Universiteit
Leiden
The Netherlands

Unravelling cell fate decisions through single cell methods and mathematical models

Mircea, M.

Citation

Mircea, M. (2022, December 20). *Unravelling cell fate decisions through single cell methods and mathematical models*. *Casimir PhD Series*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/3505763

Version:	Publisher's Version
License:	Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden
Downloaded from:	https://hdl.handle.net/1887/3505763

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Zusammenfassung

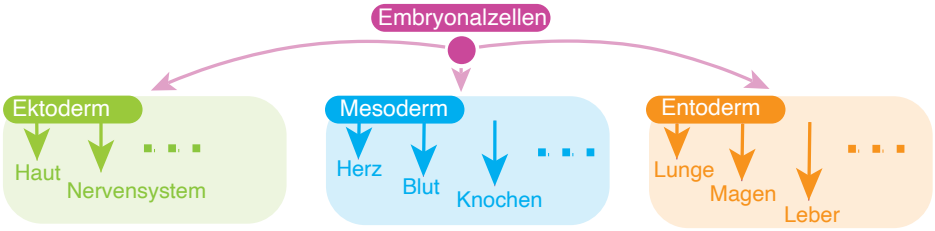

Abbildung 6.9: Die drei Zelltypen, die während der Gastrulation entstehen.

Embryonalzellen:
Zellen des Embryos, die das Potenzial haben, sich zu einer beliebigen Zelle des Körpers zu entwickeln.
Gastrulation:
Der Punkt, an dem drei wichtige Zelltypen entstehen: Entoderm, Mesoderm und Ektoderm.

Das menschliche Leben beginnt mit einer einzigen befruchteten Eizelle, die sich zu etwa 30 Billionen Zellen entwickelt, aus denen unser Körper besteht. Die Eizelle ist zu Beginn nur eine einzige Zelle mit dem Potenzial, sich zu teilen und ihr Aussehen, ihre Funktion und ihre Zusammensetzung zu verändern. Diese Veränderungen sind notwendig, um sich zu einem vollständigen Menschen zu entwickeln, wobei sich die Zellen des Herzens stark von den Zellen der Lunge oder des Gehirns unterscheiden. Man schätzt, dass es in unserem Körper etwa 200 verschiedene Zelltypen gibt. Zellen in einem frühen Stadium nach der Befruchtung haben noch das Potenzial, sich zu jeder Zelle des Körpers zu entwickeln, und wir bezeichnen sie als **embryonale Zellen**. Der Weg von der embryonalen Zelle zu einer voll spezialisierten Zelle enthält viele Zwischenstufen. Wir können uns diesen Weg als unseren Weg zur Berufsfindung vorstellen. Als Kind können wir noch alles werden, was wir wollen, aber während der Schul- und Universitätszeit treffen wir Entscheidungen, die unser Spezialisierungsfeld weiter eingrenzen. Mit jeder Entscheidung, die wir treffen, kommen wir einem Fachgebiet einen Schritt näher, und gleichzeitig wird es unwahrscheinlicher, den Berufsweg zu wechseln. Eines der ersten und wichtigsten Entscheidungsereignisse in der Entwicklung ist zum Beispiel die **Gastrulation** (siehe Abb. 6.9). Zu diesem Zeitpunkt entstehen drei verschiedene Zelltypen aus den embryonalen Zellen. Dies ist vergleichbar mit der Wahl eines Universitätsstudiums. Diese Wahl wird in den meisten Fällen den Rest unseres Lebens beeinflussen. Zu diesem Zeitpunkt kann die Zelle zwischen einem der drei Zelltypen wählen: Entoderm, Mesoderm und Ektoderm. Diese Wahl schränkt die künftige Berufswahl ein: Mesoderm wird zum Beispiel das Herz, die Blutzellen oder das Knochengewebe; Ektoderm wird das Nervensystem oder die Haut; Entoderm wird die Leber, der Magen oder die Lunge. In dieser Zusammenfassung möchte ich Sie weiter durch die Reise der embryonalen Zelle begleiten.

Informationsfluss in einer Zelle:
DNS → RNS → Protein

Um wirklich zu verstehen, wie eine einzelne Zelle Entscheidungen trifft, um zu einem spezialisierten Zelltyp zu werden, müssen wir in das Innere der Zelle schauen. Wir

müssen herausfinden, wo diese Information gespeichert ist und wie sie verwendet wird. Jede Zelle in unserem Körper enthält dieselbe DNS, die während der gesamten Lebenszeit der Zelle erhalten bleibt. Sie enthält Informationen über die Bausteine unseres Körpers. Genauer gesagt besteht sie aus vielen Genen, die in der DNS kodiert sind. Jedes Gen enthält unterschiedliche Informationen, zum Beispiel über die Augenfarbe, Haarfarbe oder Körpergröße. Sie enthält auch Gene, die Zelltypen bestimmen. Für jeden Zelltyp müssen also unterschiedliche Gene aktiv werden. Dazu werden die Informationen, die die Zelle gerade braucht, von der DNS an die RNS weitergegeben. Jede Zelle in unserem Körper hat unterschiedliche RNS-Moleküle. Die letzte Informationsübertragung ist dann die von der RNS zum Protein. Man geht davon aus, dass die DNS etwa 20.000 Gene enthält, die für ein Protein kodieren, und unsere Zellen können bis zu 500.000 verschiedene Proteine haben. Proteine sind die wichtigsten Bestandteile der Zelle, weil sie eine Vielzahl von Funktionen haben. Proteine sind wie die Angestellten in einem Unternehmen, jeder von ihnen hat eine andere Aufgabe, und damit das Unternehmen funktioniert, muss jeder seine Aufgabe erfüllen. Wir können uns das Innere einer embryonalen Zelle in der Entwicklung wie ein Start-up-Unternehmen vorstellen. Es muss viele Änderungen an seiner Struktur und seinen Mitarbeitern vornehmen, bis es zu einem etablierten Unternehmen wird. Mit Hilfe aller Mitarbeiter des Unternehmens wird das Unternehmen am Ende eine Entscheidung für die nächste Phase treffen. Eine Art von Protein, das in diesem Zusammenhang wichtig ist, heißt **Transkriptionsfaktor** (TF). Die TF entscheiden, welche Gene in einer Zelle aktiv werden und welche ungenutzt bleiben. Sie kontrollieren die Proteinzusammensetzung in der Zelle und können als die Manager in einem Unternehmen angesehen werden. Sie können die Mitarbeiter des Unternehmens einstellen und entlassen. TF, die eine große Anzahl von Genen kontrollieren können, werden als "Master-TF" bezeichnet und wären somit die Direktoren des Unternehmens. Insbesondere die Master-TF verleihen der Zelle oft ihre Identität, was bedeutet, dass in verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Gruppen von Master-TF im Spiel sind. So hat jedes Unternehmen seine eigene Gruppe von Direktoren, die gemeinsam über die Marke des Unternehmens entscheiden. Die TF können sich auch gegenseitig kontrollieren und parallel arbeiten. Auf diese Weise bilden sie ein Netzwerk, das als **Genregulationsnetzwerk** bezeichnet wird. In diesem Szenario können Sie sich vorstellen, dass die Geschäftsleitung sich selbst einstellen oder umstrukturieren muss. Wenn sich mehrere Direktoren um eine Position streiten, kann die Direktorengruppe, die den Zuschlag erhält, die neue Unternehmensmarke bestimmen.

Um zu wissen, welche Proteine in der Zelle aktiv sind, müssen sie gemessen werden. Am liebsten würden wir alle Proteine in einer Zelle messen, um genau zu verstehen, was vor sich geht, aber das ist noch nicht möglich. Was jedoch möglich ist, ist die Messung der RNS-Moleküle in einer einzelnen Zelle mit einer Methode, die als **single-cell RNA sequencing** (scRNA-seq) bezeichnet wird. Der größte Datensatz, der bisher mit dieser Methode erzeugt wurde, umfasste 1,3 Millionen Gehirnzellen. Da Proteine aus RNS hergestellt werden, können wir die Anzahl der Proteine in einer Zelle schätzen, indem wir die Anzahl der RNS messen. scRNA-seq hat beispiellose Einblicke in die Definition eines Zelltyps und die

Transkriptionsfaktoren:
Ein Protein, das die Aktivität einiger Gene steuern kann.
master TF:
TF, die die Aktivität vieler Gene steuern können.
Genregulationsnetzwerk:
Ein Netzwerk von Proteinen, die sich gegenseitig aktivieren und unterdrücken.
single cell RNA sequencing:
Eine Methode zur Messung der gesamten RNA in jeder einzelnen Zelle.

Entwicklung einer embryonalen Zelle gegeben. Zelltypen werden nun auf der Grundlage der Anzahl der RNS definiert, und viele neue Zelltypen wurden in den letzten Jahrzehnten auf diese Weise entdeckt.

Kapitel 1 dieser Arbeit gibt einen genaueren Überblick über die Zellidentität und erklärt die Veränderungen, die während der Entwicklung einer Zelle auftreten. Es werden zahlreiche Einzelzelltechniken vorgestellt, die derzeit zur Messung von DNS, RNS, Proteinen und chemischen Veränderungen in jeder einzelnen Zelle verwendet werden. Schließlich werden mathematische Modelle für die Zellentwicklung vorgestellt, die dabei helfen die Mechanismen und kausalen Beziehungen zwischen Genen besser zu verstehen.

Kapitel 2 leitet eine Methode namens phiclust her, um die Reinheit eines Zelltyps in scRNA-seq-Daten zu bewerten. Da wir alle RNS-Moleküle in einer Zelle messen können, ist es wichtig zu bewerten, wann zwei Zellen vom gleichen Typ sind. Jede Zelle hat aufgrund von zufälligen Fluktuationen und Prozessen, die nichts mit der Zellidentität zu tun haben, unterschiedliche RNS-Moleküle. Mit unserer neuen Methode lässt sich feststellen, ob die Unterschiede in den RNS-Molekülen zwischen den Zellen von zufälligen Fluktuationen abweichen. Wenn die Unterschiede größer sind, handelt es sich um unterschiedliche Zelltypen. Wir haben phiclust auf scRNA-seq-Daten einer sich entwickelnden Niere angewendet und dabei bisher übersehene Zelltypen entdeckt. Auf diese Weise kann phiclust helfen, die vielen Zelltypen in unserem Körper zu klassifizieren und zu identifizieren.

in vivo:
Ein Prozess, bei dem sich Zellen in ihrem natürlichen biologischen Kontext befinden.
in vitro:
Ein Prozess, bei dem sich Zellen außerhalb ihres biologischen Kontextes in einer Schale befinden.
induzierte pluripotente Stammzellen: Ausgereifte Zellen, die in Stammzellen umgewandelt werden.

Während der Entwicklung werden die Zellen von vielen Faktoren beeinflusst, die die Entscheidung der Zellen verändern können. So wie bei uns, wenn wir uns für einen beruflichen Weg entscheiden, spielt es eine Rolle, welchen Umwelteinflüssen wir ausgesetzt waren. Das Gleiche gilt für Zellen: Ihre Entscheidung hängt von den Entscheidungen der anderen Zellen in ihrer Umgebung ab. Eine embryonale Zelle befindet sich normal im Mutterleib. Das Studium von Zellen im natürlichen Kontext wird als **in vivo** bezeichnet. Aus ethischen Gründen ist es nicht möglich, die menschliche Entwicklung in vivo zu untersuchen. Außerdem laufen in vivo viele Prozesse gleichzeitig ab, die wir nicht kontrollieren können und deren Einfluss wir auch nicht kennen. Daher haben wir beschlossen, uns mit **In-vitro-Systemen** zu befassen. In vitro bezieht sich auf Studien außerhalb des normalen biologischen Kontextes in einer kontrollierten Laborumgebung. Um embryonale Zellen außerhalb des Körpers zu untersuchen, müssen sie entnommen und in einer Schale kultiviert werden. Sobald sie in vitro stabil sind, nennen wir sie embryonale Stammzellen. Embryonale Stammzellen haben immer noch das Potenzial, sich in jeden Zelltyp des Körpers zu verwandeln, sind aber aus ihrer ursprünglichen Umgebung herausgelöst worden. Auch aus ethischen Gründen verwenden Biologen häufig **induzierte pluripotente Stammzellen** (iPSCs). Diese Zellen werden aus reifen Zellen des Körpers, z.B. der Haut, entnommen. Dann werden sie zu stammzellenartigen Zellen zurückverwandelt und erhalten wieder das Potenzial, sich in jeden Zelltyp des Körpers zu verwandeln. Zusammengefasst: *Embryonale Zellen in vivo sind embryonale Stammzellen in vitro.*

Kapitel 3 untersucht den Einfluss des Master-TF ETV2 in Blutgefäßzellen in vitro. Zellen, die die Gefäße in unserem Körper bilden, werden als Endothelzellen bezeichnet. Ihre Aufgabe besteht im Allgemeinen darin, eine Barriere zwischen einer Flüssigkeit, z.B. Blut, und dem umgebenden Gewebe zu bilden. Insbesondere die blutgefäßbildenden **Endothelzellen** sind wichtig für das reibungslose Funktionieren des Herzens. Um den Entscheidungsprozess einer Endothelzelle zu verstehen, wurden iPSCs in eine Schale gegeben und durch bestimmte chemische Reize dazu angeregt, Endothelzellen zu werden. Wie oben beschrieben, gibt es jedoch Zwischenstufen auf der Reise der embryonalen Zelle, die in vitro beachtet werden müssen. In Anlehnung an die Metapher des Karrierewegs bedeutet dies, dass sie zunächst einen der drei grundlegenden Karrierewege wählen muss, die Zellen haben. Für eine Endothelzelle ist dies das Mesoderm. Um ein Blutgefäß zu werden, muss sie sich, wie im Masterstudium, auf das Herzmesoderm spezialisieren. Nach ihrem Masterstudium kann sie nun den Beruf einer Endothelzelle wählen. Überraschenderweise haben wir festgestellt, dass bei den Experimenten zwei Zelltypen entstehen: Endothelzellen und Herzmuskelzellen, die für die Kontraktionen im Herzen verantwortlich sind. Das bedeutet, dass die Zellen nach den Masterstudien immer noch zwischen zwei verschiedenen Aufgaben wählen können. Mithilfe von scRNA-seq konnten wir zeigen, dass die Entscheidung von dem Master-TF ETV2 abhängt. Wenn weniger ETV2 vorhanden ist, werden die iPSCs zu Herzmuskelzellen, wenn mehr ETV2 vorhanden ist, werden sie zu Endothelzellen. Hier können wir sehen, wie wichtig Master-TF für die Entscheidung der Zelle sind. Als Master-TF ist ETV2 in der Lage, die Aktivität anderer Gene zu steuern. Wenn also genügend ETV2 in der Zelle vorhanden ist, aktiviert es Gene, die für die Identität der Endothelzelle verantwortlich sind, und verleiht der Zelle auf diese Weise ein neues Image. Nach dem Markenwechsel wird ETV2 nicht mehr benötigt und wird aus seiner Position als Direktor entlassen. Dies ist ein Beispiel für ein genregulatorisches Netzwerk und wie es sich verändert, wenn die Zelle Entscheidungen trifft.

endotheliale Zellen:
Zellen, die Gefäße im Körper bilden.
Liganden:
Proteine, die von Zellen zur Kommunikation verwendet werden.

Wie bereits erwähnt, können Umweltfaktoren die Entscheidung einer Zelle beeinflussen. Dies geschieht unter anderem durch die Kommunikation untereinander. Zellen kommunizieren zum Beispiel über bestimmte Proteine, die **Liganden** genannt werden. Diese Art von Protein hat die Fähigkeit, die Zelle zu verlassen und zur nächsten Zelle zu wandern. Sobald es in einer anderen Zelle ankommt, verändert es das Genregulationsnetzwerk der empfangenden Zelle. Mit anderen Worten: Dieses Nachrichtenprotein kann die Entscheidungen der Manager eines anderen Unternehmens beeinflussen. In der ersten Hälfte dieser Arbeit lag der Schwerpunkt auf den Veränderungen in der internen Zusammensetzung der Zellen. In der zweiten Hälfte werden wir dies erweitern, indem wir den Einfluss der zellulären Kommunikation auf die Zusammensetzung der Zelle untersuchen. Wir werden in vitro kombinierte Zelltypen untersuchen, die in vivo natürlich zusammen vorkommen, um zu verstehen, wie sie sich gegenseitig beeinflussen.

Kapitel 4 vergleicht den Einfluss des Entwicklungsursprungs auf die zelluläre Kommunikation in Endothelzellen. Dieses Kapitel ist eine Fortsetzung von *Kapitel 3*, wo Herzmuskel- und Endothelzellen abgeleitet wurden. In vivo besteht das menschliche Herz aus mehreren Zelltypen, darunter Herzmuskelzellen, Blutgefäßzellen (Endothelzellen) und Bindegewebe.

Daher wurden diese drei Zelltypen in einer Schale in vitro zusammengebracht, um eine Herzgewebeumgebung zu schaffen. Endothelzellen bilden jedoch nicht nur Blutgefäße, sondern können zum Beispiel auch Lymphgefäße bilden, die Lymphe statt Blut im Körper transportieren. Wir wollten verstehen, wie Endothelzellen entscheiden, welche Art von Gefäß sie bilden: Werden sie entweder durch die Kommunikation mit benachbarten Zellen oder durch die Entwicklungsherkunft der Zelle (frühere Berufswahl) beeinflusst? Aus diesem Grund wurde ein zweites Experiment durchgeführt, bei dem sich die Endothelzellen in ihren Masterstudien auf das **paraxial** Mesoderm statt auf das kardiale Mesoderm spezialisierten. Endothelzellen, die aus dem paraxialen Mesoderm stammen, bilden normalerweise eher Lymphgefäße als Blutgefäße. Anschließend wurden beide Endothelzellen, unabhängig von ihrem Hintergrund, in dieselbe Herzgewebeumgebung gebracht. Mittels scRNA-seq konnten wir feststellen, dass die RNS-Profile beider Endothelzellen nach der Integration in die Herzgewebeumgebung sehr ähnlich waren. Dieses Ergebnis zeigt, dass die zelluläre Kommunikation für Endothelzellen wichtiger ist als der Entwicklungshintergrund. Es zeigt auch allgemein, dass Umwelteinflüsse einen großen Einfluss auf die Entscheidungen von Zellen haben.

paraxial:
Zellen, die entlang einer Achse liegen.
extraembryonale Endodermzellen:
Zellen, die die Außenseite des Embryos umgeben.

In einem zweiten Beispiel in *Kapitel 5* zeigen wir, wie zelluläre Kommunikation die Bildung eines Neuralrohrs in vitro verursachen kann. Wir untersuchten die zelluläre Kommunikation in einem bekannten In-vitro-Modellsystem, den Gastruloiden. Dieses System ist ein Modell für die Gastrulation, die der Moment der Wahl zwischen den drei universitären Studien der Zelle ist (siehe Abb. 6.9): Entoderm, Ektoderm und Mesoderm. Wir haben embryonale Stammzellen der Maus verwendet, um dieses wichtige Entscheidungsereignis zu reproduzieren. Die embryonalen Stammzellen sind in der Lage, alle drei Zelltypen in einer Schale selbst zu bilden. Aus In-vivo-Studien wissen wir jedoch, dass der Embryo von einer Schicht von Zellen umgeben ist, die als **extraembryonale Entodermzellen** (XEN) bezeichnet werden. Als embryonale Stammzellen in vitro mit XEN-Zellen kombiniert wurden, bildeten die XEN-Zellen eine äußere Schicht um die Stammzellen, genau wie in vivo. Noch auffälliger war, dass die Stammzellen anfingen, Strukturen zu bilden, die wie eine Röhre aussahen. Diese Strukturen sind ohne die Zugabe von XEN-Zellen nicht beobachtet worden. Sie müssen also ein direktes Ergebnis der Kommunikation zwischen den beiden Zelltypen sein. Mit scRNA-seq und Bildgebung haben wir diese Strukturen charakterisiert. Wir fanden heraus, dass sie sich aus dem Ektoderm entwickeln, das für die Bildung des Nervensystems verantwortlich ist. Diese Ergebnisse deuten auf die Beteiligung von XEN-Zellen an der Bildung von Neuralrohr-ähnlichen Strukturen hin. Darüber hinaus haben wir festgestellt, dass auch die embryonalen Stammzellen der Maus Veränderungen in der RNS der XEN-Zellen verursachen. Dieses Experiment zeigt, dass die Kommunikation zwischen den Zellen bereits in den frühen Stadien des Weges einer Zelle sehr wichtig ist.

In den vorangegangenen Kapiteln haben wir Elemente, die an den Entscheidungen einer Zelle beteiligt sind, mit scRNA-seq und Bildgebung charakterisiert. Um jedoch die kausalen Beziehungen in einem genregulatorischen Netzwerk zu verstehen, müssen wir mathe-

matische Modelle formulieren. Deshalb haben wir uns vorgenommen, diese Daten zu nutzen, um mathematische Gleichungen über Geninteraktionen während der Entwicklung in *Kapitel 6* aufzustellen. Diese Gleichungen beschreiben die zeitliche Entwicklung jedes Gens im Genregulationsnetzwerk und werden als **dynamische Systeme** bezeichnet. In einem dynamischen System bestimmen die Parameter die Stärke der Wechselwirkungen zwischen Genen oder Molekülen. Wir haben physikinformierte tiefe neuronale Netze (PINN) eingesetzt, um diese Parameter anhand von Messdaten zu bestimmen. Ein neuronales Netz ist eine Technik des maschinellen Lernens, die normalerweise erfolgreich zur Mustererkennung eingesetzt wird. Die PINN kombinieren maschinelles Lernen mit physikalischen Gesetzen. Auf diese Weise können wir Muster aus den Daten lernen und dabei vordefinierte mathematische Gleichungen einhalten. Wir haben zwei relevante experimentelle Szenarien untersucht: Eines, in dem Zellen kommunizieren und Messungen von einzelnen Zellen verfügbar sind. Diese Daten können z. B. durch die Abbildung von Proteinen im Zeitverlauf gewonnen werden. In dem anderen Szenario kommunizieren die Zellen nicht, und es sind nur Momentaufnahmen möglich. Dieses Modell könnte dann z.B. scRNA-seq-Messungen einbeziehen. Diese Analyse bietet einen Ausgangspunkt für die Gewinnung mechanistischer Erkenntnisse über die Entwicklung einer embryonalen Zelle durch die Nutzung verschiedener Datensätze.

dynamische Systeme: Gleichungen, die sich im Laufe der Zeit weiterentwickeln.

Ich hoffe, diese Zusammenfassung hat Ihnen einen Einblick in die sehr komplexe Reise einer embryonalen Zelle gegeben. Wir haben gezeigt, wie die Zellidentität auf der Grundlage von scRNA-seq-Daten definiert werden kann, und haben uns den Einfluss von Master-TF genauer angesehen. Dann fügten wir den Experimenten die zelluläre Kommunikation hinzu und stellten fest, dass sie den Entwicklungsweg einer Zelle entscheidend beeinflusst. Schließlich wollten wir all diese Informationen in einem mathematischen Modell zusammenfassen, das es uns ermöglicht, die Mechanismen zu verstehen, die an den Entscheidungen der Zelle beteiligt sind. Es gibt noch viel zu erforschen, bevor wir vollständig verstehen können, wie eine Zelle ihre Entscheidungen trifft.
Möge die embryonale Zelle immer die richtige Entscheidung treffen!