

2 Material und Methoden

2.1 Wirts-Pathogen-Netzwerk und Boolesches Modell

Um die Interaktion zwischen CK und AUX zu untersuchen, wurde zuerst ein Wirts-Pathogen-Netzwerk unter Verwendung verschiedener Interaktom-DBen sowie Literaturrecherche rekonstruiert, wobei sich hierbei auf eine Infektion von *A. thaliana* mit *Pst* DC 3000 fokussiert wurde. Hierzu wurden Informationen zu Enzymen und deren Interaktionen aus den DBen KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; <http://www.genome.jp/kegg/>) und PMN (Plant Metabolic Networks; <http://www.plantcyc.org/>) verwendet. Regulatorische Proteine, Hormone, Rezeptoren, abbauende Komplexe sowie deren Verbindungen wurden aus der STRING-DB (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins; <http://string-db.org/>) generiert. Zur Integration der Informationen zu den Verbindungen zwischen *A. thaliana* und *Pst* DC 3000 wurde die PPI-DB (Pseudomonas Plant Interaction; http://www.pseudomonas-syringae.org/pst_home.html) genutzt. Die Literaturrecherche erfolgte über NCBI (PubMed, DB mit Literatur zu biomedizinischer Forschung; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Die Visualisierung des Netzwerkes erfolgte unter Verwendung der systembiologischen Software CellDesigner 3.5.1 (<http://www.celldesigner.org/>). Mit diesem Wirts-Pathogen-Netzwerk wurde als nächstes ein Boolesches Modell erstellt. Dies erfolgte mit der Software SQUAD (Di Cara, Garg et al. 2007). Unter Verwendung eines Binär-Algorithmus (Binary Decision Diagram, BDD, Garg, Xenarios et al. 2007) konvertiert diese ein Netzwerk zunächst in ein diskretes dynamisches System und identifiziert alle stationären Zustände (steady states), woraus anschließend ein kontinuierliches dynamisches System erstellt wird. Es erlaubt hierbei eine Simulation durch individuelle Veränderung der Parameter, wobei hier auch eine experimentelle Simulation erfolgen kann, z.B. Aktivierung eines Rezeptors oder Ausschalten von Komponenten (Di Cara, Garg et al. 2007).

Das generierte Boolesche Modell wurde so erstellt, dass Knoten des Wirts-Pathogen-Netzwerkes, welche in Verbindung mit *Pst* DC 3000, AUX und CK stehen, entsprechende Input-Stimuli darstellen. PR1 hingegen wurde als Reaktion des Systems auf eine Veränderung angesehen und folglich als Output-Stimuli, spiegelt so die Immunreaktion wieder, gewählt.

Ziel der dynamischen Simulation war die Wirkung der Hormone CK und AUX bei einer Infektion mit *Pst* DC 3000. Hierfür wurde jeweils der Zustand von PR1 als Output auf einen Input-Stimulus mit *Pst* DC 3000 sowohl mit als auch ohne CK und AUX (10 μ mol als Standardkonzentration für Aktivierung) gemessen und grafisch dargestellt.

2.2 Transkriptom-Interaktom-Analyse

Die Transkriptom-Interaktom-Analysen wurden entsprechend dem Workflow aus Abb. 4 durchgeführt.

Als Transkriptomdaten dienten ein Microarray-Experiment für eine exogene CK-Applikation an eine wildtypische *A. thaliana* (Gabe *trans*-Zeatin und Mock (als Kontrolle); GEO: GSE 6832.I; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>; Normalisierung erfolgte mit GEO-2R; insgesamt 22.810 Gene, davon Gene mit logFC > 1 ausgewählt) sowie für eine Sextuplet *A. thaliana*-Mutante (drei Tage Behandlung mit *Hpa* NoCo2 und Wasser an *arr3,4,5,6,8,9* und Col-O-Wildtyp (als Kontrolle); Berechnung logFC als Differenz Pathogen – Wasser; insgesamt 1.577 Gene; Argueso, Ferreira et al. 2012). [Anmerkung: logFC (log2FoldChange) = spiegelt Genexpressionsrate wieder; 1 = Expression zweifach erhöht, -1 = ein-einhalbfach verringert] Die Interaktomdaten für *A. thaliana* wurden aus der STRING-DB (www.string-db.org) generiert und beinhalten 3.056 Proteine und 18.233 Interaktionen (Kriterium: Score für Interaktionen > 0,9). Als nächstes erfolgte für jeden Microarray-Datensatz ein Transkriptom-Interaktom-Mapping (Intersect), um so jeweils die Anzahl der gemeinsamen Gene aus Transkriptom (signifikant unterschiedlich regulierten Gene des Microarray) und Interaktom zu erhalten (Transkriptom x Interaktom; Sterne: Gen in Microarray und Interaktom enthalten, Punkte: Gen nur im Interaktom enthalten). Dieses Transkriptom-Interaktom-Mapping erfolgte unter Verwendung der Programmiersprache

R Version 2.13.0 (The R Development Core Team. Vienna, Austria, 2010. R Foundation for Statistical Computing, ISBN 3-900051-07-0) und der Software phpMyAdmin (http://www.phpmyadmin.net/home_page/index.php). Die jeweils gemeinsamen Gene aus Microarray und Interaktom (Sterne) wurden als nächstes auf ihre biologischen Funktionen (GO, Ashburner, Ball et al. 2000) hin untersucht (Gene Enrichment-Analyse mit Cytoscape Plugin BiNGO, Maere, Heymans et al. 2005); als Suche „biological process“ in *A. thaliana*). Hiervon wurden jeweils biologische Funktionen mit Bezug zur Immunabwehr verwendet (Immunfunktionen). Mit den korrespondierenden Genen (Pluszeichen) dieser Funktionen und deren Interaktionspartnern (Punkte aus dem Interaktom) wurde daraufhin ein Immunnetzwerk generiert (Immune Network; ebenfalls wie Mapping mittels R und phpMyAdmin). Dieses Immunnetzwerk wurde anschließend auf seine Topologie hin untersucht (Network Analysis mit Cytoscape Plugin NetworkAnalyzer, Doncheva, Assenov et al. 2012) und grafisch dargestellt (durchschnittliche Anzahl an Nachbarn, englisch: Degree-average number of neighbours). Die Detektion von jeweils zehn zentralen Knoten (Hubs) erfolgte unter Verwendung verschiedener Kriterien (Genexpression, Immunfunktion, Konnektivität und Topologie).

Eine Validierung der zentralen Knoten erfolgte durch Literaturrecherche (TAIR www.arabidopsis.org, PubMed <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) und AHD (<http://ahd.cbi.pku.edu.cn/>). Die Visualisierung der gesamten Netzwerke erfolgte mit Cytoscape 2.8.3 (<http://www.cytoscape.org/>).

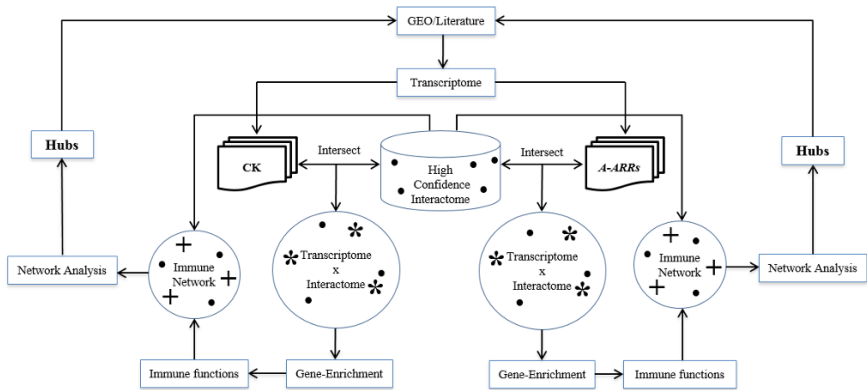


Abbildung 4: Workflow zur Transkriptom-Interaktom-Analyse.

Mapping (Intersect) der Transkriptomdaten für eine exogene *trans*-Zeatin-Applikation sowie Infektion mit *Hpa* NoCo2 (A-type ARR-Mutante) auf das *A. thaliana*-Interaktom (aus STRING-DB; 3.056 Proteine (Punkte), 18.233 Interaktionen), um ein Transkriptom x Interaktom-Netzwerk zu generieren (Sterne: Gen in Microarray/Interaktom enthalten; Punkte: Gen nur im Interaktom enthalten). Gemeinsame Gene des Microarray/Interaktom (Sterne) wurden anschließend auf ihre biologischen Funktionen mit dem Cytoscape Plugin BiNGO untersucht (Gene Enrichment). Aus diesen wurden Immunfunktionen ausgewählt und mithilfe der zugehörigen Gene dieser Funktionen (Pluszeichen) und deren resultierenden Interaktionspartnern aus dem Interaktom (Punkte) ein Immunnetzwerk (Immune Network) erstellt. Dieses wurde anschließend auf seine Topologie (Network Analysis) untersucht. Die Detektion zentraler Knoten (Hubs) erfolgte schließlich unter Verwendung verschiedener Kriterien (z.B. Konnektivität und Expression) sowie deren Validierung durch Literaturrecherche (z.B. TAIR). (Eine detailliertere Beschreibung ist dem Text zu entnehmen.) (Abb. verändert nach Naseem M, Kunz M, Ahmed N and Dandekar T: Probing the unknowns in cytokinin-mediated immune defense in Arabidopsis with systems biology approaches. Bioinformatics and Biology Insights 2014, 8:35-4, Figure 1)

2.3 DrugPoint Database

Die DrugPoint Database wurde mit dem Hintergrund erstellt, P-I zwischen einem Medikament und seinem Target untersuchen zu können (Abb. 5).

Als Grundlage wurden hierbei die Informationen aller FDA-zugelassenen Medikamente (Food and Drug Administration, <http://www.fda.gov/>) aus der DB DrugBank (Knox, Law et al. 2011) genutzt (siehe Box oben, Drug).

Anhand der Informationen der sdf-Files (mol2-Files; 3-D-Struktur des Moleküls; siehe Box links) erfolgten mithilfe von ChemAxon („cxcalc“, Version 5.5.1.0 2011, <http://www.chemaxon.com>) die Berechnungen der chemischen Eigenschaften für jedes Medikament, entsprechende Strukturen wurden aus der SMILES-Annotation (Simplified Molecular Input Line Entry Specification; chemischer Strukturcode) mittels der Software indigo-depict generiert (<http://www.ggasoftware.com/opensource/indigo/indigo-depict>). Mithilfe eines Perl-Skripts erfolgt hier zusätzlich eine Konvertierung der SMILES in einen PDB-Strukturfile (Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Alle Targetsequenzen wurden mithilfe von Perl-Skripten auf Interaktionen und orthologe Gruppen (Tatusov, Fedorova et al. 2003) hin untersucht und als Gruppe, Annotation und E-Value (Erwartungswert, dass ein identisches oder noch extremeres Ergebnis per Zufall in der DB gefunden wird) dargestellt (über COGMaster aus dem JANE-Package, Liang, Schmid et al. 2009, siehe Box Mitte) sowie über Anbindungsfunktionen zu verschiedenen Crosslinks vernetzt (siehe Box rechts; mit entsprechenden Sequenzen bzw. Begriffen kann dort sofort gesucht werden). Alle Informationen wurden in einer MySQL-Tabelle (Software phpMyAdmin) verwaltet, die Suchanfragen erfolgen hierbei mittels PHP-Skripte. Für die Gestaltung des Layouts wurden die Programmiersprachen HTML (<http://www.w3.org/html/>) und Java (<http://www.oracle.com/technetwork/java/index.html>) verwendet. Die durchgeführten Arbeiten erfolgten unter Verwendung der Betriebssysteme Windows und Linux. DrugPoint Database wird über den Webserver der Bioinformatik Uni Würzburg betrieben.

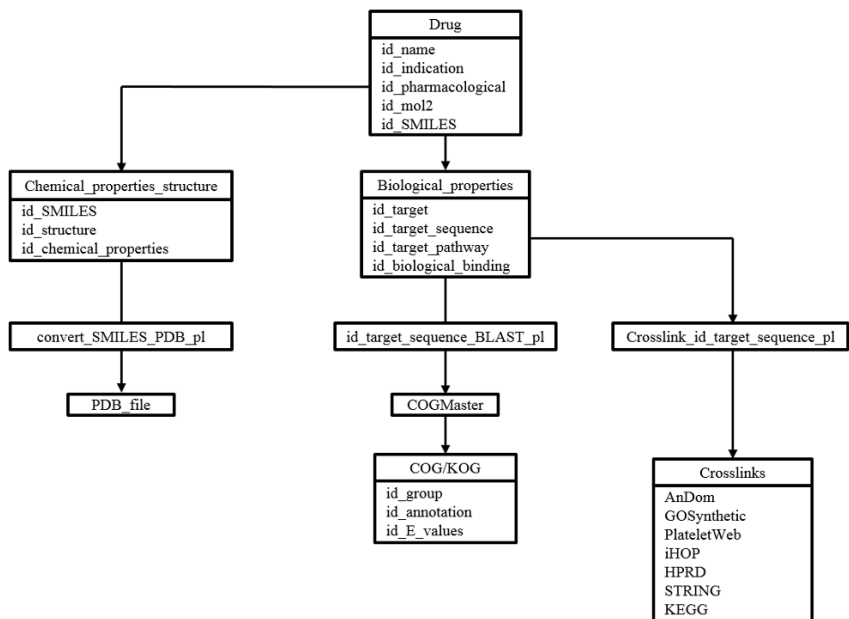


Abbildung 5: Workflow zur DrugPoint Database.

Informationen zu FDA-zugelassenen Medikamenten wurden als Grundlage für die DrugPoint Database verwendet (Box oben, Drug). An diesen erfolgten anschließend verschiedene biologische und chemische Berechnungen und Untersuchungen sowie Anbindungen zu zusätzlichen DBen (z.B. siehe Box Crosslinks), wofür zahlreiche Perl-Skripte verwendet wurden (siehe mittlere Kästchen, _pl). Die Verwaltung der Daten erfolgte über MySQL (Software phpMyAdmin), entsprechende Suchanfragen über PHP-Skripte sowie die Gestaltung des Layouts über HTML und Java.

Modellierung und Simulation von Protein-Interaktionen
am Beispiel von Wirts-Pathogen-Interaktionen

Kunz, M.

2017, XXV, 62 S. 15 Abb., Softcover

ISBN: 978-3-658-16777-6