Signalverarbeitung

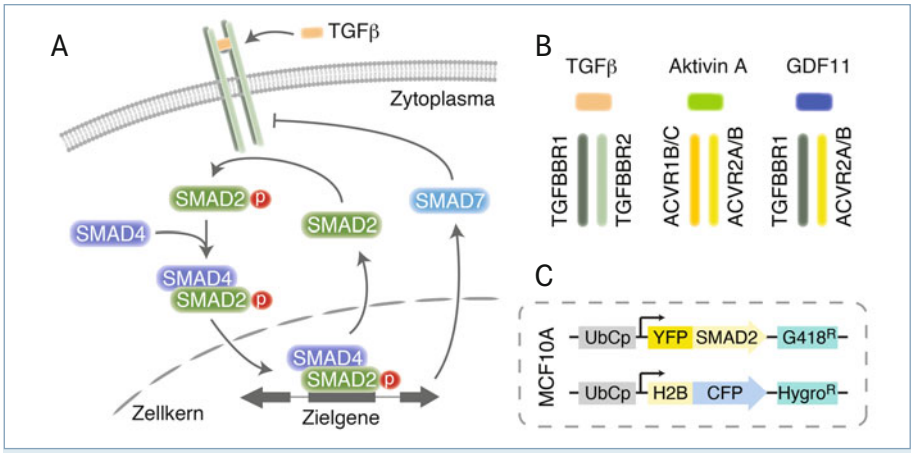
Zellen sind Individualisten – Entscheidungsprozesse auf Einzelzellebene

SONJA LENHARDT[1], LAURA HARTMANN[2], STEFAN LEGEWIE[2], ALEXANDER LOEWER[1,3]
[1] FACHBEREICH BIOLOGIE, TU DARMSTADT
[2] DEPARTMENT OF SYSTEMS BIOLOGY, INSTITUTE FOR BIOMEDICAL GENETICS (IBMG), UNIVERSITÄT STUTTGART
[3] CENTRE FOR SYNTHETIC BIOLOGY, TU DARMSTADT

Decision-making is a fundamental aspect of life. However, our understanding of how cells encode and decode information to enable reliable fate decisions remains limited. Employing live cell imaging and automated analysis, our research unveils substantial heterogeneity in the cellular response to TGFβ and sheds light on the intricate link between the dynamics of SMAD signaling, the state of individual cells and their fate decisions.

DOI: 10.1007/s12268-024-2219-5
© Die Autorinnen und Autoren 2024

■ Leben bedeutet, immer wieder Entscheidungen zu treffen. Wir Menschen stützen unsere Entscheidungen nicht nur auf äußere Einflüsse, sondern berücksichtigen auch innere Faktoren – wie vorherige Erfahrungen, gegenwärtige Stimmungen oder unsere grundlegende Motivation. Ähnlich der makroskopischen Skala treffen auch Zellen in unserem Körper ständig Entscheidungen. Während wir menschliche Handlungen oft nachempfinden können, wissen wir wenig darüber, wie individuelle Zellen externe Signale mit ihrem Zustand verknüpfen, um Entscheidungen zu treffen. In diesem Artikel diskutieren wir Entscheidungsprozesse auf Einzelzellebene und fokussieren uns dabei auf die Analyse des TGFβ-Signalwegs.



▲ **Abb. 1**: Der SMAD-Signalweg und seine Liganden. **A**, TGFβ interagiert mit Rezeptorkinasen und induziert die Phosphorylierung von SMAD2, welches daraufhin einen Komplex mit SMAD4 bildet und in den Zellkern transportiert wird. Dort reguliert der Komplex die Transkription von Zielgenen. Im Zellkern wird SMAD2 dephosphoryliert und anschließend wieder exportiert. **B**, Liganden der TGFβ-Familie binden an unterschiedliche Rezeptoren. Neben TGFβ sind dies z. B. der Wachstumsdifferenzierungsfaktor 11 (GDF11) und Aktivin A. **C**, Schema der etablierten MCF10A-Reporterzelllinie.

Signalweiterleitung am Beispiel des TGFβ-Signalwegs

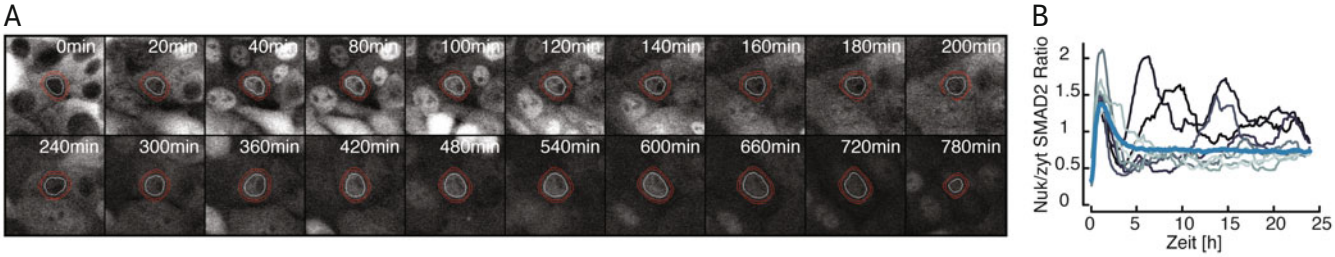
Zellen nehmen externe Informationen durch Oberflächenrezeptoren wahr und leiten diese über Signalwege an den Zellkern weiter, um die Expression wichtiger Gene und somit das zelluläre Verhalten anzupassen.

Für fast alle menschlichen Zellen ist das extrazelluläre Molekül *transforming growth factor beta* (TGFβ) eine wichtige Quelle externer Informationen (**Abb. 1A**). TGFβ spielt während der Embryogenese eine wichtige Rolle und reguliert zudem die Balance von Zellteilung und Zelltod in erwachsenem Gewebe. TGFβ ist primär wachstumshemmend und löst Zellzyklusarrest und Apoptose aus, kann aber auch die Zellmigration anstoßen und langfristig epitheliale in mesenchymale Zellen umwandeln (EMT: *epithelial-to-mesenchymal transition*). Wie genau TGFβ diese unterschiedlichen Zellantworten steuert, ist derzeit nicht bekannt; man weiß aber, dass Fehlfunktionen des Signalwegs zu Krankheiten wie Fibrosen oder Krebs führen können [1].

Auf molekularer Ebene wird das TGFβ-Signal in wenigen Schritten in den Zellkern weitergeleitet (**Abb. 1A**): Der Ligand TGFβ bindet Rezeptorkinasen (TGFβRI und TGFβRII) und initiiert so die Signaltransduktion. Daraufhin erfolgt die Phosphorylierung des Signalüberträgers SMAD2, welcher mit SMAD4 einen Komplex bildet und in den Zellkern verlagert wird. Dort reguliert der Komplex die Transkription seiner Zielgene. Im Zellkern wird SMAD2 dephosphoryliert und daraufhin wieder exportiert [1].

Dynamik und Heterogenität des TGFβ-Signalwegs

Der TGFβ/SMAD-Signalweg steuert die Aktivität zahlreicher Gene und wird seit vielen Jahren intensiv untersucht. Bisher wurde hauptsächlich das Verhalten von Zellpopulationen charakterisiert, nicht jedoch das von einzelnen Zellen. Um TGFβ-vermittelte Zellentscheidungen zu verstehen, haben wir mittels Lebendzellmikroskopie die Translokation von SMAD2 vom Zytoplasma in den



▲ **Abb. 2:** Quantifizierung von SMAD2-Dynamiken in Einzelzellen. **A**, Lebendzellmikroskopie von MCF10A-Reporterzellen nach TGFβ-Stimulation. Weiße Kreise zeigen segmentierte Zellkerne, rote Ringe fassen den quantifizierten zytoplasmatischen Bereich ein. Zu Beginn kann das Fluoreszenz-markierte SMAD2 zu einem Großteil im Zytoplasma beobachtet werden (0 min), nach Stimulation akkumuliert es im Zellkern (siehe z. B. 100 min und 480 min). **B**, Zeitaufgelöste Analyse des Verhältnisses der nukleären und zytoplasmatischen SMAD2-Menge (Nuk/zyt SMAD2 Ratio) in Einzelzellen (dünne Linien) im Vergleich zum mittleren Verhältnis in der Gesamtpopulation (dicke Linie), nach Stimulation mit 100 pM TGFβ1 (aus [2]).

Zellkern quantifiziert und Auswirkungen auf das zelluläre Verhalten bestimmt. Dazu haben wir in der nicht transformierten Brustepithelzelllinie MCF10A eine Fusion von SMAD2 mit einem gelb fluoreszierenden Protein sowie eine Fusion von Histon H2B mit einem cyan fluoreszierenden Protein als Kernmarker exprimiert (**Abb. 1C**, [2]).

Mit diesem Reporter konnten wir das dynamische Verhalten von SMAD2 in einzelnen lebenden Zellen mit hoher zeitlicher Auflösung über einen Zeitraum von 24 h beobachten. In Abwesenheit von TGFβ detektierten wir SMAD2 erwartungsgemäß hauptsächlich im Zytoplasma (**Abb. 2A**). Kurze Zeit nach Stimulation mit TGFβ akkumulierte SMAD2 im Zellkern und verlagerte sich anschließend wieder teilweise ins Zytoplasma, es blieben aber bis zum Versuchsende erhöhte nukleare SMAD2-Level nachweisbar.

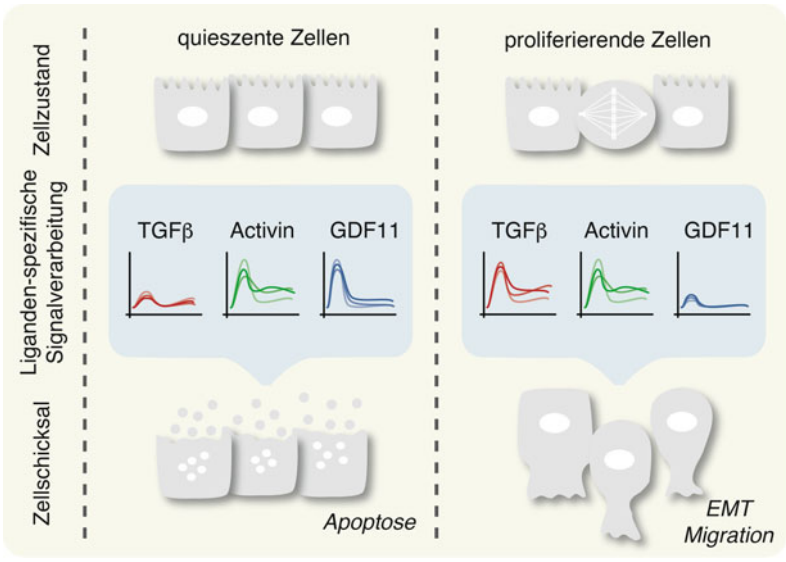
Ist dieses Verhalten repräsentativ für alle Zellen oder gibt es individuelle Unterschiede? Um die Dynamiken mehrerer hundert Zellen gleichzeitig zu quantifizieren, bestimmten wir das Verhältnis der nuklearen und zytoplasmatischen Konzentrationen (Nuk/zyt Ratio). Die Resultate zeigten eine starke Heterogenität in der Reaktion auf TGFβ. In den meisten Zellen akkumulierte SMAD2 kurz nach Stimulation im Zellkern. Längerfristig zeigten sich Unterschiede: Einige Zellen wiesen eine erneute nukleare Translokation von SMAD2 auf, während andere adaptierten und keine weitere Signalaktivität zeigten (**Abb. 2B**). Wie erwartet verhielt sich der Mittelwert aller Einzelzellmessungen ähnlich zu eigenen und zuvor publizierten Zellpopulationsmessungen (**Abb. 2B**, [2]).

Frühere Studien zeigten, dass Heterogenität im Zellverhalten auf Unterschiede im Zellzyklus, der lokalen Zelldichte sowie auf Schwankungen im Proteingehalt der beteiligten Netzwerkkomponenten zurückzuführen sein kann [3, 4]. Signifikante Beiträge der ersten beiden Faktoren konnten wir durch direkte Messungen der Zelldichte und der Zellteilung weitgehend ausschließen. Da der Einfluss variierender Proteinkonzentrationen im SMAD-Signalweg experimentell auf Einzelzellebene nicht einfach überprüfbar war, nutzten wir mathematische Modellierung zur Analyse der dritten Möglichkeit. Mit einem Differenzialgleichungsmodell konnten wir die beobachtete Heterogenität im SMAD-Signal nachbilden und so virtuelle Zellpopulationen untersuchen. Das Modell führte zu der Vorhersage, dass Schwankungen in der Expression weniger Proteine, insbesondere der Rezeptoren und Feedback-Regulatoren wie SMAD7 (**Abb. 1A**), für die Heterogenität der Zellentscheidungen verantwortlich sind. Durch gezielte Pertubationen konnte diese Vorhersage experimentell validiert werden [2].

Zellzustand bedingt Zellschicksal

Der bedeutende Einfluss einzelner Signalmoleküle führte uns zu der Frage, wie Signaldynamiken und Zellentscheidungen von verschiedenen Zellzuständen beeinflusst werden. Ein wesentlicher Unterschied im Zellzustand besteht zwischen ruhenden (quieszenten) und sich aktiv teilenden (proliferierenden) Zellen [1]. Um zu untersuchen, wie der Zellzustand die SMAD-Signalübertragung beeinflusst, wurden proliferierende und ruhende Zellen mit verschiedenen Liganden der TGFβ-Familie stimuliert, die spezifische Oberflächenrezeptoren ansteuern, jedoch in der Zelle ähnliche Mechanismen der intrazellulären Signalweiterleitung nutzen (**Abb. 1B**). Die Stärke der anfänglichen SMAD2-Reaktion variierte interessanterweise je nach Liganden und war stark vom Zellzustand beeinflusst (**Abb. 3**): Die Antwort auf TGFβ war in ruhenden Zellen abgeschwächt, gleichzeitig reagierten diese Zellen aber verstärkt auf andere Liganden wie GDF11. Die Antwort auf den Liganden Activin A war dagegen unbeeinflusst vom Zellzustand [5].

Welche Auswirkung haben diese zustandsspezifischen Signalantworten auf die zellulä-



▲ **Abb. 3:** Zellschicksale hängen vom Zellzustand und der Aktivität des Signalwegs ab, jedoch nicht von der Art des Liganden. Signalaktivität führt bei quieszenten Zellen zur Apoptose und bei proliferierenden Zellen zu Zellmigration und EMT.

re Entscheidungsfindung? Um diese Frage zu beantworten, haben wir das Verhalten lebender Zellen über einen Zeitraum von fünf Tagen verfolgt. In proliferierenden Zellen beobachteten wir einen konzentrationsbedingten Anstieg der zellulären Migration, was auf EMT hinweist. Anstelle einer erhöhten Zellmigration führten ansteigende Konzentrationen von TGFβ oder GDF11 in quieszenten Zellen zu einem proportionalen Anstieg des Zelltods (**Abb. 3**, [7]). Diese Ergebnisse legen nahe, dass der gegenwärtige Zustand das zelluläre Verhalten bestimmt: Ruhende Zellen zeigen Apoptose, während proliferierende Zellen EMT mit einhergehender Zytostase aufweisen. In beiden Fällen bewirkt eine erhöhte SMAD-Translokation eine Verstärkung der zellulären Antwort, sowohl im Vergleich zwischen den TGFβ-Liganden als auch auf Einzelzellebene.

Wie lassen sich diese liganden- und zustandsspezifischen Zellentscheidungen erklären? Grundlage für Zellentscheidungen sind Genexpressionsveränderungen. Interessanterweise zeigten unsere RNA-Sequenzierungsanalysen ähnliche Expressionsmuster zwischen Liganden und Zellzuständen, wobei das Ausmaß der Änderungen von der Stärke der SMAD-Translokation abhing. Dies betrifft Gene, die EMT auslösen, genauso wie Gene, die den Zellzyklus oder Apoptose regulieren. Aktivierung des TGFβ-Signalwegs führt also zu gleichförmigen Änderungen der Genexpression, wobei der Zellzustand entscheidet, welche Gene das Zellschicksal dominieren [5].

Ähnlich wie wir Menschen interpretieren auch Zellen externe Informationen unterschiedlich, abhängig von ihrem internen Zustand, und treffen individuelle Entscheidungen mit weitreichenden Konsequenzen für ihr Schicksal. Ein besseres Verständnis dieser Vorgänge hilft, die Folgen veränderter Signalübertragungen während der Entstehung menschlicher Krankheiten gezielter zu beeinflussen und neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln. ■

Literatur

[1] Massagué J, Sheppard D (2023) TGF-β signaling in health and disease. Cell 186: 4007–4037

[2] Strasen J, Sarma U, Jentsch M et al. (2018) Cell-specific responses to the cytokine TGFβ are determined by variability in protein levels. Mol Syst Biol 14: e7733

[3] Snijder B, Pelkmans L (2011) Origins of regulated cell-to-cell variability. Nat Rev Mol Cell Biol 12: 119–125

[4] Zieba A, Pardali K, Söderberg O et al. (2012) Intercellular Variation in Signaling through the TGF-β Pathway and Its Relation to Cell Density and Cell Cycle Phase. Mol Cell Proteomics 11: M111.013482

[5] Bohn S, Hexemer L, Huang Z (2023) State- and stimulus-specific dynamics of SMAD signaling determine fate decisions in individual cells. Proc Natl Acad Sci 120: e2210891120

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de.

Korrespondenzadresse:
Prof. Dr. Alexander Loewer
Fachbereich Biologie
Technische Universität Darmstadt
Schnittspahnstraße 13
D-64287 Darmstadt
alexander.loewer@tu-darmstadt.de

AUTORINNEN UND AUTOREN

Sonja Lenhardt
2016–2022 Studium der Biologie an der TU Darmstadt. Seit **2022** Doktorandin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Loewer.

Laura Hartmann
2015–2020 Studium der Biomedizin an der Universität Würzburg und Hochschule Mannheim. Seit **2021** Doktorandin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Legewie.

Stefan Legewie
1998–2008 Studium der Biochemie und Promotion in Biophysik. **2009–2020** Gruppenleiter am Deutschen Krebsforschungszentrum, Heidelberg und Institut für Molekulare Biologie, Mainz. Seit **2020** Professor für Systembiologie, Universität Stuttgart.

Alexander Loewer
1996–2005 Studium der Biologie an der Universität Heidelberg und Promotion in Molekular- und Zellbiologie. **2005–2011** PostDoc an der Harvard Medical School, Boston, MA, USA. **2011–2015** Gruppenleiter am Max-Delbrück-Zentrum Berlin-Buch. Seit **2015** Professor an der TU Darmstadt.

Hier steht
eine Anzeige.

Springer