurden die Ergebnisse anhand ihrer p-Values eingegrenzt (Grenzwert: $<0,05$) und die logFC transformierten Aktivitätsunterschiede ausgewählter Knoten/Gene in einer Tabelle den Simulationsergebnissen gegenübergestellt (siehe **Tabelle 4**). Um den Vergleich zu vereinfachen sind alle Aktivitätswerte durch eine eindeutige Symbolsprache ersetzt: im Vergleich hochregulierte Komponenten werden durch einen grünen Aufwärtspfeil dargestellt, herunterregulierte Komponenten durch einen roten abwärts-gerichteten Pfeil und nicht-eindeutige Komponenten durch einen gelben Horizontalpfeil. Zellen, für die aufgrund zu großer p-Values keine Werte zurate gezogen werden können sind mit „na“ ausgefüllt. Um die Übereinstimmung der Simulationsdaten mit den Experimenten zu verdeutlichen wurden für alle Entwicklungsschicksale die entsprechenden Vergleiche zusammengefasst und den berechneten Werten gegenübergestellt. Eine allgemein große Übereinstimmung wird dabei durch einen grünen Haken symbolisiert, widersprüchliche Daten werden durch ein rotes Kreuz markiert und unklare Fälle, bei denen in den Experimenten kein allgemeiner Konsens festzustellen ist, durch einen gelben Balken.

Bei den 36 Vergleichen, die sich für die 12 untersuchten Knoten und drei ausgewählten Fällen ergeben, zeigt sich, dass die Berechnung der Aktivitätsmuster bei der Hälfte der betrachteten Fälle adäquat (semiquantitativ, das heißt richtige Reihenfolge der Stärken) die experimentellen Referenzergebnisse widerspiegelt (17 von 36). Ein weiteres Viertel

ist kompatibel mit den experimentellen Daten (das heißt qualitativ richtig, die Berechnung zeigt, dass die Auswirkung der Regulation den experimentellen Ergebnissen entsprechen). Das verbleibende Viertel der Vergleiche zeigt widersprüchliche Verhaltensmuster zwischen Simulation und Experimente. Dies weist auf einen wichtigen Punkt in der Auswertung der Simulationsergebnisse hin: Die auf Basis der Simulation ermittelten Werte stellen die letztendlichen stabilen Zustände des Netzwerks dar. Die hierbei repräsentierte Aktivität ist an einem Gleichgewichtszustand angelangt, das sich mit zunehmender Zeit nicht mehr verändert.

Experimentelle Untersuchungen sind im Gegensatz hierzu immer Momentaufnahmen, da zusätzlich zu dem als final zu betrachtendem Zustand der Simulation basiert die Berechnung auf einem idealisierten, weil auf die Kernfunktionalität der untersuchten Aspekte konzentrierten Netzwerks. Es werden somit keine Schwankungen die sich im Experiment unerlässlich durch die allgegenwärtigen (wenn auch durch das Setup minimal gehaltenen) Schwankungen der Umweltbedingungen ergeben können durch die Simulation mit einbezogen. Durch die zeitlichen Ungenauigkeiten und Schwankungen der Umweltbedingungen der Experimente können Knoten aktiv/inaktiv sein, welche in den entsprechenden stabilen Systemzuständen bereits ihren, unter Umständen gegensätzlich ausgeprägten finalen Zustand einnehmen. Zumal manche Knoten lediglich für die Signaltransduktion zuständig sind und somit nur temporäre Aktivität zeigen, können widersprüchliche Ergebnisse im Vergleich (Simulation versus Experiment) in allen Fällen gut erklärt werden und sprechen nicht per se für einen faktischen Widerspruch an sich. Die Plastizität regulatorischer Netzwerke spielt eine essentielle Rolle für Adaptationsprozesse des Organismus an seine Umwelt. Abbildung 6 zeigt das plastische Verhalten des MSC-Modells unter Einfluss einer variierenden Anzahl an permanenten Stimuli. Mit Zunahme der möglichen Anzahl induzierender Faktoren ist ein exponentieller Anstieg der existierenden SSS zu beobachten (blaue Balken im Diagramm), der sogar noch die theoretischen Richtwerte gemäß 2^n (orange Balken) übertrifft. Bereits bei zehn potentiellen Stimuli ergibt sich hiermit eine Zahl von mehr als 1800 verschiedenen möglichen SSS. Diese hohe Zahl verdeutlicht die Flexibilität eines Organismus einerseits auf unterschiedliche Umwelteinflüsse und andererseits auf funktionale Veränderungen innerhalb der Netzwerktopologie reagieren zu können.

Jede Komponente eines regulatorischen Netzwerks hat unterschiedlichen Einfluss auf das Gesamtverhalten des Netzwerks. Die Kontrollzentralitätscharakteristika erlauben die Messung von drei Kernkompetenzen eines Netzwerks basierend auf dem Einfluss eines jeden einzelnen Knotens: der Steuerbarkeit der Gesamtopologie (VCC), der Anfälligkeit eines Defekts eines Knotens auf die Gesamtopologie (TCC) und die Integration in Signalkaskaden eines Knotens (DCC).

Betrachtet man die CC von wichtigen Marker-Genen des Netzwerks, so zeigt sich, dass ein Großteil davon einen sehr starken Einfluss auf das Gesamte Netzwerkverhalten hat. Diese Komponenten (RUNX2, OSX/SP7, SOX9, TP53) stellen einflussreiche Knoten im Netzwerk dar, welche maßgeblich für die Steuerung der Differenzierung in MSC verantwortlich sind.

Da dynamische Analysen lediglich empirische Erkenntnisse zulassen, welche Faktoren zu welchem Zeitpunkt aktiv/inaktiv sein müssen um ausgehend von einem gewählten Zustand einen Zielzustand zu erreichen, ergab sich im Rahmen dieser Dissertation die Erkenntnis, dass eine mathematische Herangehensweise notwendig ist. Die Weiterentwicklung des in Jimena implementierten Algorithmus von Mendoza & Xenarios 2006 [14, 15] erfolgt derzeit im Rahmen einer weiterführenden Arbeit (Kooperation mit Tim Breitenbach).

Die hier erlangten Erkenntnisse stellen somit eine solide Basis für vielfältige Forschungsarbeiten dar. Die exakte Berechnung der, qualitativen und temporalen Aktivität von Stimuli welche zur Steuerung des Zellschicksals von MSC notwendig sind, stellt dabei nur ein mögliches weiterführendes Forschungsthema dar.

5.3 Aspergillus

Obwohl nur sehr wenige Pilze das pathogene Potential besitzen höhere Tiere, uns Menschen inbegriffen, zu infizieren, stellen Pilzerkrankungen unter manchen Bedingungen, wie etwa Immunschwäche, eine für den Menschen lebensgefährliche Bedrohung dar. Der Ursprung dieser seltenen aber nicht zu unterschätzenden Wechselwirkung zwischen Pilz und Wirt wird in der evolutionären parallelen Entwicklung vermutet. Eine gängige Hypothese vermutet die Ursprünge des Potentials von Pilzen Tiere zu befallen in einem

Nachhall des evolutionären Kampfes zwischen Amöben und Pilzen. Die Fähigkeit von Pilzen andere Lebewesen zu infizieren ist in diesem Zusammenhang das Überbleibsel deren Verteidigungsstrategie im Überlebenskampf mit ihren Prädatoren, den Amöben [282, 283]. Aus diesem Grund dienen Amöben und Pilze auch als Modellsystem in der Erforschung von Pilzerkrankungen [282, 283].

Trotzdem ist es notwendig, auch das komplexe Zusammenspiel zwischen Menschen und dem infektiösen Pilz zu erforschen, was im Rahmen der hier vorliegenden Promotion mittels Netzwerkrekonstruktion der regulatorischen Zusammenhänge und deren Simulation unterstützt und mit Hilfe des Vergleichs experimenteller Ergebnisse validiert werden konnte:

Es ist nachgewiesen, dass in der humanen Immunantwort von dendritischen Zellen die durch den saprobionten Pilz *A. fumigatus* hervorgerufen wird, drei vorherrschende Rezeptoren die Vermittlung der Initiation der Signalantwort übernehmen: TLR2, TLR4 und Dectin-1 (auch CLEC7A genannt) [21, 284]. Die genaue Wirkweise dieser Faktoren ist allerdings immer noch nicht vollständig geklärt und bleibt deshalb ein wichtiger Fokus der Erforschung von der Interaktion von *A. fumigatus* mit dem humanen Immunsystem.

Die Topologie des rekonstruierten Netzwerkmodells repräsentiert an den zwei Hauptstimuli eine Möglichkeit der dauerhaften Aktivität mittels autoaktivierender Interaktion, um deren Auswirkung in den Fokus der Untersuchung zu rücken (siehe Abbildung 9B): *A. fumigatus Germ Tubes* (im Folgenden gleichbedeutend erwähnt mit *A. fumigatus*) und humane Thrombozyten (auch Blutplättchen genannt, im Beispiel auf Englisch: Platelets). Dies hat zur Auswirkung, dass bei der Aktivierung einer dieser Faktoren eine statische Induktion des entsprechenden Signaltransduktionswegs erfolgt. Die darauf basierende Erwartung der sich ergebenden Analyseergebnisse der Berechnung der SSS manifestiert sich somit in vier verschiedenen Szenarien, die alle mindestens durch einen Vertreter in den Ergebnissen enthalten sind (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Übersicht der Aktivitätsmuster von Platelets und *A. fumigatus*, die aus der Berechnung der SSS resultieren.

1		Platelets aktiv		<i>A. fumigatus</i> aktiv	SS: 6,8
2		Platelets inaktiv		<i>A. fumigatus</i> inaktiv	SS: 1,2,3,10
3		Platelets aktiv		<i>A. fumigatus</i> inaktiv	SS: 4,7
4		Platelets inaktiv		<i>A. fumigatus</i> aktiv	SS: 5,9

Obwohl die Hauptfaktoren innerhalb einer Gruppe stets gleiche Aktivitätsmuster aufweisen, zeigt sich, dass bereits in einem so kleinen Netzwerk, wie es hier vorliegt alternative Signaltransduktionswege für die Aktivierung wichtiger Immunsubnetzwerke existieren. Während sich bei der gleichförmigen Aktivität von Platelets und *A. fumigatus* beide SSS in fast allen Knoten identisch verhalten und nur in wenigen Punkten minimale Unterschiede festzustellen sind (wie z.B. bei TNF), sind bei allen anderen Gruppen teils gravierende Differenzen zu erkennen.

Bei gleichförmiger Inaktivität von Platelets und *A. fumigatus* sind vollkommen gegensätzliches Verhalten bei beinahe der Hälfte aller im Detail betrachteten Faktoren zu erkennen (TLR2, IL6, CD80, CD83, CD86, TNF). Diese sind in den SSS1, 2 und 3 durchgehen inaktiv. In SSS10 hingegen zeigen sie eine stark ausgeprägte Aktivität. Bei aktiven Platelets und inaktivem *A. fumigatus*-Einfluss zeigt sich gegensätzliches Verhalten von allen Vertretern der Oberflächenmarkerproteine CD80, CD83 und CD86, sowie von TNF. Bei inaktiven Platelets und aktiviertem *A. fumigatus*-Einfluss zeigen sich ebenfalls gegensätzliche Aktivitätsmuster, beide in untersuchten Oberflächenmarkern (CD80, CD83 und CD86). Außerdem unterscheiden sich beide SSS durch eine gegensätzliche Aktivität des Interleukins IL6. Dies weist auf einen wichtigen Zusammenhang zwischen der Aktivität von Platelets und der Entzündungsreaktion des Organismus, der unter anderem durch die Aktivität der Oberflächenmarkern (CD80, CD83 und CD86) induziert werden kann: bei hoher Aktivität der in der Immunantwort beteiligten Oberflächenproteine kann die Anwesenheit von Platelets die Entzündungsreaktion hemmen. Diese *in silico* Erkenntnis konnte bereits durch experimentelle Daten nachgewiesen werden [21] und kann dazu beitragen zukünftige Therapiestrategien gegen invasive Aspergillose zu entwickeln. Eine dadurch gehemmte Entzündungsreaktion hat positive Auswirkungen auf die Erfolgsaussichten der humanen Immunantwort auf eine Infektion durch *A. fumigatus*. Die stabilen

Systemzustände weisen ebenfalls darauf hin, dass immunregulatorische Oberflächenmarker nicht exklusiv durch Pathogene induziert werden können, sondern ebenfalls alternative Signalwege existieren, die eine Immunantwort auslösen können. TNF konnte auf Basis der berechneten stabilen Systemzustände Auslöser für eine alternative, vom pathogenen Erreger unabhängige Induktion einer allgemeinen Immunantwort und für eine Entzündungsreaktion des betroffenen Gewebes sein (verdeutlicht durch die Aktivität von CD80, CD83, CD86 und IL6 in SSS10). Eine spezifische Immunantwort kann auf Basis des rekonstruierten Netzwerkmodells allerdings lediglich durch die Anwesenheit von *A. fumigatus* ausgelöst werden, was durch die hohe Aktivität von Dectin-1 in allen SSS mit aktiven *A. fumigatus* verdeutlicht wird. Dectin-1 ist ausschließlich in SSS aktiv, welche durch Anwesenheit des pathogenen Erregers charakterisiert sind, diese Erkenntnisse decken sich durchgehend mit den experimentellen Erkenntnissen von Czakai et al. 2017 [21].

Untersucht man die Struktur des Netzwerks mittels der Kontrollzentralitätsanalyse, so fallen drei primäre Faktoren als *Master-Regulatoren* ins Auge: 1- *A. fumigatus* Germ Tubes; 2. Platelets; 3. TNF. 1, 2 und 3 zeigen sehr starkes Potential zur Kontrolle des Netzwerks und sind zentrale Knoten der wichtigsten Signalwege (VCC und DCC $>10^{-3}$, siehe Abbildung 9A). Die Tatsache, dass sich diese drei Komponenten zusätzlich durch sehr starke TCC- Werte auszeichnen (TCC $>10^{-3}$, siehe ctin-1, IL1B, TLR2 und TLR4 auf

Die erweiterte Kontrollzentralitätsanalyse der wichtigsten Komponenten der Immunantwort zeigt, dass eine Mehrzahl davon sehr starke TCC Werte aufweisen, was deren essentielle Rolle in dieser Signalantwort verdeutlicht: Neben den bereits erwähnten primären Kontrollknoten AF Germ Tubes, Platelets/Plättchen und TNF, die gleichzeitig zu den hohen TCC auch hohe VCC und DCC Werte präsentieren, zeigen CCL5, Dectin-1/CLEC7A, IL1, IL6, TLR2 und TLR4 auffällig hohe TCC- und DCC-Werte (Details siehe Tabelle 5).

Weitere Untersuchung der Arbeitsgruppe haben ergeben, dass die Genauigkeit der Ergebnisse weiter erhöht werden kann, wenn die Berechnung auf sehr viele Simulationen ausgeweitet wird. Durch eine ausreichende hohe Anzahl an Simulationen ist es möglich konvergente Simulationsergebnisse zu berechnen. Solche konvergenten Ergebnisse konnten bei der hier verwendeten begrenzten Anzahl an Simulationen nur durch sehr

großen Zufall zu beobachtet werden. Diese Erkenntnisse werden bei der noch ausstehenden Publikation der hier vorliegenden Ergebnisse berücksichtigt während hier zuerst einmal das vorläufige Ergebnis präsentiert wird um die Hintergründe aufzuzeigen.

Tabelle 5) verdeutlicht die Anfälligkeit des Netzwerks durch einen Verlust der Funktion einer dieser Knoten.

Die Untersuchung der Kontrollzentralität aller Knoten ergab keine weiteren Auffälligkeiten, die eine besondere Funktion andeuten.

Die Vielzahl der Knoten im Netzwerk mit sehr starken TCC Werten, verdeutlicht deren essentielle Rolle in dieser Signalantwort: Dazu gehören neben den Hauptregulatoren (AF Germ Tubes/*A. fumigatus*, Platelets/Plättchen und TNF), die gleichzeitig zu den hohen TCC auch hohe VCC und DCC Werte präsentieren, auch die Knoten CCL5 (Chemokine, [248]) , IL1, IL6, (Interleukine, [248]), Dectin-1/CLEC7A, TLR2 und TLR4 (Rezeptoren, [248]) mit auffällig hohen TCC und DCC Werte.

Dies spricht für deren essentielle Rolle in der Immunantwort. Bei Verlust der Funktion dieser Proteine wird die Funktion der gesamten Immunantwort beeinträchtigt, die Funktion kann in einem derartigen Fall auch nicht durch einen alternativen Signaltransduktionsweg kompensiert werden und ist somit als essentiell für eine intakte Funktionsweise des untersuchten Systems, hier der menschlichen dendritischen Zelle zu betrachten [285–288]. Somit ist es nicht verwunderlich, dass diese Knoten alle in wichtigen Signaltransduktionskaskaden beteiligt sind.

Knoten die eher downstream im Netzwerk angeordnet sind, besitzen laut ihren Kontrollzentralitätswerten einen deutlich geringeren Einfluss auf das Gesamtnetzwerk. Hierzu sind vor allem Endpunkte des Netzwerks wie CD80, CD83 und CD86 zu zählen (alle CC-Werte $\ll 10^{-9}$). Diese Komponenten sind in unserem Fall für die Untersuchung zwar von zentraler Bedeutung, für die reine Funktionsweise des Netzwerks besitzen diese Faktoren jedoch eine untergeordnete Rolle, da diese nur einen kleinen Einfluss auf das Verhalten des Gesamtnetzwerks aufweisen.

Die semiquantitative dynamische Simulation des Verhaltens des regulatorischen Netzwerks in dendritischen Zellen unter Einfluss von *A. fumigatus* und Platelets offenbart einen Schwellwert der Aktivität von *A. fumigatus*, der überschritten werden muss, um

eine Immunantwort auszulösen. Bei einer Aktivität von 0,18: leichte dauerhaften Erhöhung der Aktivität (siehe Abbildung 10A). Bei einer *A. fumigatus* Aktivität von 0,19 (siehe Abbildung 10B) wird der Schwellwert überschritten, der das Gleichgewicht stabil halten kann. Die Aktivität des Netzwerks verlagert sich in einen Zustand erhöhter Immunreaktion in der Zielzelle. Während eine weitere Erhöhung der Induktionswerte den Umschwung deutlich beschleunigt, bleibt der Endzustand der Aktivierten Knoten der gleiche, wie der Endzustand des langsamen Umschwungs ausgelöst durch eine knappe Überschreitung des Schwellwertes.

Die Unterschiede des simulierten Verhaltens von IL6 in Antwort auf die Anwesenheit des primären Stimulators *A. fumigatus* ohne und unter Einfluss der Platelets, die in Abbildung 10D dargestellt sind, zeigen, dass Platelets eine zentrale Rolle in der Vermittlung und Art der Immunantwort in dendritischen Zellen hat. Die Simulationsergebnisse bestätigen die experimentellen Erkenntnisse, dass Platelets die Entzündungsreaktion hemmen können, welche durch Interleukine wie u.a. IL6 und IL1B hervorgerufen werden [21, 168, 289]. Eine solche Reduktion der inflammatorischen Antwort im Rahmen der Immunantwort bringt vielversprechende Verbesserungen für den Erfolg der Heilungschancen mit sich, die durch Pathogene Infektionen wie *A. fumigatus* ausgelöst werden können [21].

Alle allgemein in **Tabelle 4** aufgeführten Punkte gelten für die Untersuchung dieses Netzwerks. Zusätzlich kommt im Zusammenhang mit der Untersuchung der Interaktion mehrerer beteiligter Organismen die Schwierigkeit der metagenomischen Analyse. Vor allem der Vergleich der Ergebnisse aus den *in silico* Untersuchungen (Rekonstruktion, Simulation, Vorhersage) mit experimentellen Ergebnissen aus RNASeq und MicroArray-Experimenten wird dadurch erschwert, dass in manchen Fällen nicht eindeutig festgestellt werden kann, welches Gen/Protein zu welchem Organismus gehört.

5.4 *Arabidopsis thaliana*

Bereits heute sehen wir die Folgen des weltweiten Klimawandels: vor allem in der Landwirtschaft ist in den vergangenen Jahren weltweit eine Häufung von Ernteaussfällen aufgrund von Dürren zu beobachten [290]. Doch nicht nur Wassermangel macht Pflanzen im Zusammenhang mit einer global steigenden Temperatur und CO₂-Konzentration zu schaffen. Aktuelle Studien konnten zeigen, dass die Verteidigungsfähigkeit von Pflanzen gegen Pathogene durch eine erhöhte Temperatur und CO₂-Konzentration signifikant beeinträchtigt wird [291–293]. Um zukünftige Ernteerträge zu sichern und so eine globale Lebensmittelversorgung sicherzustellen, ist es deshalb notwendig die Verteidigungsmechanismen von Pflanzen gegen Pathogene besser zu verstehen und wenn nötig gezielt zu unterstützen.

Diese Arbeit zeigt die komplexen Zusammenhänge und Interaktionen zwischen dem Wirt *Arabidopsis thaliana* und dem weltweit verbreiteten Pflanzen-Pathogen *Pseudomonas syringae pv tomato DC 3000 (PstDC3000)*. Ein besseres Verständnis des Modellsystems und der Intrazellulären Vorgänge in *Arabidopsis thaliana* während der Infektion durch *PstDC3000* kann das allgemeine Verständnis der Prozesse bei der Infektion von Pflanzen verbessern und bringt so einen großen Nutzen um zukünftige landwirtschaftliche Erträge weltweit zu sichern und somit die globale Nahrungssicherheit zu unterstützen [294].

Das pflanzliche Interaktom ist ein in sich verbundenes Netzwerk bestehend aus pflanzlichen Proteinen, RNAs, Phytohormonen, sowie weiteren chemischen regulatorisch aktiven Derivaten. Die komplexe Verschaltung innerhalb dieses Netzwerks ist bereits an den wenigen im hier vorgestellten Netzwerkmodell für die pflanzliche Immunreaktion ersichtlich.

Trotz Fokus auf die Immunantwort sind viele Proteine und Phytohormone neben der Steuerung von Verteidigungsreaktionen gegen eine Vielzahl von Pathogenen ebenfalls in andere pflanzliche Prozesse eingebunden. Am Beispiel der in dem hier vorgestellten Netzwerk zentralen Phytohormone Auxin, Cytokinin [192, 203, 295], Gibberellin, JA und SA [182, 231], die alle zusätzlich zur Immunregulation, zentrale Bestandteile der Steuerung von allgemeinen Stressreaktionen, Wachstumsregulation, sowie allgemeiner pflanzlicher Entwicklungsprozesse darstellen.

Die teils antagonistischen Beziehungen zwischen Immunfunktionen und dem Wachstumsprozess in Pflanzen, die unter anderem durch die hier vorgestellten Phytohormone reguliert werden, zeigen somit wie die begrenzten Ressourcen, die einer Pflanze zur Verfügung stehen optimal genutzt werden können, indem für den Moment essentielle Prozesse aktiviert und verstärkt werden, während zwar ebenso wichtige aber akut irrelevante Prozesse verlangsamt oder ganz ausgesetzt werden [169, 176, 177, 183, 190, 198]. Trotz der komplexen Zusammenhänge hat sich gezeigt, dass Netzwerke, welches auf seine Kernfunktionen reduziert ist zu Simulationszwecken in semiquantitativer Hinsicht aussagekräftige Ergebnisse produzieren können [15, 38, 233]

Die allgemeine Netzwerktopologie der Regulation der pflanzlichen Immunantwort in *A. thaliana* entspricht, wie bereits die vorangegangenen Netzwerke der allgemeinen Struktur eines skalenfreien Netzwerks (im Weiteren bezeichnet als „Scale-Free Netzwerk“). Während viele Knoten mit wenigen Verbindungen existieren, sind einige wenige Knoten zentral angeordnet und besitzen sehr viele Interaktionen. An diesen sogenannten Hub-Knoten laufen viele verschiedene Signale zusammen. Ein Scale-Free Netzwerk zeichnet sich durch seine Struktur bestehend aus wenigen Hubs und vielen wenig vernetzten Knoten aus, dadurch ist es sehr robust gegen zufällige Funktionsausfälle einzelner Knoten. Lediglich wenn eine funktionsbeeinträchtigende Mutation einen der Hub-Knoten betrifft wird die allgemeine Funktion des Netzwerks grundlegend verändert.

Die Netzwerkdichte von 1,548 zeigt zusätzlich, dass sich das Netzwerk einerseits sehr gut kontrollieren lässt, aber andererseits auch stabil gegenüber Störgrößen ist. Dies entspricht den Eigenschaften der meisten bekannten natürlichen biologischen Regulationsnetzwerke [39].

Die Analyse der SSS zeigt drei mögliche Gleichgewichtszustände:

Einer der SSS (SSS Nr.1, Abbildung 12B) steht für das Verhalten der pflanzlichen Zelle in Abwesenheit des Pathogens *PstDC3000*: keiner der beobachteten Knoten die an der Immunantwort beteiligt sind zeigt eine erhöhte Aktivität.

SSS2 stellt eine erhöhte Aktivität von JA und Auxin in Abwesenheit eines Pathogens dar. Beide Komponenten stellen neben ihrer Rolle in der pflanzlichen Immunantwort eine wichtige regulatorische Komponente des pflanzliches Wachstums dar: während JA eher

hemmend auf das Wachstum wirkt [296] ist Auxin ein wichtiger positiver Regulator für das pflanzliche Streckungswachstum [297]. Die gleichzeitige Aktivität dieser beiden Komponenten weist auf einen interessanten Anknüpfungspunkt für zukünftige Untersuchungen der wechselseitigen Beziehungen dieser beiden zentralen regulatorischen Komponenten hin [22, 23].

Der dritte SSS stellt die Aktivität der untersuchten zentralen Knoten in Reaktion auf die Anwesenheit des Pathogens *PstDC3000* dar: Bei kompletter Aktivität von *PstDC3000* zeigt sich, dass auf Dauer auch Abscisinsäure ($\sim 1,0$, ABA, engl. *abscisic acid*) und Auxine ($\sim 0,85$) ein sehr hohes Aktivitätslevel erreichen. JA ist hingegen nur leicht erhöht ($\sim 0,2$). ABA ist bekannt dafür eine wichtige Rolle in der Abszission (engl. *abscission*), dem kontrollierten Abtrennen von Pflanzenteilen vom restlichen Organismus, einzunehmen. Im Kontext mit einer dauerhaften Aussetzung der pflanzlichen Zelle mit pathogenen Erregern lässt dieses Aktivitätsmuster den Rückschluss zu, dass die Aktivität von ABA in der pflanzlichen Zelle vom Pathogen hochreguliert wird um die pflanzliche Immunreaktion zu schwächen [298, 299], was den weiteren Verlauf der Infektion von Seiten des Pathogens deutlich erleichtert.

Basierend auf den Ergebnissen der Berechnung der Kontrollzentralität (siehe **Abbildung 12**), konnten fünf zentrale Masterregulatoren für das Netzwerk von *A. thaliana* ermittelt werden ($VCC \ \& \ DCC > 10^{-3}$): TGA Transkriptionsfaktor, JA, Ent-Kaurenoate-Oxidase, Ent-kaurene-Synthase und Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase.

Während die große Bedeutung von TGA (Zhang et al. 2006 [300]) und JA (Naseem et al. 2013 [177]) für die pflanzliche Immunantwort nachgewiesen werden konnte, konnte der große Einfluss der Immunantwort durch die beiden letzteren (Ent-kaurene-Synthase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase) erst durch die neue Methode der Berechnung der Kontrollzentralität im Rahmen dieser Arbeit aufgedeckt werden. Die Enzyme Ent-Kaurenoate-Oxidase [301] und Ent-kaurene-Synthase sind bereits lange als wichtiger Regulator für die Gibberellin-Synthese bekannt [302, 303]. Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, welches bisher vor allem als wichtiger Regulator in der Aminosäuresynthese gilt [304, 305], ist in Hinsicht auf seiner immunregulatorischen Rolle ein bisher weitge-

hend unbekannter Faktor. Die Untersuchung dieses Faktors ist auf Basis der hier zugrunde liegenden Daten als interessanter Ansatzpunkt für zukünftige Forschungsarbeiten einzuschätzen.

Zusätzlich können weitere drei Knoten mit einem großen VCC-Wert weitere Ansatzpunkte für zukünftige tiefergehende Untersuchungen bieten:

Während die Bedeutung von *PstDC3000* als Pathogen essentiell für die initiale Erstellung des Netzwerks einzuschätzen ist, sind die weiteren drei Knoten eher unbekannte regulatorische Faktoren: Ent-Copalyl-Diphosphate-Synthase, Phytoene-Synthase und Aspartat-Kinase.

Eine Berechnung der VCC führte aufgrund der rekonstruierten Netzwerktopologie zu keinem verwendbaren Ergebnis. Keine der Berechnungen der VCC konnte ohne Absturz des Jimena-Frameworks durchgeführt werden.

Die Ergebnisse der dynamischen Simulation des *A. thaliana* Netzwerks sind identisch mit den Ergebnissen aus Naseem et al. 2012 [255]. Das simulierte Szenario entspricht einer kurzzeitigen Infektion der *A. thaliana* Zelle mit *PstDC3000*. Die Reaktion der Pflanzenhormone ABA, JA, SA, sowie des *Pathogenesis-related protein 1* (kurz PR1) als Schlüsselprotein des SA-abhängigen Signaltransduktionswegs stehen in der Simulation im Fokus. Die initial hohe, kurzzeitige Aktivität von *PstDC3000* induziert in der befallenen Zelle eine zweistufige Abwehrreaktion, die am deutlichsten durch den pflanzlichen Faktor PR1 repräsentiert wird, der direkt mit der Resistenz der Pflanze gegen Pathogene assoziiert ist. Die erste Welle hoher PR1 Aktivität wird durch eine sehr direkte Antwort der Faktoren NPR1 und PAD4+EDS1 auf die Anwesenheit von *PstDC3000* hervorgerufen. Die anschließende Repression der Immunantwort kann auf Basis der dynamischen Simulation auf eine zwischenzeitliche hohe Aktivität von WRKY25/WRKY33 zurückgeführt werden. Im Anschluss dazu induziert das pflanzliche Immunsystem die Immunantwort wiederum mittels dem MAP-Kinase Signalwegs, sowie PAD4+EDS1, die immer noch eine sehr hohe Aktivität aufweisen, zwischenzeitlich allerdings durch hemmende Einflüsse überlagert wurden und nun wieder ihre Wirkung entfalten können.

Die Möglichkeit diese Zusammenhänge in der Simulation nachzuvollziehen ermöglicht es das Zusammenspiel vieler unterschiedlicher Faktoren zu untersuchen. Jede einzelne

Komponente des Netzwerks kann durch die Berechnung mit Jimena detailliert untersucht werden. Hemmende und aktivierende Einflüsse die unter Umständen erst durch indirekte Interaktionen zustande kommen können dadurch eingegrenzt und in ihrem Kontext betrachtet werden.

5.5 Fazit

Die Untersuchung von Genregulatorischen Netzwerken hat den Vorteil unvoreingenommen zu sein. Während sich die experimentelle Wissenschaft und viele detaillierte bioinformatische Studien im Mittel auf wenige Hauptakteure unter den Proteine und Gene konzentrieren, kann die systematische Herangehensweise der Untersuchung des gesamten Zusammenspiels aller bekannten beteiligten Komponenten neue Einflüsse aufdecken. Diese Einflüsse können, obwohl noch völlig unbekannt, erhebliche Auswirkungen auf die Steuerung ganzer Signalwege besitzen [306].

Experimentelle Untersuchungen können durch eine gezielte Anwendung von systembiologischen Simulationen regulatorischer Netzwerke in Zukunft unterstützt werden, was sowohl die benötigte Zeit reduziert, und zusätzlich dabei hilft, die chancenreichsten Aspekte einer Forschungsarbeit in den experimentellen Fokus zu rücken. Der Kenntnisstand über Interaktionen zwischen Genen, RNA, Proteinen und weiteren regulatorisch aktiven Komponenten nimmt stetig zu. Eine Aufbereitung der zur Verfügung stehenden Daten in Form von semiquantitativen Netzwerkmodellen wie sie in dieser Arbeit vorgestellt sind können somit einen sehr großen Mehrwert für zukünftige Forschungsansätze und Forschungsarbeiten leisten.

Trotz der vielversprechenden Aussichten, die eine Anwendung von systembiologischen Ansätzen, wie die hier vorgestellte Methodik, mit sich bringen, wächst das Bewusstsein und deren allgemeine Akzeptanz nur langsam. Als großes Hindernis hat sich im Rahmen dieser Dissertation die Verfügbarkeit adäquater diskreter Interaktionsdaten herausgestellt, insbesondere gerichtete Interaktionen (Inhibitionen und Aktivierungen zwischen Interaktionspartnern). Diese werden für die Integration einer Interaktion in das zu rekonstruierende Netzwerkmodell jedoch zwingend benötigt. Viele Interaktionsdatentypen können nicht uneingeschränkt zur Integration einer Komponente zu Rate gezogen

werden. Co-Expressionsdaten verraten lediglich die gleichzeitige Expression zweier Gene, sagen jedoch nichts über deren Wechselwirkungen aus. Die Co-Expression zweier Gene deutet auf eine hohe Wahrscheinlichkeit hin, dass diese in Wechselwirkung zueinanderstehen, sagt jedoch nichts Eindeutiges über die Natur der Interaktion aus.

Protein-Homologien, die im Allgemeinen zur Eingrenzung der Funktion eines neu entdeckten Proteins verwendet werden können, lassen zwar Rückschlüsse auf die wahrscheinliche Funktion eines Protein zu, können aufgrund Ihrer spekulativen Natur jedoch nicht als verlässliche Quelle zur Integration in ein regulatorisches Netzwerk verwendet werden.

Viele Interaktionsvorhersagen basieren auf der abhängigen Lokalisation zweier Gene auf dem entsprechenden Genom, was als Hinweis angesehen wird, dass zwei Proteine mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit miteinander interagieren, doch auch hier sind die Ergebnisse der derzeitigen Forschung nur bedingt zur systembiologischen Simulation zu verwenden: *Gene Co-Occurrence* [27, 241, 244], beschreibt die Konservierung des gleichzeitigen Vorkommens eines Interaktionspaares in unterschiedlichen Organismen. Dies erlaubt jedoch keine verlässlichen Rückschlüsse auf deren tatsächliche interaktive Wirkung. Konservierte Gen-Nachbarschaft (*Conserved Neighbourhood*) verdeutlicht das konservierte benachbarte Vorkommen zweier Proteine, was als Hinweis auf eine wahrscheinliche Interaktion angesehen wird [27, 241, 244]. Allerdings lassen sich auch durch diese Eigenschaft keine diskreten Funktionsabhängigkeiten schlussfolgern. Auch die Fusion zweier Gene im Vergleich zu anderen Organismen deutet auf eine gegenseitige Wechselbeziehung hin, da eine Genfusion nur im Hinblick auf einen evolutionären Vorteil Sinn macht und dieser lediglich durch eine starke Abhängigkeit der zwei ursprünglichen, getrennten Gene hinweist.

Alle voran genannten Gen-analytischen Ansätze können bei der Integration eines regulatorischen Netzwerks als Grundlage dienen benötigen jedoch ergänzende Informationen, die nur durch experimentelle Nachweise erbracht werden können (siehe beispielsweise Czakai et al. 2016 [21]). Da experimentelle analytische Verfahren jedoch einen bedeutenden Mehraufwand mit sich bringen, erklärt sich die noch begrenzte Verfügbarkeit verlässlicher diskreter Interaktionsdaten, die für die Simulation regulatorischer Netzwerke verwendet werden können.

Bestehende Datenbanken enthalten aufgrund dessen nur eine begrenzte Anzahl direkt verwendbarer diskreter Interaktionsdaten:

Die *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG)[237–240], die bis heute wohl umfangreichste und kontinuierlich gepflegte Sammlung molekularbiologischen Wissens enthält in seiner Pathway-Plattform zahlreiche als diskret verwendbare Interaktionen. Da sich diese Datenbank jedoch auf einzelne Signalwege fokussiert, konnte im Rahmen dieser Arbeit festgestellt werden, dass sich Interaktionen zwischen gleichen Interaktionspartnern von Signalweg zu Signalweg unterscheiden können. Dies liegt zum einen daran, dass intermediäre Signalbotenstoffen in manchen Signalwegen keine Rolle zu spielen scheinen, in anderen Signalwegen allerdings durch alternative Einflüsse gesteuert werden können. Durch dieses widersprüchliche Daten eignen sich die in KEGG hinterlegten Daten zwar als Grundlage zur Rekonstruktion von regulatorischen Netzwerken für die Simulation und Vorhersage mit Jimena, nicht jedoch als allgemein und alleinig verwendbare Informationsgrundlage.

Wu et al. 2016 [252] konnte zeigen, dass durch ein automatisiertes Analyseverfahren aller in der Reactome-Datenbank enthaltenen Daten [251, 252] funktionelle Interaktionen erschlossen werden können. Diese Interaktionen konnten im Rahmen dieser Arbeit in vielen Fällen durch Übereinstimmung mit den hier rekonstruierten Netzwerkinteraktionen bestätigt werden.

Da diese Analyse allerdings losgelöst von der eigentlichen Funktionalität der Reactome-Datenbank erfolgte und stand heute nicht integriert abläuft, baut der derzeit letzte Stand der Einträge auf dem Datenbankstand von Reactome des Jahres 2017 auf.

Zusätzlich zu den Schwierigkeiten bei der Rekonstruktion hat sich gezeigt, dass die Übertragbarkeit experimenteller Versuche auf die Ergebnisse der Simulationen ausgebaut werden kann.

Da für den Vergleich der semiquantitativen Simulationsergebnisse keine absolut quantitative experimentelle Ergebnisse benötigt werden und die differenzielle Expression für eine Auswertung ausreichend ist, hat sich gezeigt, dass MicroArray-Experimente in den meisten Fällen ausreichen um ein Netzwerk und dessen Verhalten in Abhängigkeit verschiedener Umweltfaktoren adäquat zu verifizieren.

Obwohl RNA-Seq Ergebnisse eine Vielzahl an zusätzlichen Erkenntnissen generieren, existieren noch einige Gründe, die einen Vergleich erschweren und aufgrund der semi-quantitativen Natur der Simulationen keinen Mehrwert bereitstellen können: Die Auswertung der RNA-Seq Daten folgt derzeit noch keiner standardisierten Vorgehensweise, was eine Analyse der Rohdaten voraussetzt, die mit den eigenen Methoden ausgewertet werden. Da bei diesem Prozess nur ein Bruchteil der Daten relevant für den Vergleich mit dem Netzwerk ist, bleibt ein Großteil der ausgewerteten Resultate erhalten. Dieser Mehraufwand hat jedoch erhebliche Mehrkosten zur Folge. Da das Netzwerk eng begrenzt ist, und Interaktionsdaten notwendig für die Simulation sind, bieten neue, noch unbekannte Gene, deren Aktivität nachgewiesen werden könnte keinen zusätzlichen Nutzen. Auch die absolute Konzentration eines Genprodukts/einer RNA-Variante bringt im Hinblick auf die Semiquantitative Simulation keine neuen Einsichten. Lediglich eine sehr geringe Expression untersuchter Gene/Proteine könnte mit RNA-Seq in einigen Fällen besser nachgewiesen werden. Aufgrund der besseren Verfügbarkeit öffentlicher Daten und einfacheren und kostengünstigeren Durchführbarkeit eigener Experimente [21] steht in dieser Arbeit der Vergleich mit MicroArray-Resultaten im Fokus.

Die Aktivität eines Gens in MicroArray-Experimente wird stets durch den logarithmic Fold-Change (logFC) beschrieben, der angibt, um das Wievielfache (zur Basis 10) sich der Wert im Vergleich zu einer Referenzmessung verändert hat. Als Hindernis hat sich während der Validierung der hier beschriebenen Netzwerke vor allem die nur begrenzt mögliche Übertragbarkeit von experimentellen Ergebnissen zwischen unterschiedlichen Untersuchungen herausgestellt. Diese sogenannten *batch effects* stellen in der Forschung ein allgemeines Problem dar [307, 308]: aufgrund von äußeren Einflüssen, wie minimalen Schwankungen des Luftdrucks, der Luftfeuchtigkeit, der Umgebungstemperatur, der Lichteinstrahlung, sowie vom Experimentator abhängige minimal Abweichungen bei der Durchführung ein und derselben Methode bei Inkubationszeiten und zugegebenen Medien, ist es bis heute ein ungelöstes Dilemma zwei auf dem Papier identische, aber getrennt voneinander durchgeführte Versuche miteinander zu vergleichen [309–311].

Die von Stefan Karl und Thomas Dandekar [233] eingeführten spezifisch-dynamischen Kontrollzentralitäten bieten einen eindeutigen Vorteil gegenüber bisherigen Methoden,

da nun erstmals die Berechnung von Netzwerkzentralitätskennzahlen abhängig von der regulatorischen Bedeutung eines Knotens möglich ist. Mit den hierdurch gewonnenen tieferen Einblicke in die Struktur regulatorischer Netzwerke, konnten bekannte Hubknoten/Schlüsselkomponenten bestätigt und neue einflussreiche regulatorischen Komponenten identifiziert werden [21, 312]. Es hat sich somit gezeigt, dass die Berechnung der verschiedenen Kontrollzentralitätskennzahlen eine sinnvolle und wertvolle Ergänzung zu den in Jimena integrierten Simulationsmethoden darstellt (Steady-State-Analyse und dynamisch Simulation), welche detailliert Knoten mit größerer Gewichtung im Netzwerk aufzeigt, und eine fundierte Kategorisierung in zentrale Steuerungsknoten mit großem regulatorischem Einfluss und periphere Komponenten mit geringem regulatorischem Einfluss zulässt [233].

Die Anwendung des hier vorgestellten Ansatzes kann den wissenschaftlichen Fortschritt in diversen Anwendungsfällen unterstützen: (1) der demographische Wandel hin zu einer immer älter werdenden Gesellschaft führt zu einer stetig steigenden Anzahl altersbedingter Krankheitsfälle [313–316]. Neue Therapieansätze zielen verstärkt auf individualisierte Behandlungsmethoden ab, die es notwendig machen, dass möglichst alle bekannten Einflüsse in den Entwurf der Therapie mit einbezogen werden [317]. Simulationen der Interaktionen individueller Genaktivität und Proteinkonzentrationen können bereits vor Therapiebeginn und in der Planungsphase verwendet werden, um deren Erfolgchancen zu erhöhen. Am Beispiel der mesenchymale Stammzellen als Vorläuferzellen von Knochen, Knorpel- und Fettzellen, wird hier ein potentieller Ansatz vorgestellt. (2) Auch die medizinische Forschung kann von einer Anwendung profitieren, indem experimentelle Untersuchungen durch Simulationen der jeweils vorherrschenden Interaktionsbedingungen komplementiert werden und somit die Entdeckung neuer Wirkstoffe unterstützt und beschleunigt, wie in der hier vorliegenden Arbeit am Beispiel der menschlichen Immunreaktion auf die Infektion durch *A. fumigatus* deutlich wird. (3) Letztere Methodik kann auch in agrarbiologischer Hinsicht die Entwicklung neuer Strategien unterstützen. Bei einer zunehmender Häufigkeit von Extremwittersituationen in Abhängigkeit mit der globalen Erwärmung, wie lang anhaltenden Dürreperioden, ist es notwendig die dadurch erhöhte Anfälligkeit vieler Feldfrüchte zu minimieren [291, 293, 318]. Die Aktivität der Immunreaktion, aber auch vieler weitere Gene und Proteine stellt

hierfür eine Schlüsselrolle dar. Die Simulation der jeweiligen Aktivitäten kann dazu beitragen durch die Identifizierung und eine gezielte Modulierung von Schlüsselkomponenten Immunität zukünftiger Erträge zu sichern und so die Nahrungsversorgung durch pflanzliche Agrarprodukte sicherzustellen [290, 291, 293, 318].

Die systembiologische Analyse, inklusive Simulation und Vorhersage von interzellulärem und intrazellulärem Verhalten hat aufgrund der bisherigen Datenlage noch mit erheblichen Hürden zu kämpfen, die eine breitflächige Anwendung dieser Methodik in der biologischen Forschung und Entwicklung pharmazeutischer Wirkstoffe in vielen Fällen einschränken. Obwohl in vielen Fällen ein vereinfachtes Model zur Untersuchung ausreichen kann, werden im Vorfeld zahlreiche Informationen benötigt, um die Relevanz einzelner Knoten für ein Netzwerk einordnen zu können, bevor das Netzwerk durch entfernen überflüssiger Komponenten vereinfacht werden kann. Die zahlreichen Möglichkeiten, wie Gene, RNAs, Proteine, oder weitere regulatorisch aktiver Einflüsse wie chemischer Moleküle und hormoneller Botenstoffe oder physikalischer Umwelteinflüsse miteinander in Beziehung stehen können potenzieren die Komplexität des gesamten Inter-

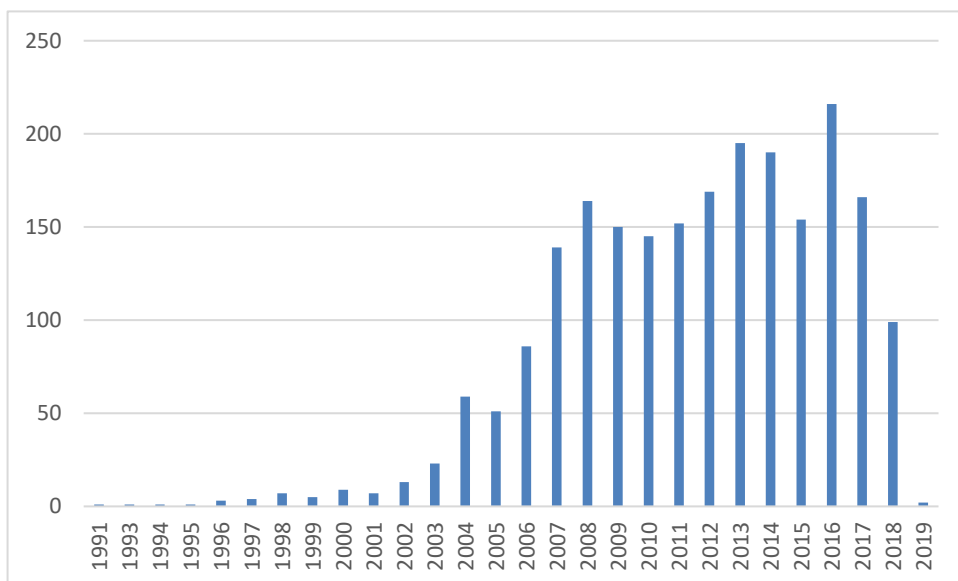


Abbildung 13: Historie der Anzahl der in PubMed registrierten Publikationen zum Thema 'Simulation of Regulatory Networks'.

aktionsnetzwerkes. Bekannte bisherige Arbeiten, wie auch die hier vorliegende konnten das vielversprechende Potential aufzeigen, das ein komplettes Verständnis aller zusammenhängenden Faktoren mit sich bringt – sogar in bereits relativ kleinen Modellen.

Obwohl die Zahlen von aktuellen Forschungsarbeiten zur Weiterentwicklung analytischer Simulationsalgorithmen zu Interaktionsnetzwerken in den vergangenen Jahren eher abgenommen haben (Abbildung 13, [319]), sollten die damit einhergehenden Chancen nicht vernachlässigt werden.

Als größtes Hindernis für die Anwendung von Simulationsmethoden zur Berechnung regulatorischer Netzwerke für eine breite Anwendung in der biologischen, medizinischen Forschung sind derzeit einerseits der Mangel an adäquaten und gut gesichteten Daten, sowie ein noch zu geringes Vertrauen in die *in silico*-generierten, systembiologische Daten in der Forschung. Aufgrund eines Mangels an bekannten Anwendungsfällen und Erfahrung, hat sich diese, bisher hauptsächlich in der theoretischen Biologie angewandte Methodik, in dem *in vivo/in vitro* geprägtem Forschungsalltag durchzusetzen noch nicht durchgesetzt.

Dabei ist es im Angesicht der heutigen Datenflut moderner analytischer Methoden unbedingt notwendig nicht nur die im Fokus der Forschung stehenden Details zu untersuchen, sondern möglichst breit auch nach neuen, unbekanntem Faktoren in den zur Verfügung stehenden Daten zu suchen. Sei es auf der Suche nach neuen therapeutischen Wirkstoffen gegen weit verbreitete menschliche Leiden, wie Antibiotika, mit antikanzerogener, anti-seneszenter Wirkung, oder Entdeckung neuer agrarbiologisch einsetzbarer Faktoren: die hier angewandten Methoden der Rekonstruktion, Simulation und Vorhersage von regulatorischen Interaktionsnetzwerken kann eine wichtige Rolle in einer zunehmend von Digitalisierung geprägten Forschungswelt spielen. Die systembiologische Simulation kann bei richtiger Anwendung und mit einer soliden Datengrundlage zur Unterstützung experimenteller Ansätze verwendet werden, vor allem um deren Erfolgchancen im Voraus bereits einschätzen zu können, oder weitere, vielversprechende Faktoren zu entdecken und frühzeitig in ein Forschungsprojekt zu integrieren. *In silico*-Methoden, sollten dabei stets als Hilfsmittel betrachtet werden den Kontext/Systemüberblick nicht aus den Augen zu verlieren und ab und zu neben dem Fokus auf offensichtlich wichtige Moleküle ab und zu deren Regulation und damit zusammenhängenden Signalkaskaden zu untersuchen, denn erst das Zusammenspiel vieler verschiedener Faktoren in einer lebenden Zelle können deren Verhalten erklären.

Denn vor allem in der Biologie und im Umgang mit allem Lebenden gilt:

'Das Ganze ist mehr als die Summe seiner Teile',

sinngemäß nach Aristoteles [320]

Diesem emergenten Effekt von biologischen Systemen verfolgt auch der hier vorgestellte eigene Modellierungsansatz, mit seinen Software-Ansätzen und selbst entwickelten Netzwerkmodellen komplexer Differenzierungs- und infektionsbiologischer Vorgänge.

Er ist aber selbst natürlich auch nur einer der heute existierenden Ansätze, die zur Beschreibung und Untersuchung der komplexen biologischen Systeme zum Einsatz kommt. Die Anwendung dieses Ansatzes empfiehlt sich somit stets im Zusammenspiel mit weiteren Methoden zu kombinieren.

Abkürzungsverzeichnis

A. fumigatus	Aspergillus fumigatus
A. thaliana	Arabidopsis thaliana
ABA	Abscisinsäure
AF	Aspergillus fumigatus
AF Germ Tubes/AFGT	A.fumigatus Germ Tubes
Akt/PKB	Proteinkinase B
ALP	Alkaline Phosphatase (engl. alkaline phosphatase)
AP-1	Transcription factor AP-1/JUN
ARF	Auxin-Responsive-Faktors
ARR	Arabidopsis Response Regulatoren
AS	Aminosäure
AT	Arabidopsis thaliana
BAT	brown adipose tissue
BAT	brown adipose tissue
BDD	boolean decision diagram
BMP	Bone Morphogenic Protein
Bp	Basenpaare
C/EBP	CCAAT/enhancer-binding proteins
CASP	Caspase
CC	Control Centrality/Kontrollzentralität
CCL5/RANTES	Chemokine (C-C Motiv) ligand 5
CD	Cluster of Differentiation
CK	Cytokine
CLECL7A	C-type lectin 7 A
COI1	Coronatine Insensitive 1
CTNNB1	β-Catenin
DC	Dendritische Zelle/dendritic cell
DCC	Dynamic Control Centrality
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dsh	Dishevelled
ERK1	auch als MAPK3 bezeichnet
ERK2	auch als MAPK1 bezeichnet
ETI	Elicitor Triggered Immunity
FGF	Fibroblast growth factor
FORTHiTher	Tumordiagnostik für individualisierte Therapie
Fzd	Frizzled
GA	Gibberellinsäure / Gibberellic Acid
GDFs	Growth Differentiation Factors
GEO	Gene Expression Omnibus
GO	Gene Ontology
GRN	Genregulatorisches Netzwerk
GSK3β	glycogen synthase kinase 3
I	Interaktion
IAA	Auxin Indol-3-essigsäure

IAA	Indol-3-essigsäure (engl. indole-3-acetic acid)
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL1	Interleukin 1
IL6	Interleukin 6
ITPR	Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor
JA	Jasmonsäure / Jasmonic Acid / Jasmonate
JA-Ile	Jasmonyl-Isoleucin
JAZ	Jasmonate ZIM-Domain
JNK	jun N-Terminale Kinase
K	Knoten
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
logFC	logarithmic Fold Change / logarithmischer Fold-Change
MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1
MAPK3	Mitogen-activated protein kinase 3
MAP-Kinase	Mitogen-activated protein kinase
mRNAs	Messenger RNAs
MSCs	Mesenchymale Stammzelle/multipotente Stromazellen
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
MYC	Myc proto-oncogene protein
MYC2	Transcription factor MYC2
Myf5	Myogenic factor 5
NFκB	Nuclear factor NF-kappa-B
Notch	Neurogenic locus notch homolog protein 1
NPR1	Nonexpression of Pathogenesis Related Gene 1
NPR3	Nonexpression of Pathogenesis Related Gene 3
NPR4	Nonexpression of Pathogenesis Related Gene 4
OCT4	POU domain, class 5, transcription factor 1
ORF	offene Leseraster (engl. open reading frame)
OSX/SP7	Osterix/Transcription factor Sp7
PCP	Planare Zellpolarität (engl. planar cell polarity)
PDF1.2	Defensin-like protein 16
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
Platelets	Blutplättchen , Thrombozyten
PPARY	peroxisome proliferator-activated receptor γ
PPI	Protein-Protein-Interaktion
PR1	Pathogenesis Related 1
Pst	PstDC3000
PstDC3000	Pseudomonas syringae DC 3000
PTHrP	Parathyroid hormone-related protein
PTI	pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies/ Reactive Oxygen Species
R-Smad	Rezeptor-Smad
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
SA	Salicylsäure / Salicylic Acid
SAM	Sprossapikalmeristem

SAR	Systemic Acquired Resistance
SHH	sonic hedgehog
SMAD	small body size (sma), mothers against dpp (Mad)
SMART	Simple Modular Architecture Research Tool
SOX5	Transcription factor SOX-5
SOX6	Transcription factor SOX-6
SOX9	Transcription factor SOX-9
SQUAD	Standardized Qualitative Analysis of Dynamical Models
SQUAD	Standardized Qualitative Analysis of Dynamical Model
SSS	Stable Steady State/ Dauerhaft Stabiler Systemzustand
STAT	Signal transducer and activator of transcription
STRING	Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins
TAIR	The Arabidopsis Information Resource
TCC	Total Control Centrality
TF	Transkriptionsfaktor
TGF β	Transforming-Growth-Factor β
TLR2	Toll Like Receptor 2
TLR4	Toll Like Receptor 4
TLR6	Toll Like Receptor 6
TNF	Tumor Necrosis Factor
TP53	Tumor Protein 53
V	Verhältnis
VCC	Value Control Centrality
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WAT	White Adipose Tissue
WNT	zusammengesetzt aus Wingless und Int-1
YUCCA	Probable indole-3-pyruvate monooxygenase YUCCA1
ZKS	Zwei-Komponenten-Systeme

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zentrale Regulatoren der Differenzierung Mesenchymaler Stammzellen.	11
Tabelle 2: Vergleich verschiedener Datenbanken	30
Tabelle 3: Schema des Strukturellen Aufbaus einer Zusammenfassung des Netzwerks.....	32
Tabelle 4: Vergleich der Simulationsergebnisse in MSC.....	47
Tabelle 5: Ausgewählte Kontrollzentralitätswerte des Netzwerks der dendritischen Zelle	55
Tabelle 6: Ausgewählte Kontrollzentralitätswerte der Immunregulation in <i>A. thaliana</i>	62
Tabelle 7: Kategorisierung von Kontrollzentralitätswerten	70
Tabelle 8: Übersicht der Aktivitätsmuster von Platelets und <i>A. fumigatus</i> ,	78

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Zelldeterminierung und Zelldifferenzierung	8
Abbildung 2: Wege der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen.	10
Abbildung 3: Zeitlicher Abfolge der Chondrogenese und Osteogenese	16
Abbildung 4: Netzwerktopologie eines rekonstruierten regulatorischen Interaktionsmodells der mesenchymalen Stammzelle im Menschen.....	43
Abbildung 5: Heatmap der stabilen Systemzustände des MSC-Modells	45
Abbildung 6: Die Plastizität von regulatorischen Netzwerken	48
Abbildung 7: Kontroll-Zentralitäts-Werte der Knoten des MSC-Modells.....	50
Abbildung 8: Netzwerkmodell der regulatorischen Prozesse in menschlichen dendritischen Zellen unter Einfluss von <i>A. fumigatus</i>	52
Abbildung 9: Kontrollzentralitätswerte und Aktivitätspattern der stabilen Systemzustände in DC.....	54
Abbildung 10: Dynamische Simulation des DC-Modells zur Ermittlung des kritischen Zustands	57
Abbildung 11: Netzwerktopologie des Immunsystems von <i>A. thaliana</i> unter Infektion von <i>Pseudomonas SyringaeDC3000</i>	59
Abbildung 12: Auftragung der VCC gegen die DCC der Netzwerktopologie	61
Abbildung 13: Historie der Anzahl der in PubMed registrierten Publikationen zum Thema 'Simulation of Regulatory Networks'	91

Literaturverzeichnis

1. Noble D. *The Music of Life: Biology beyond genes*. OUP Oxford; 2008.
2. Zhukova A, Sherman DJ, Zhukova A, James D, Knowledge-based S, Liebert MA. Knowledge-based generalization of metabolic models To cite this version : Knowledge-based generalization of metabolic models. 2014;21.
3. Lockhart DJ, Winzeler EA. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature*. 2000;405:827–36. doi:10.1038/35015701.
4. Hegde PS, White IR, Debouck C. Interplay of transcriptomics and proteomics. *Curr Opin Biotechnol*. 2003;14:647–51. doi:10.1016/J.COPBIO.2003.10.006.
5. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*. 2009;10:57–63. doi:10.1038/nrg2484.
6. McGettigan PA. Transcriptomics in the RNA-seq era. *Curr Opin Chem Biol*. 2013;17:4–11. doi:10.1016/J.CBPA.2012.12.008.
7. Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. 2000;405:837–46. doi:10.1038/35015709.
8. Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. *Nature*. 2003;422:193–7. doi:10.1038/nature01510.
9. Cesareni G, Ceol A, Gavrila C, Palazzi LM, Persico M, Schneider MV. Comparative interactomics. *FEBS Lett*. 2005;579:1828–33. doi:10.1016/j.febslet.2005.01.064.
10. Collura V, Boissy G. From Protein—Protein Complexes to Interactomics. In: *Subcellular Proteomics*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2007. p. 135–83. doi:10.1007/978-1-4020-5943-8_8.
11. Clamp M, Fry B, Kamal M, Xie X, Cuff J, Lin MF, et al. Distinguishing protein-coding and noncoding genes in the human genome. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104:19428–33. doi:10.1073/pnas.0709013104.
12. Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet*. 2008;40:1413–5. doi:10.1038/ng.259.
13. Krumsiek J, Pölsterl S, Wittmann DM, Theis FJ. Odefy--from discrete to continuous models. *BMC Bioinformatics*. 2010;11:233. doi:10.1186/1471-2105-11-233.

14. Di Cara A, Garg A, De Micheli G, Xenarios I, Mendoza L. Dynamic simulation of regulatory networks using SQUAD. *BMC Bioinformatics*. 2007;8:462. doi:10.1186/1471-2105-8-462.
15. Mendoza L, Xenarios I. A method for the generation of standardized qualitative dynamical systems of regulatory networks. *Theor Biol Med Model*. 2006;3:13. doi:10.1186/1742-4682-3-13.
16. Ward JJ, Sodhi JS, McGuffin LJ, Buxton BF, Jones DT. Prediction and Functional Analysis of Native Disorder in Proteins from the Three Kingdoms of Life. *J Mol Biol*. 2004;337:635–45. doi:10.1016/J.JMB.2004.02.002.
17. Turoverov KK, Kuznetsova IM, Uversky VN. The protein kingdom extended: Ordered and intrinsically disordered proteins, their folding, supramolecular complex formation, and aggregation. *Prog Biophys Mol Biol*. 2010;102:73–84. doi:10.1016/J.PBIOMOLBIO.2010.01.003.
18. Braun P, Gingras A-C. History of protein-protein interactions: From egg-white to complex networks. *Proteomics*. 2012;12:1478–98. doi:10.1002/pmic.201100563.
19. Vinayagam A, Zirin J, Roesel C, Hu Y, Yilmazel B, Samsonova AA, et al. Integrating protein-protein interaction networks with phenotypes reveals signs of interactions. *Nat Methods*. 2014;11:94–9. doi:10.1038/nmeth.2733.
20. Wang J, Rao S, Chu J, Shen X, Levasseur DN, Theunissen TW, et al. A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature*. 2006;444:364–8. doi:10.1038/nature05284.
21. Czakai K, Dittrich M, Kaldorf M, Müller T, Krappmann S, Schedler A, et al. Influence of Platelet-rich Plasma on the immune response of human monocyte-derived dendritic cells and macrophages stimulated with *Aspergillus fumigatus*. *Int J Med Microbiol*. 2016. doi:10.1016/j.ijmm.2016.11.010.
22. Naseem M, Kaldorf M, Dandekar T. The nexus between growth and defence signalling: auxin and cytokinin modulate plant immune response pathways. *J Exp Bot*. 2015;66:4885–96. doi:10.1093/jxb/erv297.
23. Naseem M, Srivastava M, Tehseen M, Ahmed N. Auxin crosstalk to plant immune networks: a plant-pathogen interaction perspective. *Curr Protein Pept Sci*. 2015;16:389–94.

24. Ivanov AA, Khuri FR, Fu H. Targeting protein–protein interactions as an anticancer strategy. *Trends Pharmacol Sci.* 2013;34:393–400. doi:10.1016/J.TIPS.2013.04.007.
25. Kar G, Gursoy A, Keskin O. Human Cancer Protein-Protein Interaction Network: A Structural Perspective. *PLoS Comput Biol.* 2009;5:e1000601. doi:10.1371/journal.pcbi.1000601.
26. Schuster S, Fell DA, Dandekar T. A general definition of metabolic pathways useful for systematic organization and analysis of complex metabolic networks. *Nat Biotechnol.* 2000;18:326–32. doi:10.1038/73786.
27. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* 2015;43 Database issue:D447-52. doi:10.1093/nar/gku1003.
28. Davidson E, Levin M. Gene regulatory networks. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:4935. doi:10.1073/pnas.0502024102.
29. Steffen M, Petti A, Aach J, D’haeseleer P, Church G. Automated modelling of signal transduction networks. *BMC Bioinformatics.* 2002;3:34. doi:10.1186/1471-2105-3-34.
30. Beisser D, Grohme MA, Kopka J, Frohme M, Schill RO, Hengherr S, et al. Integrated pathway modules using time-course metabolic profiles and EST data from *Milnesium tardigradum*. *BMC Syst Biol.* 2012;6:72. doi:10.1186/1752-0509-6-72.
31. von Kamp A, Schuster S. Metatool 5.0: Fast and flexible elementary modes analysis. *Bioinformatics.* 2006;22:1930–1.
32. Kaldorf M, Srivastava M, Gupta SK, Liang C, Binder J, Dietl A-M, et al. Systematic Identification of Anti-Fungal Drug Targets by a Metabolic Network Approach. *Front Mol Biosci.* 2016;3:22. doi:10.3389/fmolb.2016.00022.
33. Guilluy C, Swaminathan V, Garcia-Mata R, O’Brien ET, Superfine R, Burridge K. The Rho GEFs LARG and GEF-H1 regulate the mechanical response to force on integrins. *Nat Cell Biol.* 2011;13:722–7. doi:10.1038/ncb2254.
34. Breen EC. Mechanical strain increases type I collagen expression in pulmonary fibroblasts in vitro. *J Appl Physiol.* 2000;88:203–9.
35. Al-Bader N, Vanier G, Liu H, Gravelat FN, Urb M, Hoareau CM-Q, et al. Role of trehalose biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* development, stress response, and virulence. *Infect Immun.* 2010;78:3007–18. doi:10.1128/IAI.00813-09.

36. Lanneau D, de Thonel A, Maurel S, Didelot C, Garrido C. Apoptosis versus cell differentiation: role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27. *Prion*. 2007;1:53–60.
37. Rivas-San Vicente M, Plasencia J. Salicylic acid beyond defence: Its role in plant growth and development. *J Exp Bot*. 2011;62:3321–38. doi:10.1093/jxb/err031.
38. Karl S, Dandekar T. Jimena: efficient computing and system state identification for genetic regulatory networks. *BMC Bioinformatics*. 2013;14:306. doi:10.1186/1471-2105-14-306.
39. Leclerc RD. Survival of the sparsest: robust gene networks are parsimonious. *Mol Syst Biol*. 2008;4:213. doi:10.1038/msb.2008.52.
40. TILL JE, McCULLOCH EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*. 1961;14:213–22.
41. MCCULLOCH EA, TILL JE. The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. *Radiat Res*. 1960;13:115–25.
42. Daley GQ. Stem cells and the evolving notion of cellular identity. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2015;370:20140376. doi:10.1098/rstb.2014.0376.
43. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282:1145–7.
44. Marks H, Kalkan T, Menafra R, Denissov S, Jones K, Hofemeister H, et al. The Transcriptional and Epigenomic Foundations of Ground State Pluripotency. *Cell*. 2012;149:590–604. doi:10.1016/j.cell.2012.03.026.
45. Kalkan T, Smith A. Mapping the route from naive pluripotency to lineage specification. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2014;369:20130540–20130540. doi:10.1098/rstb.2013.0540.
46. Zon LI. Intrinsic and extrinsic control of haematopoietic stem-cell self-renewal. *Nature*. 2008;453:306–13. doi:10.1038/nature07038.
47. Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, Yoo JU, Johnstone B, Caplan AI. A Quadripotential Mesenchymal Progenitor Cell Isolated from the Marrow of an Adult Mouse. *J Bone Miner Res*. 1999;14:700–9. doi:10.1359/jbmr.1999.14.5.700.

48. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143–7.
49. Schöler HR. The Potential of Stem Cells: An Inventory. 2016;:45–72. doi:10.4324/9781315252933-11.
50. Reginster J-Y, Burlet N. Osteoporosis: A still increasing prevalence. *Bone*. 2006;38:4–9. doi:10.1016/J.BONE.2005.11.024.
51. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol*. 2007;213:341–7. doi:10.1002/jcp.21200.
52. Lutolf MP, Gilbert PM, Blau HM. Designing materials to direct stem-cell fate. *Nature*. 2009;462:433–41. doi:10.1038/nature08602.
53. Brizzi MF, Tarone G, Defilippi P. Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche. *Curr Opin Cell Biol*. 2012;24:645–51. doi:10.1016/j.ceb.2012.07.001.
54. Yu D-A, Han J, Kim B-S. Stimulation of chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Int J stem cells*. 2012;5:16–22.
55. Ratner BD. Going out on a limb about regrowing an arm. *J Mater Sci Mater Med*. 2013;24:2645–9. doi:10.1007/s10856-013-5047-6.
56. Barzilay R, Melamed E, Offen D. Introducing transcription factors to multipotent mesenchymal stem cells: Making transdifferentiation possible. *Stem Cells*. 2009;27:2509–15. doi:10.1002/stem.172.
57. Visweswaran M, Pohl S, Arfuso F, Newsholme P, Dilley R, Pervaiz S, et al. Multi-lineage differentiation of mesenchymal stem cells - To Wnt, or not Wnt. *Int J Biochem Cell Biol*. 2015;68:139–47. doi:10.1016/j.biocel.2015.09.008.
58. Cahan P, Li H, Morris SA, Lummertz da Rocha E, Daley GQ, Collins JJ. CellNet: Network Biology Applied to Stem Cell Engineering. *Cell*. 2014;158:903–15. doi:10.1016/j.cell.2014.07.020.
59. Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol*. 2012;12:383–96. doi:10.1038/nri3209.
60. Kanazawa I. Secondary osteoporosis. Bone quality deterioration in lifestyle-related disease. *Clin Calcium*. 2018;28:1581–9. doi:CliCa181215811589.

61. Zholdoshova A, YALÇIN P. The Relationship between Osteoarthritis and Osteoporosis in Patients with Primary Generalized Osteoarthritis. *Turkish J Rheumatol.* 2013;28:163–72. doi:10.5606/tjr.2013.2984.
62. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells.* 2007;25:2896–902. doi:10.1634/stemcells.2007-0637.
63. Caplan a I. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991;9:641–50. doi:10.1002/jor.1100090504.
64. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8:315–7. doi:10.1080/14653240600855905.
65. Soltanoff CS, Yang S, Chen W, Li Y-P. Signaling networks that control the lineage commitment and differentiation of bone cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2009;19:1–46.
66. Zhao L, Huang J, Zhang H, Wang Y, Matesic LE, Takahata M, et al. Tumor necrosis factor inhibits mesenchymal stem cell differentiation into osteoblasts via the ubiquitin E3 ligase Wwp1. *Stem Cells.* 2011;29:1601–10. doi:10.1002/stem.703.
67. James AW. Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica (Cairo).* 2013;2013:684736. doi:10.1155/2013/684736.
68. Yang DC, Yang MH, Tsai CC, Huang TF, Chen YH, Hung SC. Hypoxia inhibits osteogenesis in human mesenchymal stem cells through direct regulation of RUNX2 by TWIST. *PLoS One.* 2011;6:e23965. doi:10.1371/journal.pone.0023965.
69. Chen Q, Shou P, Zheng C, Jiang M, Cao G, Yang Q, et al. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? *Cell Death Differ.* 2016;;1–12. doi:10.1038/cdd.2015.168.
70. Roelen BAJ, Dijke P ten. Controlling mesenchymal stem cell differentiation by TGF β family members. *J Orthop Sci.* 2003;8:740–8. doi:10.1007/s00776-003-0702-2.
71. Kratchmarova I, Blagoev B, Haack-Sorensen M, Kassem M, Mann M. Mechanism of divergent growth factor effects in mesenchymal stem cell differentiation. *Science.* 2005;308:1472–7. doi:10.1126/science.1107627.

72. Nuttall ME, Gimble JM. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. *Curr Opin Pharmacol.* 2004;4:290–4. doi:10.1016/j.coph.2004.03.002.
73. McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell.* 2004;6:483–95. doi:10.1016/S1534-5807(04)00075-9.
74. Kawaguchi J, Mee PJ, Smith AG. Osteogenic and chondrogenic differentiation of embryonic stem cells in response to specific growth factors. *Bone.* 2005;36:758–69. doi:10.1016/j.bone.2004.07.019.
75. Juhász T, Matta C, Somogyi C, Katona É, Takács R, Soha RF, et al. Mechanical loading stimulates chondrogenesis via the PKA/CREB-Sox9 and PP2A pathways in chicken micromass cultures. *Cell Signal.* 2014;26:468–82. doi:10.1016/j.cellsig.2013.12.001.
76. Goldring MB. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2012;4:269–85. doi:10.1177/1759720X12448454.
77. Bernstein P, Sticht C, Jacobi a., Liebers C, Manthey S, Stiehler M. Expression pattern differences between osteoarthritic chondrocytes and mesenchymal stem cells during chondrogenic differentiation. *Osteoarthr Cartil.* 2010;18:1596–607. doi:10.1016/j.joca.2010.09.007.
78. Danišovič Ľ, Varga I, Polák Š. Growth factors and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Tissue Cell.* 2012;44:69–73. doi:10.1016/J.TICE.2011.11.005.
79. Carlberg AL, Pucci B, Rallapalli R, Tuan RS, Hall DJ. Efficient chondrogenic differentiation of mesenchymal cells in micromass culture by retroviral gene transfer of BMP-2. *Differentiation.* 2001;67:128–38. doi:10.1046/j.1432-0436.2001.670405.x.
80. Indrawattana N, Chen G, Tadokoro M, Shann LH, Ohgushi H, Tateishi T, et al. Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;320:914–9. doi:10.1016/j.bbrc.2004.06.029.
81. Panadero JA, Lanceros-Mendez S, Gomez Ribelles JL. Differentiation of mesenchymal stem cells for cartilage tissue engineering: Individual and synergetic effects of three-dimensional environment and mechanical loading. *Acta Biomater.* 2016;33:1–12. doi:10.1016/j.actbio.2016.01.037.

82. Lecka-Czernik B, Moerman EJ, Grant DF, Lehmann JM, Manolagas SC, Jilka RL. Divergent effects of selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 ligands on adipocyte versus osteoblast differentiation. *Endocrinology*. 2002;143:2376–84. doi:10.1210/endo.143.6.8834.
83. Moerman EJ, Teng K, Lipschitz DA, Lecka-Czernik B. Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR-gamma2 transcription factor and TGF-beta/BMP signaling pathways. *Aging Cell*. 2004;3:379–89. doi:10.1111/j.1474-9728.2004.00127.x.
84. Berendsen AD, Olsen BR. Regulation of adipogenesis and osteogenesis in mesenchymal stem cells by vascular endothelial growth factor A. *J Intern Med*. 2015;277:674–80.
85. Ansari AS, Yazid MD, Sainik NQAV, Razali RA, Saim A Bin, Idrus RBH. Osteogenic Induction of Wharton’s Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cell for Bone Regeneration: A Systematic Review. *Stem Cells Int*. 2018;2018:1–17. doi:10.1155/2018/2406462.
86. Markov V, Kusumi K, Tadesse MG, William D a, Hall DM, Lounev V, et al. Identification of cord blood-derived mesenchymal stem/stromal cell populations with distinct growth kinetics, differentiation potentials, and gene expression profiles. *Stem Cells Dev*. 2007;16:53–73. doi:10.1089/scd.2006.0660.
87. Matsubara T, Suardita K, Ishii M, Sugiyama M, Igarashi A, Oda R, et al. Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res*. 2005;20:399–409. doi:10.1359/JBMR.041117.
88. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther*. 2007;9:204. doi:10.1186/ar2116.
89. Moreau A, Varey E, Anegon I, Cuturi M-C. Effector mechanisms of rejection. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3. doi:10.1101/cshperspect.a015461.
90. Siddappa R, Martens A, Doorn J, Leusink A, Olivo C, Licht R, et al. cAMP/PKA pathway activation in human mesenchymal stem cells in vitro results in robust bone formation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:7281–6. doi:10.1073/pnas.0711190105.
91. Moerman EJ, Teng K, Lipschitz DA, Lecka-Czernik B. Aging activates adipogenic and

- suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR-gamma2 transcription factor and TGF-beta/BMP signaling pathways. *Aging Cell*. 2004;3:379–89. doi:10.1111/j.1474-9728.2004.00127.x.
92. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007;25:2739–49. doi:10.1634/stemcells.2007-0197.
93. Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone*. 2008;42:606–15.
94. D'Andrea P, Calabrese A, Capozzi I, Grandolfo M, Tonon R, Vittur F. Intercellular Ca²⁺ waves in mechanically stimulated articular chondrocytes. *Biorheology*. 2000;37:75–83.
95. Janmey P a, Miller RT. Mechanisms of mechanical signaling in development and disease. *J Cell Sci*. 2011;124 Pt 1:9–18.
96. Klotz B, Mentrup B, Regensburger M, Zeck S, Schneidereit J, Schupp N, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 treatment delays cellular aging in human mesenchymal stem cells while maintaining their multipotent capacity. *PLoS One*. 2012;7:e29959. doi:10.1371/journal.pone.0029959.
97. Moustakas A, Heldin C-H. From mono- to oligo-Smads: the heart of the matter in TGF-beta signal transduction. *Genes Dev*. 2002;16:1867–71. doi:10.1101/gad.1016802.
98. Mackie EJ, Ahmed Y a., Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M. Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40:46–62. doi:10.1016/j.biocel.2007.06.009.
99. Kirkham GR, Cartmell SH. Genes and Proteins Involved in the Regulation of Osteogenesis. *Top Tissue Eng N Ashammakhi, R Reis E Chiellini*. 2007;3.
100. Cano E, Mahadevan LC. Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem Sci*. 1995;20:117–22.
101. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*. 2003;425:577–84. doi:10.1038/nature02006.
102. Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T, Miyazono K. Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells*. 2002;7:1191–204.
103. Bellayr IH, Marklein RA, Lo Surdo JL, Bauer SR, Puri RK. Identification of Predictive Gene Markers for Multipotent Stromal Cell Proliferation. *Stem Cells Dev*. 2016; April:1–

40. doi:10.1089/scd.2015.0374.
104. Cleary MA, van Osch GJVM, Brama PA, Hellingman CA, Narcisi R. FGF, TGF β and Wnt crosstalk: embryonic to in vitro cartilage development from mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2015;9:332–42. doi:10.1002/term.1744.
105. Hocking AM, Gibran NS. Mesenchymal stem cells: Paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. *Exp Cell Res.* 2010;316:2213–9. doi:10.1016/j.yexcr.2010.05.009.
106. Keller B, Yang T, Chen Y, Munivez E, Bertin T, Zabel B, et al. Interaction of TGF β and bmp signaling pathways during chondrogenesis. *PLoS One.* 2011;6:e16421. doi:10.1371/journal.pone.0016421.
107. Joan Massagué, Joan Seoane and DW. Smad transcription factors Smad transcription factors. *Genes Dev.* 2005;19:2783–810. doi:10.1101/gad.1350705.
108. Nishimura R, Kato Y, Chen D, Harris SE, Mundy GR, Yoneda T. Smad5 and DPC4 are key molecules in mediating BMP-2-induced osteoblastic differentiation of the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *J Biol Chem.* 1998;273:1872–9.
109. von Bubnoff A, Cho KW. Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? *Dev Biol.* 2001;239:1–14. doi:10.1006/dbio.2001.0388.
110. Papathanasiou I, Malizos KN, Tsezou A. Bone morphogenetic protein-2-induced Wnt/ β -catenin signaling pathway activation through enhanced low-density-lipoprotein receptor-related protein 5 catabolic activity contributes to hypertrophy in osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Res Ther.* 2012;14:R82. doi:10.1186/ar3805.
111. Medyouf H, Ghysdael J. The calcineurin/NFAT signaling pathway: a novel therapeutic target in leukemia and solid tumors. *Cell Cycle.* 2008;7:297–303. doi:10.4161/cc.7.3.5357.
112. Paek H, Hwang J-Y, Zukin RS, Hébert JM. β -Catenin-dependent FGF signaling sustains cell survival in the anterior embryonic head by countering Smad4. *Dev Cell.* 2011;20:689–99. doi:10.1016/j.devcel.2011.04.010.
113. Reinhold MI, Kapadia RM, Liao Z, Naski MC. The Wnt-inducible transcription factor Twist1 inhibits chondrogenesis. *J Biol Chem.* 2006;281:1381–8. doi:10.1074/jbc.M504875200.
114. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms,

- and Diseases. *Dev Cell*. 2009;17:9–26. doi:10.1016/j.devcel.2009.06.016.
115. Sowa H, Kaji H, Yamaguchi T, Sugimoto T, Chihara K. Activations of ERK1/2 and JNK by transforming growth factor β negatively regulate Smad3-induced alkaline phosphatase activity and mineralization in mouse osteoblastic cells. *J Biol Chem*. 2002;277:36024–31. doi:10.1074/jbc.M206030200.
116. Lee I-C, Wang J-H, Lee Y-T, Young T-H. The differentiation of mesenchymal stem cells by mechanical stress or/and co-culture system. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;352:147–52.
117. Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M, Wang H-R, Zhang Y, Wrana JL. Regulation of the Polarity Protein Par6 by TGF Receptors Controls Epithelial Cell Plasticity. *Science* (80-). 2005;307:1603–9. doi:10.1126/science.1105718.
118. Watanabe H, de Caestecker MP, Yamada Y. Transcriptional cross-talk between Smad, ERK1/2, and p38 mitogen-activated protein kinase pathways regulates transforming growth factor-beta-induced aggrecan gene expression in chondrogenic ATDC5 cells. *J Biol Chem*. 2001;276:14466–73. doi:10.1074/jbc.M005724200.
119. Rosen ED, MacDougald O a. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7 December:885–96.
120. Beier F. Cell-cycle control and the cartilage growth plate. *J Cell Physiol*. 2005;202:1–8. doi:10.1002/jcp.20111.
121. Juhász T, Matta C, Somogyi C, Katona É, Takács R, Soha RF, et al. Mechanical loading stimulates chondrogenesis via the PKA/CREB-Sox9 and PP2A pathways in chicken micromass cultures. *Cell Signal*. 2014;26:468–82. doi:10.1016/j.cellsig.2013.12.001.
122. Hamidouche Z, Fromigué O, Nuber U, Vaudin P, Pages JC, Ebert R, et al. Autocrine fibroblast growth factor 18 mediates dexamethasone-induced osteogenic differentiation of murine mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*. 2010;224:509–15. doi:10.1002/jcp.22152.
123. Katoh M. Therapeutics targeting angiogenesis: Genetics and epigenetics, extracellular miRNAs and signaling networks (Review). *Int J Mol Med*. 2013;32:763–7. doi:10.3892/ijmm.2013.1444.
124. Houschyar KS, Tapking C, Borrelli MR, Popp D, Duscher D, Maan ZN, et al. Wnt Pathway in Bone Repair and Regeneration – What Do We Know So Far. *Front Cell Dev*

- Biol. 2019;6:170. doi:10.3389/fcell.2018.00170.
125. Sarjeant K, Stephens JM. Adipogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4:a008417. doi:10.1101/cshperspect.a008417.
126. Maupin KA, Droscha CJ, Williams BO. A Comprehensive Overview of Skeletal Phenotypes Associated with Alterations in Wnt/ β -catenin Signaling in Humans and Mice. *Bone Res.* 2013;1:27–71. doi:10.4248/BR201301004.
127. Punchihewa C, Ferreira AM, Cassell R, Rodrigues P, Fujii N. Sequence requirement and subtype specificity in the high-affinity interaction between human frizzled and dishevelled proteins. *Protein Sci.* 2009;18:994–1002. doi:10.1002/pro.109.
128. Kilander MBC, Petersen J, Andressen KW, Ganji RS, Levy FO, Schuster J, et al. Dishevelled regulates precoupling of heterotrimeric G proteins to Frizzled 6. *FASEB J.* 2014;28:2293–305. doi:10.1096/fj.13-246363.
129. Widelitz R. Wnt signaling through canonical and non-canonical pathways: Recent progress. *Growth Factors.* 2005;23:111–6. doi:10.1080/08977190500125746.
130. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis.* 2008;4:68–75. doi:10.4161/org.4.2.5851.
131. Schneider VA, Mercola M. Wnt antagonism initiates cardiogenesis in *Xenopus laevis*. *Genes Dev.* 2001;15:304–15. doi:10.1101/gad.855601.
132. Tzahor E, Lassar AB. Wnt signals from the neural tube block ectopic cardiogenesis. *Genes Dev.* 2001;15:255–60. doi:10.1101/GAD.871501.
133. Shi J, Chi S, Xue J, Yang J, Li F, Liu X. Emerging Role and Therapeutic Implication of Wnt Signaling Pathways in Autoimmune Diseases. *J Immunol Res.* 2016;2016:1–18. doi:10.1155/2016/9392132.
134. Wu D, Pan W. GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends Biochem Sci.* 2010;35:161–8. doi:10.1016/J.TIBS.2009.10.002.
135. Metcalfe C, Bienz M. Inhibition of GSK3 by Wnt signalling--two contrasting models. *J Cell Sci.* 2011;124 Pt 21:3537–44. doi:10.1242/jcs.091991.
136. Stamos JL, Weis WI. The β -catenin destruction complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5:a007898. doi:10.1101/cshperspect.a007898.
137. Gao C, Xiao G, Hu J. Regulation of Wnt/ β -catenin signaling by posttranslational modifications. 2014. doi:10.1186/2045-3701-4-13.

138. Geetha-Loganathan P, Nimmagadda S, Scaal M. Wnt signaling in limb organogenesis. Suresh Nimmagadda & Martin Scaal. 2008;4:109–15. doi:10.4161/org.4.2.5857.
139. Habas R, Dawid IB. Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier? Wnt signaling. 2005.
140. He X, Saint-Jeannet JP, Wang Y, Nathans J, Dawid I, Varmus H. A member of the Frizzled protein family mediating axis induction by Wnt-5A. *Science*. 1997;275:1652–4. doi:10.1126/SCIENCE.275.5306.1652.
141. De A. Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2011;43:745–56. doi:10.1093/abbs/gmr079.
142. Clevers H. Wnt/ β -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell*. 2006;127:469–80. doi:10.1016/j.cell.2006.10.018.
143. Miyazono K, Kusanagi K, Inoue H. Divergence and convergence of TGF- β /BMP signaling. *J Cell Physiol*. 2001;187:265–76. doi:10.1002/jcp.1080.
144. Shaifur Rahman M, Akhtar N, Mohammad Jamil H, Suvra Banik R, Asaduzzaman SM. TGF- β /BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation. *Bone Res*. 2015;3. doi:10.1038/boneres.2015.5.
145. Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev*. 2005;19:2783–810. doi:10.1101/gad.1350705.
146. Lee MH, Reynisdóttir I, Massagué J. Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev*. 1995;9:639–49. doi:10.1101/gad.9.6.639.
147. Weiss A, Attisano L. The TGF β Superfamily Signaling Pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2013;2:47–63. doi:10.1002/wdev.86.
148. Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF- β signaling. *Cell Res*. 2009;19:128–39. doi:10.1038/cr.2008.328.
149. Zhang Y, Pizzute T, Pei M. A review of crosstalk between MAPK and Wnt signals and its impact on cartilage regeneration. *Cell Tissue Res*. 2014;358:633–49. doi:10.1007/s00441-014-2010-x.
150. Yamanaka H, Moriguchi T, Masuyama N, Kusakabe M, Hanafusa H, Takada R, et al. JNK functions in the non-canonical Wnt pathway to regulate convergent extension

movements in vertebrates. *EMBO Rep.* 2002;3:69–75. doi:10.1093/embo-reports/kvf008.

151. Farmer SR. Molecular determinants of brown adipocyte formation and function. *Genes Dev.* 2008;22:1269–75. doi:10.1101/gad.1681308.

152. Lu X, Ji Y, Zhang L, Zhang Y, Zhang S, An Y, et al. Resistance to obesity by repression of VEGF gene expression through induction of brown-like adipocyte differentiation. *Endocrinology.* 2012;153:3123–32. doi:10.1210/en.2012-1151.

153. Kast-Woelbern HR, Dana SL, Cesario RM, Sun L, De Grandpre LY, Brooks ME, et al. Rosiglitazone induction of Insig-1 in white adipose tissue reveals a novel interplay of peroxisome proliferator-activated receptor γ and sterol regulatory element-binding protein in the regulation of adipogenesis. *J Biol Chem.* 2004;279:23908–15. doi:10.1074/jbc.M403145200.

154. Green JD, Tollemar V, Dougherty M, Yan Z, Yin L, Ye J, et al. Multifaceted signaling regulators of chondrogenesis: Implications in cartilage regeneration and tissue engineering. *Genes Dis.* 2015;2:307–27. doi:10.1016/j.gendis.2015.09.003.

155. Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K. The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem.* 2006;97:33–44. doi:10.1002/jcb.20652.

156. Ben-Ami R, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Enemy of the (immunosuppressed) state: an update on the pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* infection. *Br J Haematol.* 2010;150:406–17. doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08283.x.

157. Mullins J. *Aspergillus* and Aerobiology. In: *The Genus Aspergillus*. Boston, MA: Springer US; 1994. p. 351–9. doi:10.1007/978-1-4899-0981-7_27.

158. Dagenais TRT, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22:447–65. doi:10.1128/CMR.00055-08.

159. Park SJ, Mehrad B. Innate Immunity to *Aspergillus* Species. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22:535–51. doi:10.1128/CMR.00014-09.

160. Brakhage AA, Bruns S, Thywissen A, Zipfel PF, Behnsen J. Interaction of phagocytes with filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol.* 2010;13:409–15. doi:10.1016/j.mib.2010.04.009.

161. Gersuk GM, Underhill DM, Zhu L, Marr KA. Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular states. *J Immunol.*

2006;176:3717–24.

162. Blanco JL, Garcia ME. Immune response to fungal infections. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008;125:47–70. doi:10.1016/j.vetimm.2008.04.020.

163. Wüthrich M, Deepe GS, Klein B. Adaptive Immunity to Fungi. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:115–48. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074958.

164. Morton CO, Varga JJ, Hornbach A, Mezger M, Sennefelder H, Kneitz S, et al. The temporal dynamics of differential gene expression in *Aspergillus fumigatus* interacting with human immature dendritic cells in vitro. *PLoS One.* 2011;6:e16016. doi:10.1371/journal.pone.0016016.

165. Medzhitov R, Janeway CA. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science.* 2002;296:298–300. doi:10.1126/science.1068883.

166. Semple JW, Italiano JE, Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol.* 2011;11:264–74. doi:10.1038/nri2956.

167. Perkhofer S, Kehrel BE, Dierich MP, Donnelly JP, Nussbaumer W, Hofmann J, et al. Human platelets attenuate *Aspergillus* species via granule-dependent mechanisms. *J Infect Dis.* 2008;198:1243–6. doi:10.1086/591458.

168. Rødland EK, Ueland T, Pedersen TM, Halvorsen B, Muller F, Aukrust P, et al. Activation of platelets by *Aspergillus fumigatus* and potential role of platelets in the immunopathogenesis of Aspergillosis. *Infect Immun.* 2010;78:1269–75. doi:10.1128/IAI.01091-09.

169. Herms D a., Mattson WJ. The Dilemma of Plants: To Grow or Defend. *Q Rev Biol.* 1992;67:283.

170. Vert G, Chory J. Crosstalk in Cellular Signaling: Background Noise or the Real Thing? *Dev Cell.* 2011;21:985–91.

171. Cioffi A, Sessa G, Sassi M, Possenti M, Salvucci S, Carabelli M, et al. Dynamics of the shade-avoidance response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2013;163 September:331–53. doi:10.1104/pp.113.221549.

172. Hersch M, Lorrain S, de Wit M, Trevisan M, Ljung K, Bergmann S, et al. Light intensity modulates the regulatory network of the shade avoidance response in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:6515–20. doi:10.1073/pnas.1320355111.

173. Vlot a C, Dempsey DA, Klessig DF. Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat

- disease. *Annu Rev Phytopathol.* 2009;47:177–206.
174. Fu J, Liu H, Li Y, Yu H, Li X, Xiao J, et al. Manipulating broad-spectrum disease resistance by suppressing pathogen-induced auxin accumulation in rice. *Plant Physiol.* 2011;155 January:589–602.
175. Kazan K, Lyons R. Intervention of Phytohormone Pathways by Pathogen Effectors. *Plant Cell.* 2014;26 June:1–26. doi:10.1105/tpc.114.125419.
176. Jones JDG, Dangl JL. The plant immune system. *Nature.* 2006;444:323–9. doi:10.1038/nature05286.
177. Naseem M, Kaldorf M, Hussain A, Dandekar T. The impact of cytokinin on jasmonate- salicylate antagonism in. *Plant Signal Behav.* 2013.
178. Berendsen RL, Pieterse CMJ, Bakker P a HM. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.* 2012;17:478–86.
179. Lebeis SL, Rott M, Dangl JL, Schulze-Lefert P. Culturing a plant microbiome community at the cross-Rhodes. *New Phytol.* 2012;196:341–4.
180. Wigge P a. Ambient temperature signalling in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 2013;16:661–6. doi:10.1016/j.pbi.2013.08.004.
181. Belkhadir Y, Yang L, Hetzel J, Dangl JL, Chory J. The growth-defense pivot: crisis management in plants mediated by LRR-RK surface receptors. *Trends Biochem Sci.* 2014;39:447–56. doi:10.1016/j.tibs.2014.06.006.
182. Huot B, Yao J, Montgomery BL, He SY. Growth-Defense Tradeoffs in Plants: A Balancing Act to Optimize Fitness. *Mol Plant.* 2014;7:1267–87. doi:10.1093/mp/ssu049.
183. Zipfel C, Lozano-dura R. Trade-off between growth and immunity : role of brassinosteroids. *Trends Plant Sci.* 2015;20:12–9.
184. Pieterse CMJ, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SCM. Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2012;28:489–521.
185. Gust A a., Nürnberger T. Plant immunology: A life or death switch. *Nature.* 2012;486:198–9. doi:10.1038/486198a.
186. Kaldorf M, Naseem M. How many salicylic acid receptors does a plant cell need? *Sci Signal.* 2013;6:jc3. doi:10.1126/scisignal.2003944.
187. Kazan K, Manners JM. Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* 2009;14 June:373–82.

188. Chen M, Chory J. Phytochrome signaling mechanisms and the control of plant development. *Trends Cell Biol.* 2011;21:664–71. doi:10.1016/j.tcb.2011.07.002.
189. Yang D-L, Yao J, Mei C-S, Tong X-H, Zeng L-J, Li Q, et al. PNAS Plus: Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109:E1192–200.
190. Denancé N, Sánchez-Vallet A, Goffner D, Molina A. Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Front Plant Sci.* 2013;4:155. doi:10.3389/fpls.2013.00155.
191. Hwang I, Sheen J, Müller B. Cytokinin Signaling Networks. *Annu Rev Plant Biol.* 2012;63:353–80.
192. Schaller GE, Street IH, Kieber JJ. Cytokinin and the cell cycle. *Curr Opin Plant Biol.* 2014;21:7–15. doi:10.1016/j.pbi.2014.05.015.
193. Schaller GE, Bishopp A, Kieber JJ. The Yin-Yang of Hormones: Cytokinin and Auxin Interactions in Plant Development. *Plant Cell.* 2015;:tpc.114.133595-. doi:10.1105/tpc.114.133595.
194. Choi J, Choi D, Lee S, Ryu C-M, Hwang I. Cytokinins and plant immunity: old foes or new friends? *Trends Plant Sci.* 2011;16:388–94. doi:10.1016/j.tplants.2011.03.003.
195. Choi J, Huh SU, Kojima M, Sakakibara H, Paek KH, Hwang I. The cytokinin-activated transcription factor ARR2 promotes plant immunity via TGA3/NPR1-dependent salicylic acid signaling in arabidopsis. *Dev Cell.* 2010;19:284–95. doi:10.1016/j.devcel.2010.07.011.
196. Ha S, Vankova R, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LSP. Cytokinins: Metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses. *Trends Plant Sci.* 2012;17:172–9. doi:10.1016/j.tplants.2011.12.005.
197. Capra EJ, Laub MT. Evolution of Two-Component Signal Transduction Systems. *Annu Rev Microbiol.* 2012;66:325–47. doi:10.1146/annurev-micro-092611-150039.
198. Naseem M, Wölfling M, Dandekar T. Cytokinins for immunity beyond growth, galls and green islands. *Trends Plant Sci.* 2014;19:481–4. doi:10.1016/j.tplants.2014.04.001.
199. Kieffer M, Neve J, Kepinski S. Defining auxin response contexts in plant development. *Curr Opin Plant Biol.* 2010;13:12–20.
200. Santner A, Estelle M. Recent advances and emerging trends in plant hormone

- signalling. *Nature*. 2009;459:1071–8. doi:10.1038/nature08122.
201. Kazan K. Auxin and the integration of environmental signals into plant root development. *Ann Bot*. 2013;112:1655–65.
202. Grones P, Friml J. Auxin transporters and binding proteins at a glance. *J Cell Sci*. 2015;128:1–7.
203. Schaller GE, Bishopp A, Kieber JJ. The Yin-Yang of Hormones: Cytokinin and Auxin Interactions in Plant Development. *Plant Cell Online* . 2015;:1–21.
204. Boer DR, Freire-Rios A, van den Berg WAM, Saaki T, Manfield IW, Kepinski S, et al. Structural basis for DNA binding specificity by the auxin-dependent ARF transcription factors. *Cell*. 2014;156:577–89. doi:10.1016/j.cell.2013.12.027.
205. Robert-Seilaniantz A, Grant M, Jones JDG. Hormone Crosstalk in Plant Disease and Defense: More Than Just JASMONATE-SALICYLATE Antagonism. *Annu Rev Phytopathol*. 2011;49:317–43. doi:10.1146/annurev-phyto-073009-114447.
206. Naseem M, Kaldorf M, Dandekar T. The nexus between growth and defence signalling: auxin and cytokinin modulate plant immune response pathways. *J Exp Bot*. 2015;66:4885–96. doi:10.1093/jxb/erv297.
207. Hedden P, Thomas SG. Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem J*. 2012;444:11–25. doi:10.1042/BJ20120245.
208. Pel MJC, Pieterse CMJ. Recognition and microbial evasion of host immunity. *J Exp Bot*. 2012;2:1–26.
209. Sheard LB, Tan X, Mao H, Withers J, Ben-Nissan G, Hinds TR, et al. Jasmonate perception by inositol phosphate-potentiated COI1- JAZ co-receptor. *Nature*. 2010;468:400–5.
210. Staswick PE, Serban B, Rowe M, Tiryaki I, Maldonado MT, Maldonado MC, et al. Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell*. 2005;17:616–27. doi:10.1105/tpc.104.026690.
211. Fonseca S, Chico JM, Solano R. The jasmonate pathway: the ligand, the receptor and the core signalling module. *Curr Opin Plant Biol*. 2009;12:539–47.
212. Chini a, Fonseca S, Fernández G, Adie B, Chico JM, Lorenzo O, et al. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*. 2007;448:666–71. doi:10.1038/nature06006.

213. Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, et al. JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature*. 2007;448:661–5. doi:10.1038/nature05960.
214. Katsir L, Schilmiller AL, Staswick PE, He SY, Howe G a. COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:7100–5. doi:10.1073/pnas.0802332105.
215. Browse J. Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annu Rev Plant Biol*. 2009;60:183–205.
216. Wasternack C. Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot*. 2007;100:681–97.
217. Qi L, Yan J, Li Y, Jiang H, Sun J, Chen Q, et al. Arabidopsis thaliana plants differentially modulate auxin biosynthesis and transport during defense responses to the necrotrophic pathogen *Alternaria brassicicola*. *New Phytol*. 2012;195:872–82. doi:10.1111/j.1469-8137.2012.04208.x.
218. Pieterse CMJ, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SCM. Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2012;28:489–521. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154055.
219. Panstruga R, Parker JE, Schulze-Lefert P. SnapShot: Plant Immune Response Pathways. 2009. doi:10.1016/j.cell.2009.02.020.
220. Loake G, Grant M. Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists. *Curr Opin Plant Biol*. 2007;10:466–72. doi:10.1016/J.PBI.2007.08.008.
221. Fu ZQ, Yan S, Saleh A, Wang W, Ruble J, Oka N, et al. NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature*. 2012;486:228–32. doi:10.1038/nature11162.
222. Attaran E, Major IT, Cruz JA, Rosa BA, Koo AJK, Chen J, et al. Temporal Dynamics of Growth and Photosynthesis Suppression in Response to Jasmonate Signaling. *Plant Physiol*. 2014;165:1302–14. doi:10.1104/pp.114.239004.
223. Gallego-Giraldo L, Escamilla-Trevino L, Jackson L a., Dixon R a. Salicylic acid mediates the reduced growth of lignin down-regulated plants. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108:20814–9.
224. Wang D, Pajerowska-Mukhtar K, Culler AH, Dong X. Salicylic acid inhibits pathogen

growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Curr Biol.* 2007;17:1784–90. doi:10.1016/j.cub.2007.09.025.

225. Reymond P, Farmer EE. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr Opin Plant Biol.* 1998;1:404–11. doi:10.1016/S1369-5266(98)80264-1.

226. Robert-Seilaniantz A, Grant M, Jones JDG. Hormone Crosstalk in Plant Disease and Defense: More Than Just JASMONATE-SALICYLATE Antagonism. *Annu Rev Phytopathol.* 2011;49:317–43.

227. Moreau M, Tian M, Klessig DF. Salicylic acid binds NPR3 and NPR4 to regulate NPR1-dependent defense responses. *Cell Res.* 2012;22:1631–3. doi:10.1038/cr.2012.100.

228. Fu ZQ, Yan S, Saleh A, Wang W, Ruble J, Oka N, et al. NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature.* 2012;486:228–32. doi:10.1038/nature11162.

229. Dong X. NPR1, all things considered. *Curr Opin Plant Biol.* 2004;7:547–52. doi:10.1016/J.PBI.2004.07.005.

230. Manohar M, Tian M, Moreau M, Park S, Choi HW, Thompson B. Identification of multiple salicylic acid-binding proteins using two high throughput screens. *Front Plant Sci.* 2015;5:1–14.

231. Zhang Y, Goritschnig S, Dong X, Li X. A gain-of-function mutation in a plant disease resistance gene leads to constitutive activation of downstream signal transduction pathways in suppressor of npr1-1, constitutive 1. *Plant Cell.* 2003;15:2636–46. doi:10.1105/tpc.015842.

232. Jaganathan D, Ramasamy K, Sellamuthu G, Jayabalan S, Venkataraman G. CRISPR for Crop Improvement: An Update Review. *Front Plant Sci.* 2018;9:985. doi:10.3389/fpls.2018.00985.

233. Karl S, Dandekar T. Convergence behaviour and Control in Non-Linear Biological Networks. *Sci Rep.* 2015;5:9746. doi:10.1038/srep09746.

234. Wu G, Feng X, Stein L. A human functional protein interaction network and its application to cancer data analysis. *Genome Biol.* 2010;11:R53. doi:10.1186/gb-2010-11-5-r53.

235. Conesa A, Götz S. Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *Int J Plant Genomics.* 2008;2008:619832. doi:10.1155/2008/619832.

236. Carbon S, Ireland A, Mungall CJ, Shu S, Marshall B, Lewis S, et al. AmiGO: Online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics*. 2009;25:288–9.
237. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*. 2000;28:27–30.
238. Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res*. 2014;42 Database issue:D199-205. doi:10.1093/nar/gkt1076.
239. Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res*. 2016;44:D457–62. doi:10.1093/nar/gkv1070.
240. Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res*. 2017;45:D353–61. doi:10.1093/nar/gkw1092.
241. Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res*. 2017;45:D362–8. doi:10.1093/nar/gkw937.
242. Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, et al. STRING v9.1: Protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res*. 2013;41 November 2012:808–15. doi:10.1093/nar/gks1094.
243. Letunic I, Doerks T, Bork P. SMART: Recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:D257–60.
244. Snel B, Lehmann G, Bork P, Huynen M a. STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. *Nucleic Acids Res*. 2000;28:3442–4. doi:10.1093/nar/28.18.3442.
245. Zerbino DR, Achuthan P, Akanni W, Amode MR, Barrell D, Bhai J, et al. Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res*. 2018;46:D754–61. doi:10.1093/nar/gkx1098.
246. Safran M, Dalah I, Alexander J, Rosen N, Iny Stein T, Shmoish M, et al. GeneCards Version 3: the human gene integrator. *Database (Oxford)*. 2010;2010:baq020. doi:10.1093/database/baq020.
247. Gaudet P, Michel P-A, Zahn-Zabal M, Britan A, Cusin I, Domagalski M, et al. The neXtProt knowledgebase on human proteins: 2017 update. *Nucleic Acids Res*.

- 2017;45:D177–82. doi:10.1093/nar/gkw1062.
248. Bateman A, Martin MJ, O’Donovan C, Magrane M, Alpi E, Antunes R, et al. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:D158–69. doi:10.1093/nar/gkw1099.
249. Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci.* 1998;95:5857–64. doi:10.1073/pnas.95.11.5857.
250. Raghavachari B, Tasneem A, Przytycka TM, Jothi R. DOMINE: a database of protein domain interactions. *Nucleic Acids Res.* 2008;36 Database issue:D656-61. doi:10.1093/nar/gkm761.
251. Croft D, Mundo AF, Haw R, Milacic M, Weiser J, Wu G, et al. The Reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 2014;42 Database issue:D472-7. doi:10.1093/nar/gkt1102.
252. Fabregat A, Sidiropoulos K, Garapati P, Gillespie M, Hausmann K, Haw R, et al. The Reactome pathway Knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:D481-7. doi:10.1093/nar/gkv1351.
253. YWorks <https://www.yworks.com/products/ye.yEd>. Accessed 8 Nov 2018.
254. Naseem M, Philippi N, Hussain A, Wangorsch G, Ahmed N, Dandekar T. Integrated Systems View on Networking by Hormones in Arabidopsis Immunity Reveals Multiple Crosstalk for Cytokinin. *Plant Cell.* 2012;24:1793–814. doi:10.1105/tpc.112.098335.
255. Naseem M, Philippi N, Hussain a., Wangorsch G, Ahmed N, Dandekar T. Integrated Systems View on Networking by Hormones in Arabidopsis Immunity Reveals Multiple Crosstalk for Cytokinin. *Plant Cell.* 2012;24 May:1793–814.
256. White MC, Holman DM, Boehm JE, Peipins LA, Grossman M, Henley SJ. Age and cancer risk: a potentially modifiable relationship. *Am J Prev Med.* 2014;46 3 Suppl 1:S7-15. doi:10.1016/j.amepre.2013.10.029.
257. Peter IS, Davidson EH. Assessing regulatory information in developmental gene regulatory networks. *Proc Natl Acad Sci.* 2017;114:5862–9. doi:10.1073/pnas.1610616114.
258. Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, Tomashevsky M, et al. NCBI GEO: Archive for functional genomics data sets - Update. *Nucleic Acids Res.* 2013;41

Database issue:D991-5. doi:10.1093/nar/gks1193.

259. Leclerc RD. Survival of the sparsest: robust gene networks are parsimonious. *Mol Syst Biol.* 2008;doi. doi:10.1038/msb.2008.52.

260. Naseem M, Dandekar T. The Role of Auxin-Cytokinin Antagonism in Plant-Pathogen Interactions. *PLoS Pathog.* 2012;8:e1003026. doi:10.1371/journal.ppat.1003026.

261. Audretsch C, Lopez D, Srivastava M, Wolz C, Dandekar T. A semi-quantitative model of Quorum-Sensing in *Staphylococcus aureus*, approved by microarray meta-analyses and tested by mutation studies. *Mol Biosyst.* 2013;9:2665–80. doi:10.1039/c3mb70117d.

262. Chen Q, Shou P, Zhang L, Xu C, Zheng C, Han Y, et al. An Osteopontin-Integrin Interaction Plays a Critical Role in Directing Adipogenesis and Osteogenesis by Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells.* 2014;32:327–37. doi:10.1002/stem.1567.

263. Boland GM, Perkins G, Hall DJ, Tuan RS. Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* 2004;93:1210–30. doi:10.1002/jcb.20284.

264. Dy P, Wang W, Bhattaram P, Wang Q, Wang L, Ballock RT, et al. Sox9 directs hypertrophic maturation and blocks osteoblast differentiation of growth plate chondrocytes. *Dev Cell.* 2012;22:597–609. doi:10.1016/j.devcel.2011.12.024.

265. Yoshida C a., Komori H, Maruyama Z, Miyazaki T, Kawasaki K, Furuichi T, et al. Sp7 inhibits osteoblast differentiation at a late stage in mice. *PLoS One.* 2012;7:e32364. doi:10.1371/journal.pone.0032364.

266. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall a L, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell.* 1997;89:747–54. doi:10.1016/S0092-8674(00)80257-3.

267. Valenti M, Dalle Carbonare L, Mottes M. Osteogenic Differentiation in Healthy and Pathological Conditions. *Int J Mol Sci.* 2016;18:41. doi:10.3390/ijms18010041.

268. Horvai AE, Roy R, Borys D, O'Donnell RJ. Regulators of skeletal development: a cluster analysis of 206 bone tumors reveals diagnostically useful markers. *Mod Pathol.* 2012;25:1452–61. doi:10.1038/modpathol.2012.110.

269. Leboy P, Grasso-Knight G, D'Angelo M, Volk SW, Lian J V, Drissi H, et al. Smad-Runx interactions during chondrocyte maturation. *J Bone Joint Surg Am.* 2001;83-A Suppl Pt

1:S15-22.

270. Nakashima K, De Crombrughe B. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends Genet.* 2003;19:458–66. doi:10.1016/S0168-9525(03)00176-8.

271. Chao CCK, Hung FC, Chao JJ. Gas7 is required for mesenchymal stem cell-derived bone development. *Stem Cells Int.* 2013;2013:137010. doi:10.1155/2013/137010.

272. Yoshida CA, Komori H, Maruyama Z, Miyazaki T, Kawasaki K, Furuichi T, et al. SP7 Inhibits Osteoblast Differentiation at a Late Stage in Mice. *PLoS One.* 2012;7:e32364. doi:10.1371/journal.pone.0032364.

273. Hao J, Zhang Y, Jing D, Shen Y, Tang G, Huang S, et al. Mechanobiology of mesenchymal stem cells: Perspective into mechanical induction of MSC fate. *Acta Biomater.* 2015;20:1–9. doi:10.1016/j.actbio.2015.04.008.

274. Galindo M, Pratap J, Young DW, Hovhannisyan H, Im HJ, Choi JY, et al. The bone-specific expression of Runx2 oscillates during the cell cycle to support a G1-related antiproliferative function in osteoblasts. *J Biol Chem.* 2005;280:20274–85. doi:10.1074/jbc.M413665200.

275. Sierra J, Villagra A, Paredes R, Cruzat F, Gutierrez S, Javed A, et al. Regulation of the bone-specific osteocalcin gene by p300 requires Runx2/Cbfa1 and the vitamin D3 receptor but not p300 intrinsic histone acetyltransferase activity. *Mol Cell Biol.* 2003;23:3339–51.

276. Hungness ES, Luo G-J, Pritts TA, Sun X, Robb BW, Hershko D, et al. Transcription factors C/EBP-beta and -delta regulate IL-6 production in IL-1beta-stimulated human enterocytes. *J Cell Physiol.* 2002;192:64–70. doi:10.1002/jcp.10116.

277. Satija NK, Sharma D, Afrin F, Tripathi RP, Gangenahalli G. High Throughput Transcriptome Profiling of Lithium Stimulated Human Mesenchymal Stem Cells Reveals Priming towards Osteoblastic Lineage. *PLoS One.* 2013;8.

278. Blenk S, Engelmann JC, Pinkert S, Weniger M, Schultz J, Rosenwald A, et al. Explorative data analysis of MCL reveals gene expression networks implicated in survival and prognosis supported by explorative CGH analysis. *BMC Cancer.* 2008;8:106. doi:10.1186/1471-2407-8-106.

279. Menssen A, Häupl T, Sittinger M, Delorme B, Charbord P, Ringe J. Differential gene

expression profiling of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells during adipogenic development. *BMC Genomics*. 2011;12:461.

280. Rosen ED, Hsu C, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, et al. C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway. *Genes Dev*. 2002;16:22–6.

281. Spiegelman B, Puigserver P, Wu Z. Regulation of adipogenesis and energy balance by PPAR γ and PCG-1. *Int J Obes*. 2000;24:8–10.

282. Casadevall A, Fu M, Guimaraes A, Albuquerque P. The ‘Amoeboid Predator-Fungal Animal Virulence’ Hypothesis. *J Fungi*. 2019;5:10.

283. Hillmann F, Novohradská S, Mattern DJ, Forberger T, Heinekamp T, Westermann M, et al. Virulence determinants of the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* protect against soil amoeba predation. *Environ Microbiol*. 2015;17:2858–69. doi:10.1111/1462-2920.12808.

284. Fliesser M, Morton CO, Bonin M, Ebel F, Hünninger K, Kurzai O, et al. Hypoxia-inducible factor 1 α modulates metabolic activity and cytokine release in anti-*Aspergillus fumigatus* immune responses initiated by human dendritic cells. *Int J Med Microbiol*. 2015. doi:10.1016/j.ijmm.2015.08.036.

285. Barr T a., Brown S, Ryan G, Zhao J, Gray D. TLR-mediated stimulation of APC: Distinct cytokine responses of B cells and dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2007;37:3040–53. doi:10.1002/eji.200636483.

286. Goodridge HS, Simmons RM, Underhill DM. Dectin-1 stimulation by *Candida albicans* yeast or zymosan triggers NFAT activation in macrophages and dendritic cells. *J Immunol*. 2007;178:3107–15. doi:10.4049/jimmunol.178.5.3107.

287. Pompei L, Jang S, Zamlynny B, Ravikumar S, McBride A, Hickman SP, et al. Disparity in IL-12 release in dendritic cells and macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis* is due to use of distinct TLRs. *J Immunol*. 2007;178:5192–9.

288. Mezger M, Kneitz S, Wozniok I, Kurzai O, Einsele H, Loeffler J. Proinflammatory response of immature human dendritic cells is mediated by dectin-1 after exposure to *Aspergillus fumigatus* germ tubes. *J Infect Dis*. 2008;197:924–31. doi:10.1086/528694.

289. van de Vrie M, Heymans S, Schroen B. MicroRNA involvement in immune activation during heart failure. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2011;25:161–70. doi:10.1007/s10557-011-6291-y.

290. Vogel E, Donat MG, Alexander L V, Meinshausen M, Ray DK, Karoly D, et al. The effects of climate extremes on global agricultural yields. *Environ Res Lett.* 2019;14:054010. doi:10.1088/1748-9326/ab154b.
291. Jones RAC. Future Scenarios for Plant Virus Pathogens as Climate Change Progresses. *Adv Virus Res.* 2016;95:87–147. doi:10.1016/BS.AIVIR.2016.02.004.
292. Zhang S, Li X, Sun Z, Shao S, Hu L, Ye M, et al. Antagonism between phytohormone signalling underlies the variation in disease susceptibility of tomato plants under elevated CO₂. *J Exp Bot.* 2015;66:1951–63. doi:10.1093/jxb/eru538.
293. Váry Z, Mullins E, McElwain JC, Doohan FM. The severity of wheat diseases increases when plants and pathogens are acclimatized to elevated carbon dioxide. *Glob Chang Biol.* 2015;21:2661–9. doi:10.1111/gcb.12899.
294. Xin X-F, He SY. *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annu Rev Phytopathol.* 2013;51:473–98. doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102321.
295. Argueso CT, Ferreira FJ, Epple P, To JPC, Hutchison CE, Schaller GE, et al. Two-component elements mediate interactions between cytokinin and salicylic acid in plant immunity. *PLoS Genet.* 2012;8:e1002448. doi:10.1371/journal.pgen.1002448.
296. Ueda J, Kato J. Inhibition of cytokinin-induced plant growth by jasmonic acid and its methyl ester. *Physiol Plant.* 1982;54:249–52. doi:10.1111/j.1399-3054.1982.tb00255.x.
297. Teale WD, Paponov IA, Palme K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7:847–59. doi:10.1038/nrm2020.
298. Mauch-Mani B, Mauch F. The role of abscisic acid in plant – pathogen interactions. *Curr Opin Plant Biol.* 2005;8:409–14.
299. de Torres Zabala M, Bennett MH, Truman WH, Grant MR. Antagonism between salicylic and abscisic acid reflects early host-pathogen conflict and moulds plant defence responses. *Plant J.* 2009;59:375–86. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03875.x.
300. Zhang Y, Cheng YT, Qu N, Zhao Q, Bi D, Li X. Negative regulation of defense responses in *Arabidopsis* by two NPR1 paralogs. *Plant J.* 2006;48:647–56. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02903.x.
301. Helliwell CA, Sullivan JA, Mould RM, Gray JC, Peacock WJ, Dennis ES. A plastid

- envelope location of Arabidopsis ent-kaurene oxidase links the plastid and endoplasmic reticulum steps of the gibberellin biosynthesis pathway. *Plant J.* 2001;28:201–8. doi:10.1046/j.1365-313X.2001.01150.x.
302. Helliwell CA, Poole A, Peacock WJ, Dennis ES. Arabidopsis ent-kaurene oxidase catalyzes three steps of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiol.* 1999;119:507–10. doi:10.1104/pp.119.2.507.
303. Yamaguchi S, Sun T, Kawaide H, Kamiya Y, David CJ, Kamiya Y, et al. The *GA2* Locus of *Arabidopsis thaliana* Encodes *ent*-Kaurene Synthase of Gibberellin Biosynthesis. *Plant Physiol.* 1998;116:1271–8. doi:10.1104/pp.116.4.1271.
304. Curien G, Ravanel S, Robert M, Dumas R. Identification of six novel allosteric effectors of Arabidopsis thaliana aspartate kinase-homoserine dehydrogenase isoforms. Physiological context sets the specificity. *J Biol Chem.* 2005;280:41178–83. doi:10.1074/jbc.M509324200.
305. Jander G, Joshi V. Aspartate-Derived Amino Acid Biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *Arab B.* 2009;7:e0121. doi:10.1199/tab.0121.
306. Wan DC, Wang KC. Maintenance of Mammalian Stem Cell States and Enhanced Wound Healing by Honey Bee Royal Jelly. *Plast Reconstr Surg - Glob Open.* 2018;6:86. doi:10.1097/01.GOX.0000533973.62828.6b.
307. Goh WW Bin, Wang W, Wong L. Why Batch Effects Matter in Omics Data, and How to Avoid Them. *Trends Biotechnol.* 2017;35:498–507. doi:10.1016/J.TIBTECH.2017.02.012.
308. Leek JT, Scharpf RB, Bravo HC, Simcha D, Langmead B, Johnson WE, et al. Tackling the widespread and critical impact of batch effects in high-throughput data. *Nat Rev Genet.* 2010;11:733–9. doi:10.1038/nrg2825.
309. Cahan P, Li H, Morris SA, Lummertz da Rocha E, Daley GQ, Collins JJ. CellNet: Network Biology Applied to Stem Cell Engineering. *Cell.* 2014;158:903–15. doi:10.1016/j.cell.2014.07.020.
310. Love MI, Anders S, Kim V, Huber W. RNA-Seq workflow: gene-level exploratory analysis and differential expression. *F1000Research.* 2015;4:1070. doi:10.12688/f1000research.7035.1.
311. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential

expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 2015;43:e47. doi:10.1093/nar/gkv007.

312. Martin Kaltendorf, Naseem Muhammad, David Thelen TD. Reconstruction, Simulation and Prediction of Gene Regulatory Networks, [not published yet]. 2019.

313. Fendrich K, Hoffmann W. More than just aging societies: the demographic change has an impact on actual numbers of patients. *J Public Health (Bangkok)*. 2007;15:345–51. doi:10.1007/s10389-007-0142-0.

314. Denton FT, Spencer BG. Demographic Change and the Cost of Publicly Funded Health Care. *Can J Aging / La Rev Can du Vieil*. 1995;14:174–92. doi:10.1017/S0714980800011806.

315. Muenz R. Aging and Demographic Change in European Societies: Main Trends and Alternative Policy Options. 2007.

316. Cheal D. Aging and Demographic Change. *Can Public Policy / Anal Polit*. 2000;26:S109. doi:10.2307/3552574.

317. Larry Jameson J, Longo DL. Precision Medicine—Personalized, Problematic, and Promising. *Obstet Gynecol Surv*. 2015;70:612–4. doi:10.1097/01.ogx.0000472121.21647.38.

318. Schauburger B, Archontoulis S, Arneth A, Balkovic J, Ciais P, Deryng D, et al. Consistent negative response of US crops to high temperatures in observations and crop models. *Nat Commun*. 2017;8:13931. doi:10.1038/ncomms13931.

319. Canese K, Weis S. PubMed: The Bibliographic Database. In: *The NCBI Handbook [Internet]*. 2nd edition. 2nd editio. Bethesda (MD: National Center for Biotechnology Information (US); 2002.

320. Aristoteles. *Metaphysik*.

6 Anhang

6.1 Rekonstruierte Netzwerkmodelle

6.1.1 MSC Netzwerk

Siehe beigelegter Datenträger, Anhang A/01.

6.1.2 DC Netzwerk

Siehe beigelegter Datenträger, Anhang B/02.

6.1.3 AT Netzwerk

Siehe beigelegter Datenträger, Anhang B/03.

6.2 Quellverzeichnis der rekonstruierten Netzwerkmodelle

6.2.1 Interaktionen und Literaturnachweise MSC Netzwerk

Siehe beigelegter Datenträger, Anhang B/01.

6.2.2 Interaktionen und Literaturnachweise DC Netzwerk

Siehe beigelegter Datenträger, Anhang B/02.

6.2.3 Interaktionen und Literaturnachweise AT Netzwerk

Siehe beigelegter Datenträger, Anhang B/03.

6.3 Ergebnisse: Berechnung der Kontrollzentralität

6.3.1 Kontrollzentralität des MSC Netzwerks

Siehe beigelegter Datenträger, Anhang C1/01.

6.3.2 Kontrollzentralität des DC Netzwerks

Siehe beigelegter Datenträger, Anhang C1/02.

6.3.3 Kontrollzentralität des AC Netzwerks

Siehe beigelegter Datenträger, Anhang C1/03.

6.4 Ergebnisse: Berechnung der Stabilen Systemzustände

6.4.1 Stabile Systemzustände des MSC Netzwerks

Siehe beigelegter Datenträger, Anhang C2/01.

6.4.2 Stabile Systemzustände des DC Netzwerks

Siehe beigelegter Datenträger, Anhang C2/02.

6.4.3 Stabile Systemzustände des AT Netzwerks

Siehe beigelegter Datenträger, Anhang C2/03.

6.5 Vergleich der Simulationsergebnisse mit experimentelle Daten (GEO)

Siehe beigelegter Datenträger, Anhang C3/01.

6.6 Script-Programme zur Netzwerkwandlung und Datenauswertung

7 Lebenslauf

ANSTELLUNG

eXXcellent solutions consulting & software GmbH | Richard-Reitzner-Allee 1 | 85540
Haar

Softwareingenieur & Consultant

seit 02/2018

Aufgabenbereich:

- Kundenspezifische Softwareentwicklung
 - Konzeption von Software-Prototypen
 - Beratung & Kundensupport
-

Lehrstuhl für Bioinformatik | Julius-Maximilians-Universität | am Hubland | 97074
Würzburg

Doktorand der Bioinformatik

10/2013 – 01/2018

Voraussichtlicher Abschluss

Ende 2019

Themen:

- Modellierung regulatorischer Netzwerke
- Modellierung metabolischer Netzwerke
- Transcriptomics
- Objektorientierte Programmierung mit Java und Perl
- Netzwerkanalyse
- Netzwerksimulation
- Interactomics

Interdisziplinäre Kooperationen:

- Molekular & Infektionsbiologie · Uniklinik Würzburg
- Mikrobiologisches Institut – klinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene · Uniklinik Erlangen
- Abteilung für Molekularbiologie/Biozentrum · Medizinische Universität Innsbruck
- Aspergillus and Antifungal Research Laboratory, Department of Clinical Microbiology and Immunology, Sackler School of Medicine · Tel Aviv University, Israel
- Molecular Biology and Genetics · Boğaziçi University Istanbul

Weitere Aufgaben in der Lehre

- Vorlesung: Topics in Bioinformatics **WS 2015**
- Übungsleitung: Statistik für Biologen **2014-2016**
- Betreuung von Bachelor-, Master- und (Zahn-) Medizinischen Doktorarbeiten und Praktika **2014-2017**

AUSBILDUNG

Julius-Maximilians-Universität | am Hubland | 97074 Würzburg

Master of Science Biologie

10/2011 - 09/2013

Schwerpunkte:

1. Systembiologie

2. Bioinformatik

Thema der Abschlussarbeit:

“Modellierung und Modifikation von Signalkaskaden”

(Note 1.0)

Julius-Maximilians-Universität | am Hubland | 97074 Würzburg

Bachelor of Science Biologie

10/2009 - 09/2012

Schwerpunkte:

1. Bioinformatik

Thema der Abschlussarbeit:

“Analyse von Proteindomänen: Proteinfusion und Genexpression”

(Note 1.0)

Deutschorden-Gymnasium Bad Mergentheim | Kopernikusstr. 11 | 97980 Bad
Mergentheim

Allgemeine Hochschulreife

09/1999 - 07/2008

WEITERBILDUNGEN

Moderations-Training, eXXcellent Solutions

07/2019

eXXcellent Programmier-School

10/2018

Kommunikationstraining, eXXcellent Solutions

06/2018

Grundlagen und objektorientiertes Programmieren mit Perl

WS 2012

Einführung in die Programmierung mit Perl

WS 2011

SPRACHEN

Deutsch

Muttersprache

Englisch

verhandlungssicher

Französisch

Grundkenntnisse

WISSENSCHAFTLICH PRAKTISCHE METHODEN

Westernplot, DNA Aufreinigung, DNA Clonierung, PCR, RNA Extraktion, reverse PCR,

WISSENSCHAFTLICH ANALYTISCHE METHODEN

Micro-Array Analyse, Analyse von RNA-Seq Daten, Modellierung regulatorischer Netzwerke, Modellierung metabolischer Netzwerke, Transcriptomics-Analyse, Softwareentwicklung für wissenschaftliche Systeme

TECHNISCHE KENNTNISSE UND METHODEN

Programmierkenntnisse	Java, Java EE, JavaScript, NodeJs, AngularJs, TypeScript, Perl, SQL, R, Python
Betriebssystemkenntnisse	Microsoft Windows, Linux
Softwarekenntnisse	MS Office, Adobe CC (Photoshop, Lightroom), Gimp

WEITERE ERFAHRUNGEN

Vereinsleitung (1.Vorsitzender) der "Radsportgemeinschaft Würzburg e.V."	2014-2017
Mitglied der Vorstandschaft (Schriftführer) der Triathlonfreunde Freudenbach e.V.	2007-2010
Oberministrant und Mesner der kath. Kirchengemeinde Bernsfelden	2005-2008

WEITERE WISSENSCHAFTLICHE BEITRÄGE UND KONFERENZEN

Teilnahme am Digital Health World Congress 2017	11/2017
5th Joint Conference of the DGHM & VAAM (2017) Title: " <i>A.fumigatus</i> infections: Strategies, metabolism and host immunity signaling"	09/2017
49th Scientific Conference of the German speaking Mycological Society (DMyG) e.V. and 1st International Symposium of the CRC/Transregio FungiNet (2015) Title: "AspMetNet – <i>Aspergillus fumigatus</i> Metabolism Network. The Systematic identification of anti-fungal drug targets by a metabolic network approach"	09/2017
Reviewer für <i>BMC Bioinformatics</i>	12/2016-02/2018

Würzburg,

.....

Martin Kaltdorf

8 Publikationen

Aus dieser Doktorarbeit sind folgende Publikationen direkt hervorgegangen:

- 1) Naseem M, **Kaltdorf M**, Dandekar T. The nexus between growth and defence signalling: auxin and cytokinin modulate plant immune response pathways. *J Exp Bot.* 2015;66:4885–96. doi:10.1093/jxb/erv297.

Eigenanteil (jeweils geschätzt in Prozent der Gesamtleistung):

Anfertigung der Abbildungen inkl. Beschriftung (100%), Recherche der Interaktionsdaten (20%), Verfassung und Formulierung des Papers (35%), Korrektur und Überarbeitung des Manuskripts (25%)

- 2) Czakai K*, Dittrich M*, **Kaltdorf M***, Müller T, Krappmann S, Schedler A, et al. Influence of Platelet-rich Plasma on the immune response of human monocyte-derived dendritic cells and macrophages stimulated with *Aspergillus fumigatus*. *Int J Med Microbiol.* 2016. doi:10.1016/j.ijmm.2016.11.010.

Eigenanteil (jeweils geschätzt in Prozent der Gesamtleistung):

Rekonstruktion des systembiologischen Netzwerks (90%), systembiologische Analysen (100%), Anfertigung der Abbildungen inkl. Beschriftung (25%, systembiologischer Anteil: 100%), Verfassung und Formulierung des Papers (20%, systembiologischer Anteil: 100%)

- 3) **Kaltdorf M**, Srivastava M, Gupta SK, Liang C, Binder J, Dietl A-M, et al. Systematic Identification of Anti-Fungal Drug Targets by a Metabolic Network Approach. *Front Mol Biosci.* 2016;3:22. doi:10.3389/fmolb.2016.00022.

Eigenanteil (jeweils geschätzt in Prozent der Gesamtleistung):

Analyse der Transkriptom-Daten und Enzymregulation (100%), Anfertigung der Abbildungen inkl. Beschriftung (60%), Verfassung und Formulierung des Papers (50%)

**equally contributing first Authors/gleichwertig beitragende Erstauthoren*

- 4) **Kaltdorf M**, Dandekar T, Naseem M. Reconstruction of an Immune Dynamic Model to Simulate the Contrasting Role of Auxin and Cytokinin in Plant Immunity. In: Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). 2017. p. 83–92. doi:10.1007/978-1-4939-6831-2_6.

Eigenanteil (jeweils geschätzt in Prozent der Gesamtleistung):

Verfassung und Formulierung des Papers (80%), Anfertigung der Abbildungen inkl. Beschriftung (100%)

Weitere während der Doktorarbeit entstandene Publikationen:

- 5) Hof M, Dahlke RI, **Kaltdorf M**, Dandekar T, Beck LA. A non-invasive manual method for the assessment of pregnancy in female Scyliorhinus canicula catsharks. Mediterr Mar Sci. 2018;19:201. doi:10.12681/mms.13838.

Eigenanteil (jeweils geschätzt in Prozent der Gesamtleistung):

Konzeption des Papers und Beratung (50%), bioinformatische Analysen (25%)

Weitere Publikationen an denen ich beteiligt war:

- 6) Kaltdorf M, Naseem M. How many salicylic acid receptors does a plant cell need? Sci Signal. 2013;6:jc3. doi:10.1126/scisignal.2003944.

Eigenanteil (jeweils geschätzt in Prozent der Gesamtleistung):

Anfertigung der Abbildungen inkl. Beschriftung (100%), Verfassung und Formulierung des Papers (35%), Korrektur und Überarbeitung des Manuskripts (25%)

- 7) Naseem M, **Kaltdorf M**, Hussain A, Dandekar T. The impact of cytokinin on jasmonate-salicylate antagonism in. Plant Signal Behav. 2013;8:1–4.

Eigenanteil (jeweils geschätzt in Prozent der Gesamtleistung):

Anfertigung der Abbildungen inkl. Beschriftung (75%), bioinformatische und systembiologische Analysen (25%), Verfassung und Formulierung des Papers (20%)

Würzburg,

.....

Martin Kaltdorf

9 Danksagung

Ich möchte mich von ganzem Herzen bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben:

An erster Stelle möchte ich mich bei Thomas Dandekar bedanken. Du bist mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Sowohl auf menschlicher, als auch auf fachlicher Ebene konnte ich unglaublich viel von dir lernen. Deine Erfahrung und visionären Gedanken haben mich nachhaltig geprägt. Ich bin sehr dankbar, dass ich das Glück hatte mit dir zu arbeiten.

Vielen Dank an Jürgen Löffler für die konstruktive Zusammenarbeit beim Thema *A. fumigatus* und die Bereitschaft das Zweitgutachten meiner Arbeit zu übernehmen. In diesem Zusammenhang möchte ich besonders Kristin Czakai danken für die Validierung des theoretischen Modells des menschlichen Immunsystems.

Mein Dank geht auch an Muhammad Naseem: mit deiner tiefgreifenden Expertise zu *A. thaliana*, sowie den vielen augenöffnenden Diskussionen und interkulturellen Einblicken hast du maßgeblich zum Erfolg der Arbeit beigetragen.

Vielen Dank auch an David Thelen und Tim Breitenbach für die angenehme, konstruktive und intensive Zusammenarbeit.

Vielen Dank an den gesamten Lehrstuhl für Bioinformatik für die interessante, lehrreiche Zeit. Insbesondere geht mein Dank an Eva-Maria Fischer, die stets dafür gesorgt hat, dass organisatorische Angelegenheiten unkompliziert und unverzüglich erledigt wurden.

Mein besonderer Dank geht an meine Familie, die mich über die Jahre zu dem Menschen geformt hat, der ich heute bin und mich stets in allem unterstützt und bekräftigt hat:

Meinen Schwestern, ihr habt mir bei jeder Gelegenheit und vor allem in Anstrengenden Zeiten stets eine willkommene Auszeit und Ablenkung ermöglicht und seid mir immer eine große Stütze.

Meinen Eltern, Ihr seid mir immer Vorbild gewesen und habt mir jederzeit den Rücken freigehalten und mich stets darin bestärkt meine Träume nicht aus den Augen zu verlieren.

Meiner Frau Kristin, für das Korrekturlesen meiner Arbeit, für deine verständnisvolle Geduld, für das „durch Dick und Dünn gehen“ und dafür, dass du mich stets und bei jeder Idee bedingungslos unterstützt und bestärkst und mir immer unerschütterlicher Rückhalt bist.