**Guest editor comments:**

*1) Please consider proof reading of the manuscript by a metabolomics expert in order to improve weak points in descriptions and terminology (as suggested by referee 1)****.***

TODO: Rainer. Nochmal drüber lesen am Ende.

“Mögliche Änderungen im Text…”

*2) Please provide some additional results (preferably from metabolomics studies) and comparison with the performance of other software tools.*

TODO: Lars, Johannes. Johannes, du wolltest nachsehen ob es multi-level Daten gibt (nicht nur mRNA + Metabolomics).

Gibt es schon, hier ein paar Beispiele:

1. Gruden et al.: <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0028761>
   * Transcriptomics data (GSE26163)
   * Metabolomics data (Table S1)
   * Lymphozyte counts and antibody concentrations (Table S2)
2. Unterberger et al.: Metabolic programs orchestrated by the activated Ha-ras and β-catenin oncoproteins in mouse liver tumors

(Manuscript received major revisions, cross-omics data will soon be publicly available from GEO)

* + mRNA expression data (GSE51355)
  + miRNA expression data (GSE51356)
  + protein expression data (GSE51357)
  + metabolomics data (available as Excel sheet)

1. Armiour et al.: <http://jxb.oxfordjournals.org/content/63/14/5017.abstract>

(Transcriptomics, metabolomics and proteomics data was generated, but Supplement contains only deregulated molecules observed on each biological level. Maybe, the complete datasets can be obtained from the authors upon request.)

TODO Rainer: Möglicherweise ist hier auch noch möglich über die Wichtigkeit von kombinierten Analysen in der Zukunft zu sprechen insbesondere mit dem Blick auf Proteomics. Dass solche Analysen bald ausstehen werden und wir deshalb schon entwickeln wäre ja auch ein guter Grund. Die Software erst anzupassen, wenn die Daten schon da sind, wäre ja nun wirklich dämlich. Aber man kann ja nicht schon jetzt die Experimente beschreiben.

“Mögliche Änderungen im Text…”

*3) The way that data is imported could be described more eloquently.*

TODO: Lars. Über den Import werde ich noch etwas mehr schreiben. Habe da auch noch paar Bugs gefixt.

“Mögliche Änderungen im Text…”

*4) Comments from referee 2 on targeted metabolomics data should be given consideration.*

See revision notes for reviewer 2.

**Reviewer 1 comments:**

*1) Also the implementation of the metabolomics part is very simple: only differentially expressed metabolites are considered. First of all, this terminology is strange: metabolites are not espressed but formed.*

TODO: Lars. Tatsächlich verwenden wir “expressed” nur wenn da metabolites, genes and proteins steht. Ich füge halt noch „formed“ hinzu. Idiotisch aber o.k.  
TODO Johannes. Das wäre ja theoretisch auch ein Kritikpunkt für Analysen ohne Metabolomics. Wie sollten wir hier reagieren, dass es zu “einfach” ist.

Mir fällt dazu folgendes ein:

* Ich würde erst mal zustimmen, dass der Enrichment-Test relativ einfach gestrickt ist (etwa so: We agree with Reviewer 1 that the algorithm used for pathway enrichment analysis is simple in the sense that only differentially formed metabolites are considered.)
* Dann sollten wir auf Tools hinweisen, in denen kompliziertere Verfahren implementiert sind (bei Google habe ich z.B. IMPaLA, MSEA, MBRole gefunden aber noch nicht näher angeschaut). InCroMAP sollte die Möglichkeit bieten die Enrichment-Ergebnisse von ausgewählten Tools zu importieren. Für gewöhnliche Genexpressionsdaten gibt es schon eine solche „Import Enrichment“-Funktion (z.B. für DAVID oder GSEA) in InCroMAP. Diese Import-Funktion müssten wir eben noch für Metabolomics-Daten erweitern.
* Ausserdem sollten wir noch klar darauf hinweisen, dass wir in InCroMAP nicht Funktionen anderer Tools kopieren möchten, sondern stattdessen durch Import-/Export-Schnittstellen die Kompatibilität zu verwandten Tools herstellen.
* Wie besprochen denke ich es würde ausserdem Sinn machen, dass man die Grundgesamtheit (Universe) in dem hypergeometrischen Test bei Bedarf ändern kann. Als Default würde ich wie bisher die Gesamtheit aller Metabolite in KEGG-Pathways verwenden. Besonders bei Experimenten, wo nur ein kleiner Teil des Metaboloms gemessen wurde, ist es aber wahrscheinlich sinnvoller die Schnittmenge mit den gemessenen Metaboliten zu nehmen.

“Umsetzung im Text…”

*2) Secondly, which kind of metabolomics is considered here? The authors talk about pathways but if one measures in blood, then the concept of pathway is very difficult.*

TODO: Rainer. Veränderungen in Pathways sollten sich auch in Blut/Urin wiederspiegeln. Hier wäre möglicherweise ein Beispiel gut.

“Umsetzung im Text…”

*3) The authors are clearly not from the field of metabolomics (they do not mention the proper and much used tools for data (pre)m processing in metabolomics. They do not refer to existing tools or software for metabolite enrichment analysis.*

TODO: Vergleich mit existierenden Tools machen.   
TODO: Rainer/Lars. Was gibt es noch, was für die Vorprozessierung der Daten in Metabolomics verwendet wird? Wir haben R und MayDay (für Transcriptomics/Proteomics bisher) zitiert. In den Sinn käme mir noch kommerzielle Statistiksoftware.

Mit was werden sonst die Rohdaten prozessiert (mal die Software der Gerätehersteller ausgeschlossen)? Hier fällt mir noch XCMS (von Ralf Tautenhahn am Scripps) ein, welches in R läuft und wohl auch relativ bekannt ist.

“Umsetzung im Text…”

**Reviewer 2 comments:**

**Major Revisions**

*1) The multi-level integration is clearly an advantage of the proposed tool. But this could be demonstrated by a powerful application to show which new biological insights can be provided by integrating more than two levels. Since the first software version was published in 2012, are there experimental studies using this tool? This should be cited. Also unpublished collaboration work could be shortly explained.*

*Since the main purpose of the manuscript is the integration of metabolomics data, an example application from the viewpoint of metabolomics would be important.*

TODO: Johannes. Gibt es hier mögliche Kollaborationen die zitiert werden können. Ich denke man könnte hier auch Sachen nennen, die bisher keine Metabolomics Daten verwendet haben, aber es möglicherweise noch tun werden.

Es gibt im MARCAR-Projekt eine Studie, in der neben Transcriptomics-Daten (mRNA, miRNA) auch Proteomics- und Metabolomics-Daten erhoben wurden. Ich habe das Paper (Unterberger et al.) weiter oben bei den Beispielen für die Cross-Omics-Studien schon genannt. Ich selbst bin dabei Zweitautor und kann gern einen kurzen Abschnitt darüber schreiben. Die Daten sind aber leider noch nicht publiziert und der Metabolomics-Teil (nur 10 gemessene Metabolite) ist eher uninteressant.

TODO: Anwendungsbeispiel vom Blickpunkt von Metabolomics-Experimenten.

“Umsetzung im Text“

*2) How does the proposed tool outperform existing tools?*

*The authors avoid a detailed comparison with existing tools like MassTRIX and Paintomics by using the argument that those tools consider only two omics levels. Even though the proposed tool has the advantage of integrating several omics levels, typical practical applications consider only two levels, e.g., metabolomics and transcriptomics. A more detailed comparison of the proposed software tool with existing tools would therefore be necessary.*

TODO: Tabelle, die die Fähigkeiten vergleicht. Da natürlich insbesondere auf Interaktive Analyse eingehen. (Java standalone tool). Des Weiteren auf gradielle Farbdarstellung im Vergleich zu MassTRIX. Nachteil wäre die Annotation, aber ich denke hier kann man durchaus argumentieren, dass man dies ja professionellen Tools wie z.B. OpenMS/XCMS überlassen kann. Tools die für einen Vergleich in Frage kommen: (MetaMapp (O. Fiehn), MassTRIX (Philippe), Paintomics , Cytoscape)

“Umsetzung im Text“

Ich würde zusätzlich noch folgende Punkte hervorheben:

* Metabolic Overview Feature 🡪 geordnete Darstellung der Änderungen im zellulären Metabolismus (besser strukturiert als Tabelle/Barplot mit „enriched pathways“)
* Direkte Anbindung an KEGG und Nutzung von aktuellen Daten
* Integrierte Enrichment-Analyse und Visualisierung von mehr als zwei Typen von Omics-Datensätzen, die anhand derselben biologischen Proben generiert wurden

*3) The authors emphasize their strong effort in accepting and merging different kinds of gene or metabolite identifiers. But it remains unclear which of those tasks are new compared to similar software.*

TODO: Johannes: bezüglich Gene Identifier, was ist neu, bzw. was sollte man da sagen

Es gibt da schon ein paar nette Features, aber diese sind eben nicht neu seit Version 1.6:

* Automatische Erkennung von Probeset IDs (z.B. Affymetrix, Agilent, etc.) oder Gene IDs (z.B. Gene Symbols, EntrezGene, etc.) im Import-Dialog
* Mapping von Probesets auf Gensymbole (z.B. anhand von Affymetrix IDs)
* Annotation von miRNAs mit experimentell bestimmten oder vorhergesagten Target-mRNAs

TODO: Lars: bezüglich Metabolite Identifier? Mega neues gibt es da wohl nicht, ich habe nur versucht möglichst sorgfältig zu sein beim mergen der Datenbanken und immer wieder kontrolliert. Es gab ja auch eine Studie die Überlappungen gesucht hat und dann auch Strukturen verglichen hat. Ich gucke mal ob ich da was finde. Zusätzlich versuche ich noch was wegen InChIKeys zu finden.

“Umsetzung im Text“

*4) To identify pathways affected by an experiment, a "special pathway enrichment" algorithms is used, but a detailed description of how metabolomics data are included in the algorithm is missing as well as a comparison to pathway enrichment of other tools. Also, what does it mean "pathway enrichment is limited to targeted metabolomics data"? Is the visualisation in general limited to targeted data?*

TODO: Johannes: Beschreibung bzw. zitieren des Enrichment-Algorithmus. Wie funktioniert er in anderen Tools? Möglichkeit des Einbaus eines spezifischen Background-Universe für Metaboliten?

Ok, ich kümmere mich um die Beschreibung des Algos, der in InCroMAP implementiert ist. Wie das in anderen Tools gelöst ist, schaue ich mir auch an und mache einen kurzen Vergleich.

Das mit dem Universe sollten wir auf jeden Fall machen. Ich habe ja schon weiter oben beschrieben wie man es implementieren könnte. Allerdings kannst du wahrscheinlich besser abschätzen wie groß der Aufwand dafür ist.

TODO: Lars: Natürlich auch untargeted daten möglich, aber Problem der Signifikanz bei Enrichment wegen many-to-many Mappings beschreiben. Ebenso werden keine möglichen Metabolitannotationen generiert. Tools zitieren und vergleich anstreben. Zeigen, dass analyse mit many-2-many mappings noch problematisch ist.

TODO: Rainer. Gibt es noch andere Tools, die du kennst, die zur Analyse verwendet wird. Womit macht ihr z.B. eure Heatmap plots?

“Umsetzung im Text“

*5) The presented tool requires input data in form of significant values (p-value/ log fold change). This means the complete data pre-processing remains by the user. A big user friendly improvement could be done by integrating some parts of data processing or even accepting raw data as input, as partly done by other tools.*

TODO: Johannes: Ähnlich wie in früherer Publikation argumentieren, warum genau das nicht gemacht wird.

* Bis auf elementare Funktionen wie z.B. ID-Mappings für spezielle Microarray-Plattformen bietet InCroMAP keine Unterstützung bei der Datenvorverarbeitung
* Benutzerfreundlichkeit von InCroMAP wird durch weitgehend einheitliches Import-Format (p-values und fold-changes) für alle Omics-Datentypen erhöht
* Für die Vorverarbeitung gibt es je nach verwendeter Plattform verschiedene frei verfügbare Tools.
* Bei der Entwicklung von InCroMAP lag der Fokus nicht auf dem Kopieren der Funktionalität von verwandter Software, sondern auf der Implementierung neuer Features für die integrierte Analyse und Visualisierung von Cross-Omics-Daten.

“Umsetzung im Text“

**Minor Revisions**

*1) What is the meaning of the acronym InCroMAP? I could not find.*

Kurze Antwort und möglicherweise im Paper erwähnen?

“Umsetzung im Text“

*2) The title "Straightforward interpretation… " might be misleading since there is no data interpretation in the manuscript.*

TODO: Alle. Änderung des Titels? Vorschläge?

Integrated enrichment analysis and pathway-centered visualization of metabolomics, proteomics, transcriptomics and genomics data by using the InCroMAP software

“Umsetzung im Text“

*3) Figure 2B shows a pathway, but metabolite data (colored circles) seems not to be included in the visualization.*

Metabolitdaten waren nur im ersten Bild vorhanden (2A) vorhanden. Das hat möglicherweise verwirrt. Dieses Bild könnte geändert werden. Was meint ihr?

Stimmt, da der Fokus auf Metabolomics-Daten liegt, würde ich in 2B keinen Signaling-Pathway (momentan: Wnt-Signaling) zeigen, sondern besser einen metabolischen Pathway. Darin könnte man dann die Metabolite noch einfärben. Ich finde, das sollten wir auf jeden Fall noch ändern.

“Umsetzung im Text“

**Reviewer 3 comments:**

**Major Revisions**

*1) I´m missing more detailed explanations on the computation, which is important in the field of such tools. E.g. good background set for genes, proteins and metabolites are needed for calculation of enrichment and p-values. Furthermore, the authors do not explain in detail how combined enrichment works and how values are calculated.*

TODO: Johannes. Siehe Antwort zu Reviewer 2.

Wie wir mit dem Background set (Universe) umgehen, haben wir ja schon besprochen. Um die Beschreibung des „integrated enrichments“ kümmere ich mich dann noch.

“Umsetzung im Text“

*2) I would also like to know how they implemented the metabolite database for mapping between the different identifiers. This is important, because a lot of people are struggling with harmonizing different metabolomics databases*

TODO: Johannes. Siehe Antwort zu Reviewer 2.

Das hattest du doch implementiert Lars. Bei dem Kommentar von Reviewer 2 ging es nicht nur um die Metabolite IDs, sondern auch um die Gene IDs. Meine Anmerkungen dazu findest du weiter oben.

“Umsetzung im Text“

**Minor Revisions**

*1) Page4 line 2-3. Sentence "A main goal..." can be improved.*

We improved the sentence as follows: TODO (Für mich ist er relativ gut verständlich)

“The application was specifically designed to provide a high ease of use for non-bioinformaticians.“

Damit bin ich einverstanden. Statt “non-bioinformaticians” könnte man auch schreiben “experimental biologists”.