

digital and analogue data processing in the p53 signalling pathway

Using fluorescent reporters to track a tumour suppressor

by Alexander Loewer

The cells in our bodies have the intriguing capacity to react flexibly to changes. They do this by detecting signals from the environment, linking them to information about their internal state and triggering the appropriate response. This cellular signal processing is mediated by complex molecular networks with hundreds of individual components. The major nodes and edges of these networks have been identified by now. But how do they function in living cells? How are signals encoded, processed and decoded again? How do cells distinguish significant signals and unavoidable background noise? These questions hold the key for making selective manipulations of cell behaviour possible, a basic prerequisite for developing effective therapies.

Cells react to external and internal stress signals

Stress is a permanent feature of life. In our everyday lives, we constantly strive to strike a balance between the conflicting priorities of work, family and leisure. Similarly, the cells in our bodies have to defend the integrity of their molecular components from stress that both assails them from the environment and is a consequence of processes essential to life. In order to understand the basic principles of dynamic signal processing, we study the cellular response to stress. For example, solar radiation damages the genetic make-up of our skin cells, while harmful radicals are created by the production of energy during cellular respiration. Our cells have to detect this stress and initiate appropriate countermeasures. It usually suffices to stop growth while the damage is repaired to prevent it from being passed on when cells divide. Only in extreme circumstances, the programmed death of the cell is triggered in order to eliminate irreparably damaged cells for the overall good of the organism. If these mechanisms are disturbed, or if they fail because of mutations, cancer may arise.

The p53 protein is a central component of the cellular response to stress. It belongs to the category of tumour suppressors

whose deactivation is the first step on the way to cancer. Thus, in more than half of all human tumours, p53 has been deactivated by mutation. In the cell, p53 is regulated by a complex network of molecular interactions. The blueprint of this network was deciphered through many elegant molecular and cell biology studies (for an overview see: Kruse and Gu, 2009). This enables us to now investigate dynamic signal processing in the p53 network at the molecular level.

Time-resolved microscopy in living cells

Although all of our cells have the same genetic makeup, they often react differently to identical stress signals. On one hand, this is the consequence of fluctuations in molecular processes, which determine the precise conditions in individual cells at any given moment. On the other hand, cells are also influenced by their immediate environment, for example by the number of neighbouring cells.

Because of this heterogeneity, measurements of dynamic processes that capture a cell population as a whole render only a distorted picture of the actual behaviour of a single cell (Loewer and Lahav, 2011). In order to understand the dynamics of signal processing, it is essential to study the underlying processes at the level of individual cells. This calls for a technique that generates quantitative data with high temporal and spatial resolution. Time-resolved fluorescence microscopy can provide just that and enable the visualisation of molecular processes in living cells. The basic ingredients are fluorescent reporter proteins that can be fused with any gene product and then be transferred into cells. The intensity of these fluorescent reporters enables one to draw conclusions about the behaviour of the fusion partners studied. Various fluorescent proteins with defined colour spectrums are now available making it feasible to track multiple cellular processes in parallel. This in turn can provide information about both the interaction between different components of a particular signalling pathway and the interactions between signalling pathways themselves.



Alexander Loewer (Photo: David Ausserhofer/MDC).

In order to study signal processing within the p53 network in living cells, we produced fluorescent reporters for selected components of this signalling pathway. Combined with automatic microscopy, they allow tracking the cellular response to stress in real-time for several days. The imaging data generated is then computationally analysed and quantified. As it is hard to understand the dynamics of complex networks intuitively, we combine quantitative experimental data with mathematical models of the molecular interactions.

Digital and analogue signal processing in the p53 network

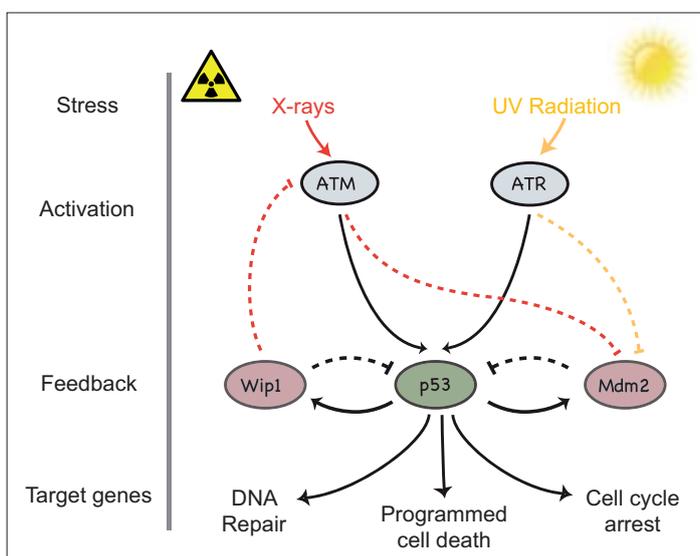
Using this approach, we investigated how information on cellular stress is encoded and processed in the p53 network. For example, when X-rays cause breaks in the DNA, special sensors are activated that stabilise the p53 protein. Normally, p53 is very short-lived. However, when stabilised during the stress response it accumulates in the nucleus and activates numerous target genes, which are involved in DNA repair, controlling cell division and inducing programmed cell death (Fig. 1). The par-

ticular set of genes activated by p53 will determine the cellular response to stress.

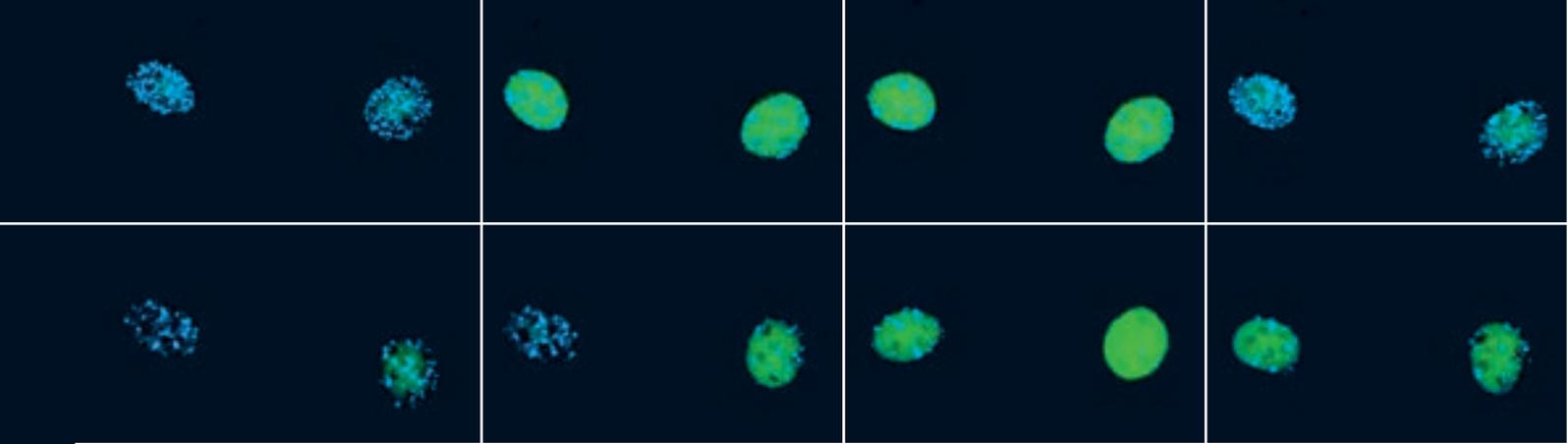
The target genes also include negative regulators of p53. These ensure that p53 is degraded again and that the response to stress is deactivated at the appropriate time. Such feedback loops are widespread regulatory mechanisms, not only in biology but also in engineering. They have a major impact on the dynamic behaviour of a system and can thus control its function. In the case of p53 they uniform pulses of p53 accumulation in response X-ray-induced breaks in DNA (Fig. 2). Surprisingly, neither the amplitude nor the duration of these pulses changes with the extent of the damage. Only the number of pulses provides information about the damage that has occurred. In this respect, p53 behaves as a digital system (Lahav *et al.*, 2004).

However, the network is flexible enough to encode information in more than one way. If a cell is hit by UV radiation, no DNA breaks in DNA, but defects in individual nucleotides. This damage also activates the p53 network, but it triggers pulses of

Figure 1: Diagram of the p53 signalling pathway



The tumour suppressor p53 is activated when a cell encounters stress, e.g. X-rays or UV radiation. The stress is detected by sensors that activate specific enzymes (ATM or ATR). These enzymes modify the p53 protein and stabilise it. p53 then activates its target genes that mediate the stress response. This involves arresting growth and repairing the damage, but also programmed cell death. Among the target genes are negative regulators of p53 (Mdm2 and Wip1) that ensure that p53 is deactivated again. Every stress activates specific network connections (red or orange arrows), which allows the signals to be encoded in different – digital or analogue – ways (Source: A. Loewer, MDC).



Time-resolved fluorescence microscopy enables visualising and quantifying dynamic processes in living cells. In this way, DNA damage and the cellular stress response can be studied in the same individual cell (Image: Alexander Loewer, MDC).

p53 accumulations with amplitudes and durations proportional to the degree of damage (Fig. 2). Therefore, p53 behaves like an analogue system in this case, where a stronger input signal leads to a stronger and more enduring output signal (Batchelor *et al.*, 2011).

The difference between the two encoding modes can be ascribed to a few subtle changes in the network circuitry (Fig. 1). This allows the same molecular network to encode signals in various ways.

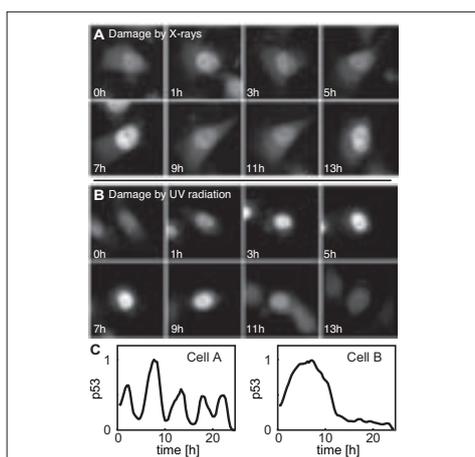
A molecular noise filter

While p53 has to react with high sensitivity to any damage that might lead to a mutation, it also needs a certain level of tolerance to naturally occurring damage in the cell, such as the damage caused by replication of the genome during cell growth. To understand how the p53 network differentiates between intrinsic damage of this kind and serious, externally induced damage, we observed cells during normal undisturbed growth. To our surprise, we repeatedly detected pulses of p53 even in apparently undamaged cells (Loewer *et al.*, 2010). These spontaneous p53 pulses have the same characteristics as those triggered by X-rays, but do not occur with the same regularity. More precise analyses showed that the pulses are not random, but occur during certain phases of the cell cycle. It is known that transient

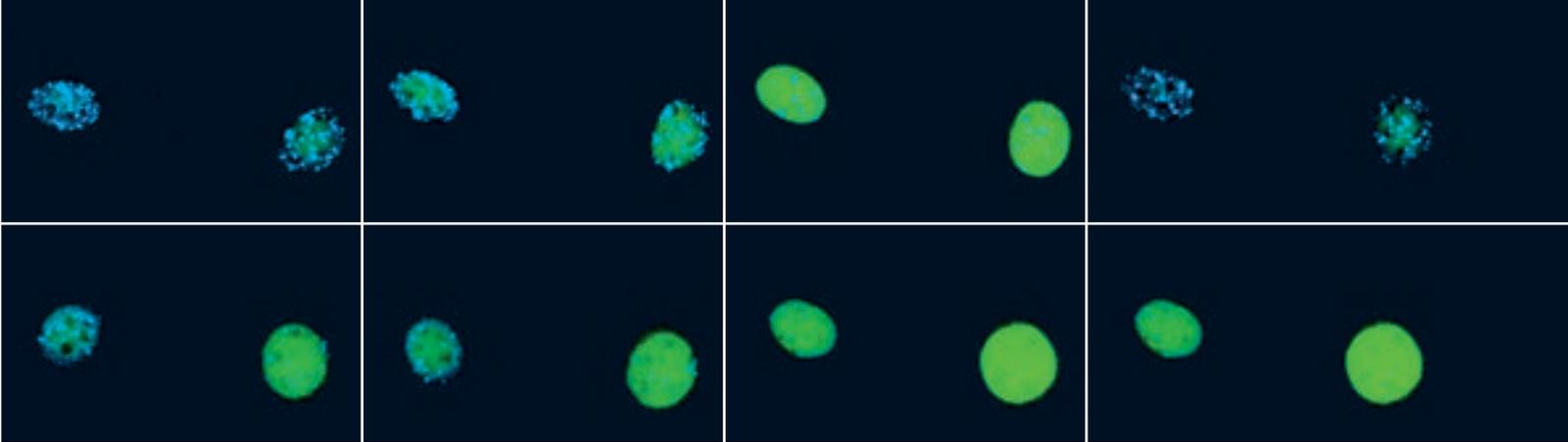
damage to the genetic material occurs during these phases. p53 reacts to this transient insults like an all-or-nothing signal and accumulates in a similar way as in response to severe damage. However, in contrast to lasting damage to the genetic material by external stressors, the transient damage did not trigger a full stress response, which would limit growth or even induce programmed cell death. In order to understand how spontaneous and regular p53 pulses differ at the molecular level, we used reporter cells to track the dynamics of p53 and the activity of a target gene in parallel (Fig. 3). As expected, p53 pulses after irradiation of the cells led to activation of the target gene, while similar pulses had no effect during normal cell growth. We were able to show that this difference is achieved by means of a filter in the p53 network (Loewer *et al.*, 2010).

This filter consists of certain modifications of p53 that are necessary for the transcriptional activation of target genes. While accumulation of p53 protein is triggered by the slightest stimulus, these activating modifications require constant input from the stress sensors. The combination of these two mechanisms, switch-like stimulation and subsequent filtering, enables the p53 network to react very precisely to externally induced damage to the genetic material and to distinguish it from the constant background noises caused by physiological processes.

Figure 2: The p53 response in living cells



Human breast cancer cells were stressed by different radiation, which produced either double-strand breaks in DNA (A) or damage to individual bases (B). The cells express a fluorescent reporter for p53, which enables following the dynamics of this protein in real-time under the microscope. Automated image analysis allows tracking individual cells and quantifying the intensity of fluorescence (C). Double-strand breaks in DNA trigger uniform pulses of p53 accumulation (digital encoding), while the strength and duration of the p53 response after damage to individual bases increases depending on the severity of the damage (analogue encoding) (Sources: Loewer *et al.*, 2010 and Batchelor *et al.*, 2011).



Complex signal processing

The example of the p53 signalling pathway shows the complexity of information processing in living cells. p53 is a dynamic signal integrator that can switch between digital and analogue encoding, depending on the stimulus. The signalling pathway reacts with high sensitivity to the slightest damage to the genetic material. Downstream filtering mechanisms then enable it to distinguish between spurious signals and lasting damage. In the future it will be important to clarify how the p53 signalling pathway is embedded in the cell's communication network and how it interacts with other signalling pathways. Only then we will be able to understand how the numerous external and internal signals are processed and control the cell's behaviour.

The research project in brief:

The work described here was carried out at Harvard Medical School, Boston, MA, in the Department of Systems Biology. Since May 2011, the Signalling Dynamics in Single Cells research group headed by Dr. Loewer is continuing the work at the Berlin Institute for Medical Systems Biology (BIMSB) of the Max Delbrück Center for Molecular Medicine in Berlin-Buch. The BIMSB is funded by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF) and the Berlin Senate.

References:

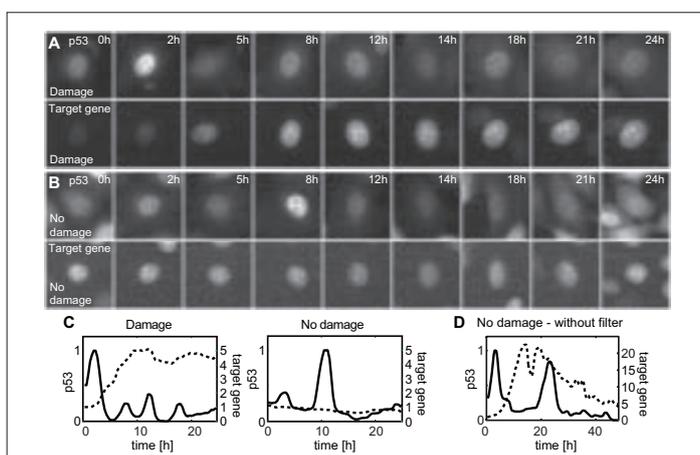
- Batchelor, E., Loewer, A., Mock, C., Lahav, G. (2011). Stimulus-dependent dynamics of p53 in single cells. *Mol. Syst. Biol.* 7: 488.
- Kruse, J., and Gu, W. (2009). Modes of p53 Regulation. *Cell*, 137(4), 609–622.
- Lahav, G., Rosenfeld, N., Sigal, A., Geva-Zatorsky, N., Levine, A. J., Elowitz, M. B., & Alon, U. (2004). Dynamics of the p53-Mdm2 feedback loop in individual cells. *Nature Genetics*, 36(2), 147–150
- Loewer, A., Batchelor, E., Gaglia, G., Lahav, G. (2010). Basal dynamics of p53 reveals transcriptionally attenuated pulses in cycling cells. *Cell* 142(1): 89-100
- Loewer, A., and Lahav, G. (2011). We are all individuals: causes and consequences of non-genetic heterogeneity in mammalian cells. *Curr Opin Genet Dev* (2011) doi:10.1016/j.gde.2011.09.010

Contact:

Dr. Alexander Loewer
 Junior Research Group Leader
 Berlin Institute for Medical Systems Biology
 Max Delbrück Center for Molecular Medicine
 (MDC), Berlin-Buch
 alexander.loewer@mdc-berlin.de

www.mdc-berlin.de/BIMSB

Figure 3: Signal processing in the p53 network



The signalling network uses a filter based on p53 modifications to distinguish between transient damage that occurs as background noise due to physiological processes and serious damage due to external influences. A dual reporter cell line was used to show that only regular p53 pulses following damage by radiation lead to the activation of a target gene (A). Similar pulses during normal cell growth do not trigger increased production of the target gene (B). This is illustrated by the quantification of the fluorescent signals (C). If the filter is selectively switched off by means of RNA interference, p53 pulses also activate target genes in normally growing cells (D) (Source: Loewer *et al.*, 2010).

digitale und analoge datenverarbeitung im p53 signalweg

Mit fluoreszierenden Reportern auf der Spur eines Tumorsuppressors

von Alexander Loewer

Die Zellen unseres Körpers besitzen die faszinierende Eigenschaft, flexibel auf Veränderungen reagieren zu können. Dazu nehmen sie Signale aus der Umgebung wahr, verknüpfen sie mit Informationen über ihren inneren Zustand und lösen die passende Antwort aus. Diese zelluläre Signalverarbeitung wird von komplexen molekularen Netzwerken mit Hunderten Einzelkomponenten vermittelt. Die Bestandteile und Verknüpfungen dieser Netzwerke gelten heute zum großen Teil als bekannt. Aber wie entfalten sie ihre Wirkung in lebenden Zellen? Wie werden Signale kodiert, verarbeitet und wieder dekodiert? Wie werden bedeutsame Signale von unvermeidbarem Hintergrundrauschen unterschieden? In diesen Fragen liegt der Schlüssel zur gezielten Beeinflussung des Zellverhaltens, einer Grundvoraussetzung für die Entwicklung wirksamer Therapien.

Zellen reagieren auf externe und interne Stresssignale

Stress ist ein fester Bestandteil unseres Lebens. Wir kämpfen ständig darum, unseren Alltag im Spannungsfeld von Beruf, Familie und Freizeit in geordneten Bahnen zu halten. In ähnlicher Weise müssen die Zellen in unserem Körper die Integrität ihrer molekularen Bestandteile gegen Stress verteidigen, der einerseits aus der Umwelt auf sie einströmt, andererseits aber auch als Folge lebensnotwendiger Prozesse entsteht. Um die Grundlagen der dynamischen Signalverarbeitung zu verstehen, untersuchen wir die zelluläre Antwort auf Stress. Zum Beispiel schädigt Sonneneinstrahlung das Erbgut unserer Hautzellen, während durch die Energieerzeugung bei der Zellatmung schädliche Radikale erzeugt werden. Unsere Zellen müssen diesen Stress wahrnehmen und entsprechende Gegenmaßnahmen einleiten. Meistens ist es ausreichend, das Wachstum anzuhalten, um entstandene Schäden zu reparieren und deren Übertragung bei der Zellteilung zu unterbinden. Nur im Extremfall wird der programmierte Zelltod ausgelöst, um irreparabel geschädigte Zellen zum Wohle des Gesamtorganismus zu eliminieren. Wenn diese Mechanismen nicht aufeinander abgestimmt sind oder auf Grund von Mutationen versagen, kann es zur Krebsentstehung kommen.

Das Protein p53 ist zentraler Bestandteil der zellulären Stressantwort. Es gehört zur Klasse der Tumorsuppressoren, deren Inaktivierung die Entstehung von Krebs begünstigt. So ist p53 in mehr als der Hälfte aller menschlichen Tumoren durch Mutation inaktiviert. In der Zelle wird p53 durch ein komplexes Netzwerk von molekularen Interaktionen reguliert, dessen Bauplan durch viele elegante molekular- und zellbiologische Studien entschlüsselt wurde (Zur Übersicht siehe: Kruse and Gu, 2009). Dies ermöglicht uns nun, die dynamische Signalverarbeitung im p53 Netzwerk auf molekularer Ebene zu untersuchen.

Zeitaufgelöste Mikroskopie in lebenden Zellen

Obwohl alle unsere Zellen die gleiche genetische Ausstattung haben, zeigen sie oft unterschiedliche Reaktionen auf identische Stresssignale. Zum einen wird dies durch Fluktuationen der molekularen Prozesse bedingt, die die individuellen Bedingungen in der Zelle zu jedem Zeitpunkt bestimmen. Zum anderen werden Zellen auch durch ihre direkte Umgebung beeinflusst, zum Beispiel durch die Anzahl an Nachbarzellen.

Auf Grund dieser Heterogenität geben Messungen dynamischer Prozesse, die eine Zellpopulation als Ganzes erfassen, nur ein verzerrtes Bild des tatsächlichen Verhaltens der einzelnen Zelle wieder (Loewer und Lahav, 2011). Um die Dynamik der Signalverarbeitung zu verstehen, müssen die zu Grunde liegenden Vorgänge daher auf der Ebene von Einzelzellen untersucht werden. Dazu bedarf es einer Technik, die quantitative Daten mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung erzeugt. Die zeitaufgelöste Fluoreszenzmikroskopie ist dazu in der Lage. Sie erlaubt es, molekulare Prozesse in lebenden Zellen sichtbar zu machen. Als Grundlage dienen fluoreszierende „Reporterproteine“, die mit beliebigen Genprodukten fusioniert und in Zellen eingeschleust werden können. Über die Intensität dieser fluoreszierenden Reporter können dann Rückschlüsse auf das Verhalten der zu untersuchenden Fusionspartner gezogen werden. Heutzutage stehen verschiedenfarbige Proteinvarianten mit definierten Farbspektren zur Verfügung, so dass mehrere zelluläre Prozesse parallel zueinander verfolgt werden können. Dies wiederum kann Aufschluss über die Interaktion verschiedener Komponenten



Alexander Loewer (Bild: David Ausserhofer/MDC).

ten eines Signalwegs miteinander, aber auch über die Art der Wechselwirkung zwischen verschiedenen Signalwegen geben.

Um die Signalverarbeitung innerhalb des p53 Netzwerks in lebenden Zellen zu untersuchen, haben wir fluoreszierende Reporter für ausgewählte Komponenten des p53 Signalweges erzeugt. Kombiniert mit automatisierter Mikroskopie erlauben sie es, die zelluläre Antwort auf Stress über mehrere Tage hinweg „live“ zu verfolgen. Die erzeugten Bilddaten werden computergestützt analysiert und quantifiziert. Da die Dynamik komplexer Netzwerke intuitiv schwer verständlich ist, kombinieren wir die quantitativen experimentellen Daten mit mathematischen Modellen der molekularen Interaktionen.

Digitale und analoge Signalverarbeitung im p53 Netzwerk

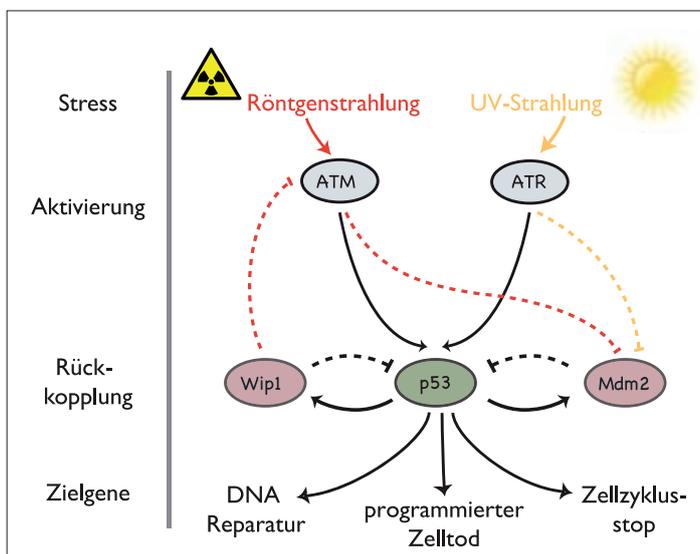
Mit diesem Ansatz haben wir untersucht, wie Information über zellulären Stress im p53 Netzwerk kodiert und verarbeitet werden. Kommt es zum Beispiel durch Röntgenstrahlen zu Brüchen in der DNA, werden spezielle Sensoren aktiviert, die das p53 Protein stabilisieren. Normalerweise ist p53 sehr kurzlebig. Wird es jedoch während der Stressantwort stabilisiert, führt dies zu einer Akkumulation im Zellkern und darauf folgender Aktivierung zahlreicher Zielgene. Zielgene von p53 werden für die DNA

Reparatur, die Kontrolle der Zellteilung und den programmierten Zelltod benötigt (Abb. 1). Welche Gene aktiviert werden bestimmt also letztlich die zelluläre Antwort auf den Stress.

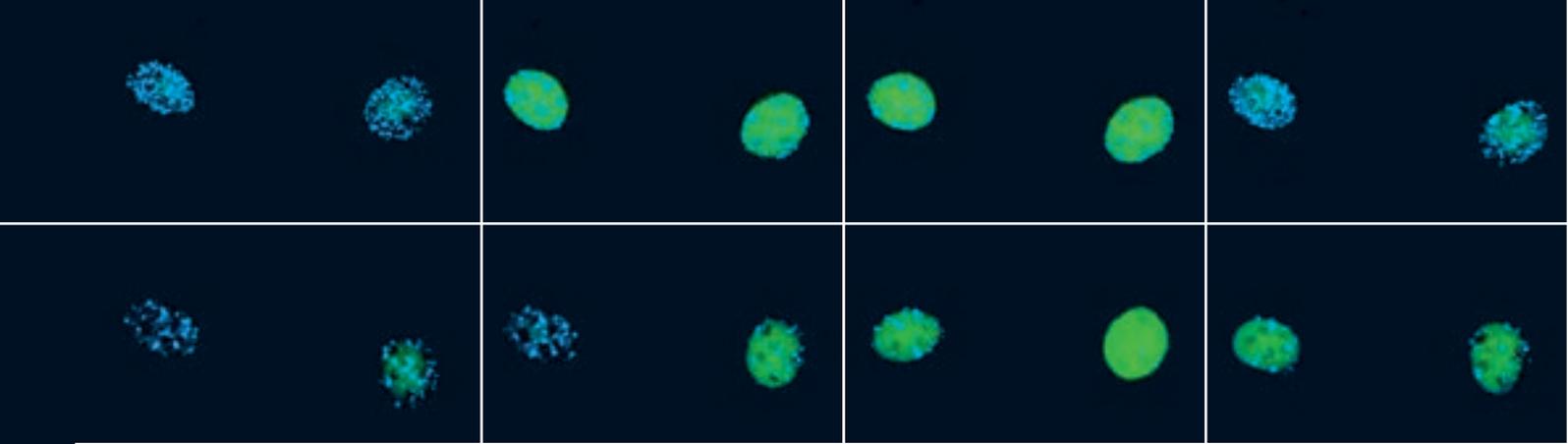
Unter den Zielgenen finden sich auch negative Regulatoren von p53. Diese sorgen dafür, dass p53 wieder abgebaut und die Stressantwort bedarfsgerecht abgeschaltet wird. Solche Rückkopplungsschleifen sind nicht nur in der Biologie, sondern auch in der Technik weit verbreitete Regulationsmechanismen. Sie haben großen Einfluss auf das dynamische Verhalten eines Systems und können so seine Funktionsweise kontrollieren. Im Falle von p53 führen sie dazu, dass Brüche in der DNA in Folge von Röntgenstrahlen zu wiederholten gleichförmigen Pulsen von p53-Akkumulation führen (Abb. 2). Überraschenderweise verändert sich weder die Amplitude, noch die Dauer dieser Pulse mit der Stärke des Schadens. Allein die Anzahl der Pulse gibt Auskunft über den entstandenen Schaden. p53 verhält sich in dieser Hinsicht also wie ein digitales System (Lahav *et al.*, 2004).

Das Netzwerk ist aber so flexibel, dass es Information nicht nur auf eine Weise kodieren kann. Wird die Zelle von UV-Strahlen getroffen, entstehen keine Brüche in der DNA, sondern Defekte an einzelnen Nukleotiden. Obwohl auch diese Schäden das p53 Netzwerk

Abbildung 1: Schema des p53 Signalweges



Der Tumorsuppressor p53 wird bei zellulärem Stress, z.B. durch Röntgen- oder UV-Strahlung aktiviert. Dieser Stress wird von Sensoren detektiert, die spezifische Enzyme (ATM oder ATR) aktivieren. Diese Enzyme modifizieren das p53 Protein und stabilisieren es. Daraufhin aktiviert p53 seine Zielgene, die die Antwort auf den Stress vermitteln. Dabei kann es sich um Wachstumsstopp und Reparatur, aber auch um den programmierten Zelltod handeln. Unter den Zielgenen befinden sich negative Regulatoren von p53 (Mdm2 und Wip1), die dafür sorgen, dass p53 wieder abgeschaltet wird. Jeder Stress aktiviert spezifische Netzwerkverbindungen (rote, bzw. orangene Pfeile), wodurch die Signale unterschiedlich kodiert werden (digital oder analog) (Quelle: A. Loewer, MDC).



Zeitaufgelöste Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht die Visualisierung und Quantifizierung dynamischer Prozesse in lebenden Zellen. So können zum Beispiel DNA Schäden und zelluläre Stressantwort gemeinsam untersucht werden (Bild: Alexander Loewer, MDC).

aktivieren, lösen sie dabei Pulse von p53-Akkumulationen aus, deren Amplitude und Dauer proportional zur Stärke des Schadens ist (Abb. 2). Hier verhält sich p53 also wie ein analoges System, in dem ein stärkeres Eingangssignal zu einem stärkeren und länger anhaltenden Ausgangssignal führt (Batchelor *et al.*, 2011).

Der Unterschied zwischen den beiden Kodierungsmethoden lässt sich auf wenige, subtile Veränderungen in der Verschaltung des Netzwerks zurückführen (Abb. 1). Dasselbe molekulare Netzwerk kann so unterschiedliche Signale kodieren.

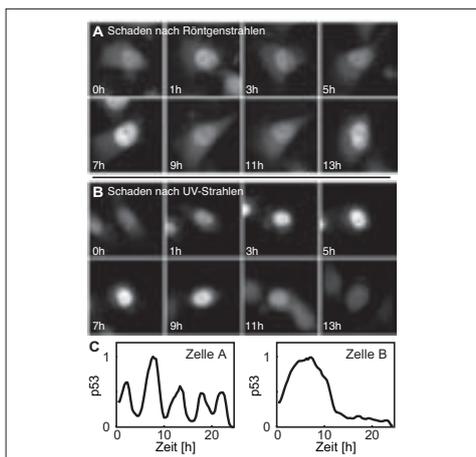
Ein molekularer Rausch-Filter

Während p53 mit hoher Sensibilität auf jeden Schaden reagieren muss, der zu einer Mutation führen könnte, bedarf es ebenfalls einer gewissen Toleranz gegenüber den natürlich auftretenden Schäden in der Zelle. Zum Beispiel verursacht die Replikation des Genoms während jeder Zellteilung Schäden. Um zu verstehen, wie das p53 Netzwerk zwischen solchen intrinsischen Schäden und ernsten, von Außen induzierten Schäden differenziert, haben wir Zellen während des normalen Wachstums beobachtet. Zu unserer Überraschung haben wir auch in scheinbar unbeschädigten Zellen immer wieder Pulse von p53 detektiert (Loewer *et al.*, 2010). Diese spontanen p53 Pulse haben dieselben Eigenschaften wie die von Röntgenstrahlen ausgelösten Pulse, treten aber nicht mit derselben Regelmäßigkeit auf. Präzisere Analysen haben gezeigt, dass die Pulse nicht zufällig, sondern während bestimmter

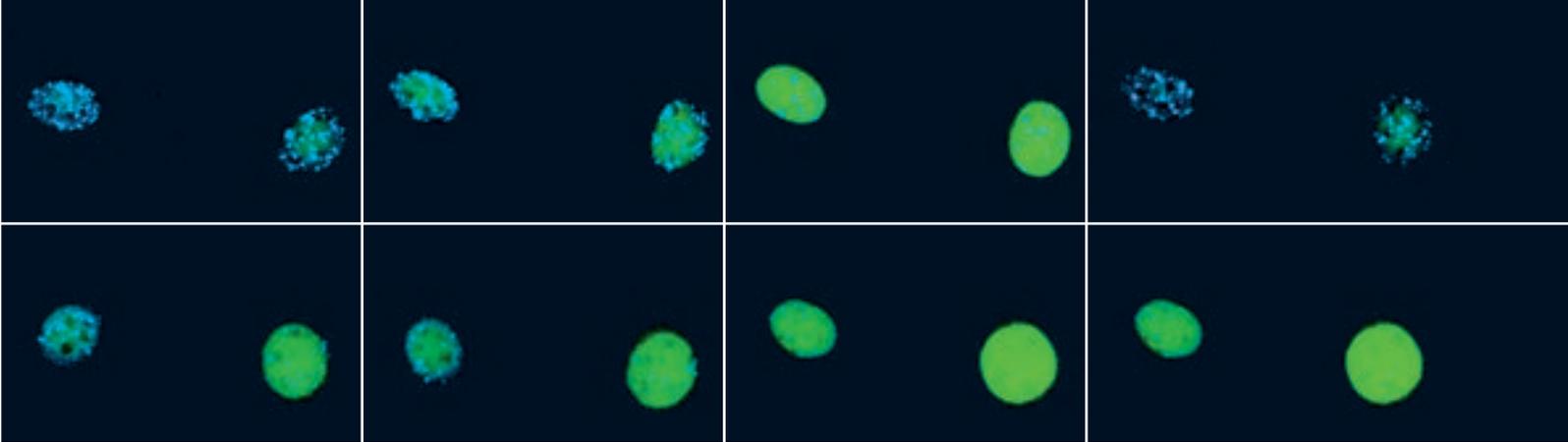
Phasen des Zellzyklus auftreten. Es ist bekannt, dass es während dieser Phasen zu transienten Schädigungen des Erbguts kommt. Wie ein Alles-oder-Nichts Signal reagiert p53 auf diese kurzzeitigen Schäden und akkumuliert in ähnlicher Weise wie nach starken Schäden. Im Gegensatz zu dauerhaften Schädigungen des Erbguts durch externe Stressoren, sollten diese transienten Schäden keine volle Stressantwort auslösen, die das Wachstum behindern oder gar den programmierten Zelltod auslösen könnte. Um zu verstehen, wie sich spontane und regelmäßige p53 Pulse auf molekularer Ebene unterscheiden, haben wir mit Reporterzellen die Dynamik von p53 und die Aktivität eines Zielgens parallel zueinander verfolgt (Abb. 3). Wie erwartet führten p53 Pulse nach Bestrahlung der Zellen zur Aktivierung des Zielgens. Ähnliche Pulse während des normalen Zellwachstums dagegen hatten keinen Effekt. Wir konnten zeigen, dass dieser Unterschied durch einen Filter im p53 Netzwerk erreicht wird (Loewer *et al.*, 2010).

Dieser Filter besteht aus bestimmten Modifikationen von p53, die für die transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen notwendig sind. Während die Akkumulation des p53 Proteins durch den kleinsten Stimulus ausgelöst wird, bedürfen diese aktivierenden Modifikationen andauernder Reize durch die Stress-Sensoren. Durch die Kombination dieser beiden Mechanismen, der sprunghaften Anregung und der Filterung, kann das p53 Netzwerk sehr präzise auf extern induzierte Schäden im Erbgut reagieren und sie von hohem Hintergrundrauschen durch physiologische Prozesse unterscheiden.

Abbildung 2: Die p53 Antwort in lebenden Zellen



In menschliche Brustkrebszellen wurden durch Bestrahlung entweder DNA-Doppelstrangbrüche (A) oder Schaden an Einzelbasen (B) erzeugt. Die Zellen enthalten einen fluoreszierenden Reporter für p53, wodurch die Dynamik dieses Proteins „live“ unter dem Mikroskop verfolgt werden kann. Durch automatische Bildanalyse können einzelne Zellen verfolgt und die Intensität der Fluoreszenz quantifiziert werden (C). DNA-Doppelstrangbrüche lösen gleichförmige Pulse von p53-Akkumulation aus (digitale Kodierung), während die Stärke und Dauer der p53 Antwort nach Schädigung von Einzelbasen mit der Stärke des Schadens zunimmt (analoge Kodierung) (Quellen: Loewer *et al.*, 2010 und Batchelor *et al.*, 2011).



Komplexe Signalverarbeitung

Das Beispiel des p53 Signalwegs zeigt, wie komplex die Verarbeitung von Informationen in lebenden Zellen abläuft. p53 ist ein dynamischer Signalintegrator, der je nach Stimulus zwischen digitaler und analoger Kodierung wechseln kann. Der Signalweg reagiert mit hoher Sensibilität auf kleinste Schäden am Erbgut; nachgeschaltete Filtermechanismen erlauben es dann, fluktuierende Signale von dauerhaften Schäden zu unterscheiden. In Zukunft wird es wichtig sein aufzuklären, wie der p53 Signalweg in das Kommunikationsnetzwerk der Zelle eingebettet ist und wie er mit anderen Signalwegen interagiert. Nur so kann man verstehen, wie die zahlreichen externen und internen Signale verarbeitet werden und das Verhalten der Zelle steuern.

Steckbrief Forschungsprojekt:

Die beschriebenen Arbeiten wurden an der Harvard Medical School, Boston, USA im Department of Systems Biology durchgeführt. Seit Mai 2011 führt die Arbeitsgruppe „Signaling Dynamics in Single Cells“ unter der Leitung von Dr. Loewer die Arbeiten am Berlin Institute for Medical Systems Biology (BIMSB) des Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin in Berlin-Buch fort. Das BIMSB wird durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung und den Senat Berlin finanziert.

Referenzen:

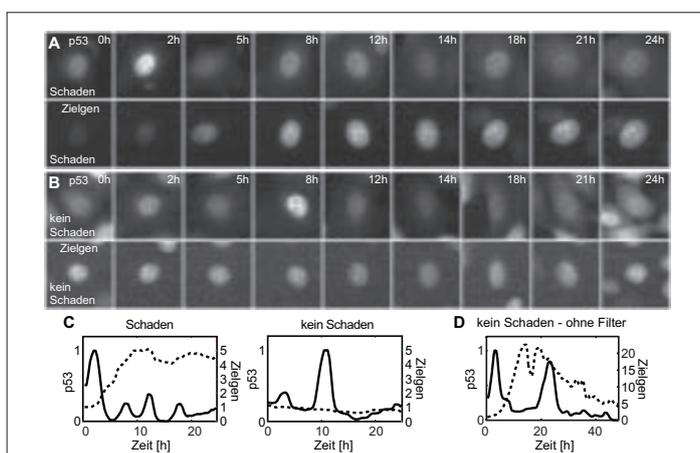
Batchelor, E., Loewer, A., Mock, C., Lahav, G. (2011). Stimulus-dependent dynamics of p53 in single cells. *Mol. Syst. Biol.* 7: 488.
 Kruse, J., and Gu, W. (2009). Modes of p53 Regulation. *Cell*, 137(4), 609–622.
 Lahav, G., Rosenfeld, N., Sigal, A., Geva-Zatorsky, N., Levine, A. J., Elowitz, M. B., & Alon, U. (2004). Dynamics of the p53-Mdm2 feedback loop in individual cells. *Nature Genetics*, 36(2), 147–150
 Loewer, A., Batchelor, E., Gaglia, G., Lahav, G. (2010). Basal dynamics of p53 reveals transcriptionally attenuated pulses in cycling cells. *Cell* 142(1): 89-100
 Loewer, A., and Lahav, G. (2011). We are all individuals: causes and consequences of non-genetic heterogeneity in mammalian cells. *Curr Opin Genet Dev* (2011) doi:10.1016/j.gde.2011.09.010

Kontakt:

Dr. Alexander Loewer
 Junior Research Group Leader
 Berlin Institute for Medical Systems Biology
 MAX-DELBÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN
 (MDC), Berlin-Buch
 alexander.loewer@mdc-berlin.de

www.mdc-berlin.de/BIMSB

Abbildung 3: Signalverarbeitung im p53 Netzwerk



Durch einen Filter, der auf Modifikationen von p53 beruht, kann das Netzwerk transiente Schäden, die als Hintergrundrauschen durch physiologische Prozesse entstehen, von ernstesten Schäden durch äußere Einflüsse unterscheiden. Mit einer dualen Reporterzelllinie wurde gezeigt, dass nur regelmäßige p53 Pulse nach Schäden durch Bestrahlung zur Aktivierung eines Zielgens führen (A). Ähnliche Pulse während des normalen Zellwachstums lösen keine verstärkte Produktion des Zielgens aus (B). Dies wird durch die Quantifizierung der fluoreszenten Signale verdeutlicht (C). Wird der Filter gezielt durch RNA-Interferenz ausgeschaltet, können auch p53 Pulse in normal wachsenden Zellen Zielgene aktivieren (D) (Quelle: Loewer *et al.*, 2010).