

DFG Forschungszentrum Molekularphysiologie des Gehirns (CMPB)

ABTEILUNG STAMMZELLBIOLOGIE (seit 9/2004)

DFG Research Centre Molecular Physiology of the Brain (CMPB)

DEPARTMENT OF STEM CELL BIOLOGY (since 9/2004)

Abteilungsdirektor/in | Head of Department

Prof. Dr. rer. nat. Andreas Wodarz (seit 15.09.2004)

Hochschullehrer/innen | Professors and Lecturers

Wodarz, Andreas (seit 9/2004)

Prof. Dr. rer. nat.

awodarz@gwdg.de

Telefon

39-13711

Forschungsschwerpunkte

- ▶ Asymmetrische Teilung von Stammzellen
- ▶ Molekulare Kontrolle der Zellpolarität in Epithelien
- ▶ Kontrolle planarer Zellpolarität und Cadherin-vermittelter Zelladhäsion durch den Wnt Signalweg

Research Foci

- ▶ Asymmetric Division of Stem Cells
- ▶ Molecular Control of Epithelial Cell Polarity
- ▶ Control of Planar Cell Polarity and of Cadherin Mediated Cell Adhesion by Wnt Signalling

Einleitung

Die Forschungsaktivitäten in der Abteilung Stammzellbiologie konzentrieren sich hauptsächlich auf verschiedene Aspekte der asymmetrischen Teilung neuraler Stammzellen. Die asymmetrische Zellteilung ist ein fundamentaler Mechanismus zur Erzeugung von Zelldiversität in komplexen Organismen. Gleichzeitig ist die Kontrolle der asymmetrischen Zellteilung von entscheidender Bedeutung für die Erhaltung des Gleichgewichts zwischen Stammzellen und differenzierenden Zellen im Organismus. Störungen dieses Gleichgewichts können zu schwerwiegenden Erkrankungen führen. Die asymmetrische Zellteilung steht in engem Zusammenhang mit der Kontrolle der Zellpolarität, die in einem zweiten Forschungsschwerpunkt untersucht wird. Die Etablierung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität wiederum hängt eng zusammen mit der Regulation der Zelladhäsion, insbesondere in epithelialen Geweben. Hier untersuchen wir den Einfluss des evolutionär konservierten Wnt Signalwegs auf Zelladhäsion und Zellmigration.

Als Modellorganismus für unsere Untersuchungen verwenden wir hauptsächlich die Taufliege *Drosophila melanogaster*, da sie genetisch sehr gut manipulierbar ist und sich hervorragend für zellbiologische Experimente unter Einsatz hochauflösender Lichtmikroskopie eignet.

Preface

The research activities in the Department of Stem Cell Biology focus mainly on different aspects of the asymmetric division of neural stem cells. Asymmetric cell division is a fundamental mechanism for the generation of cell diversity in complex organisms. At the same time, asymmetric cell division is essential for the balance between stem cells and differentiating cells in an organism. Disturbances of this balance can cause severe diseases. Asymmetric cell division is intricately linked to the control of cell polarity, which is investigated in a second research focus. The establishment and maintenance of cell polarity is connected to the regulation of cell adhesion, especially in epithelial tissues. In this context, we investigate the function of the evolutionarily conserved Wnt signal transduction pathway in the regulation of cell adhesion and cell migration.

The model organism of our research is mainly the fruit fly *Drosophila melanogaster*, as it is easily accessible to genetic manipulation and is very well suited for cell biological analyses using high resolution light microscopy.

1. Asymmetrische Teilung von Stammzellen

Stammzellen besitzen die einzigartige Eigenschaft, eine Vielzahl verschiedener Zelltypen hervorzubringen und gleichzeitig selbst in einem weitgehend undifferenzierten Zustand zu verbleiben. Diese Eigenschaft von Stammzellen beruht im Wesentlichen auf ihrer Fähigkeit zur asymmetrischen Zellteilung. Aus einer solchen Zellteilung gehen zwei verschiedene Tochterzellen hervor. Eine Tochterzelle ist in der Regel auf ei-

nen bestimmten Entwicklungsweg festgelegt und erzeugt nach einer oder mehreren weiteren Zellteilungen terminal differenzierte Zelltypen. Die andere Tochterzelle der Stammzelle hingegen behält ihre Stammzell-Eigenschaften und damit die Fähigkeit zur asymmetrischen Zellteilung. Auf diese Weise bleibt die Stammzellpopulation im Organismus erhalten und kann gleichzeitig fortwährend differenzierte Zelltypen hervorbringen.

Wir konnten zeigen, dass der evolutionär konservierte PAR/aPKC-Komplex eine Schlüsselfunktion bei der molekularen Kontrolle asymmetrischer Zellteilungen einnimmt. Insbesondere kontrolliert dieser Proteinkomplex die Polarisierung der Stammzelle, die für die asymmetrische Verteilung von Zellschicksalsdeterminanten, die korrekte Ausrichtung der mitotischen Spindel und für die unterschiedliche Zellgröße der Tochterzellen Voraussetzung ist. Um die Mechanismen aufzuklären, wie der PAR/aPKC-Komplex mit der Plasmamembran, dem Cytoskelett und der mitotischen Spindel interagiert, haben wir mehrere Protein-Protein-Interaktions-Experimente (Hefe 2-Hybrid Screens) mit verschiedenen Bereichen des Bazooka/PAR-3 Proteins als Köder durchgeführt. Dabei konnten wir mehrere hochinteressante Interaktionspartner identifizieren, deren Funktion bei der asymmetrischen Teilung von Stammzellen z. Zt. intensiv untersucht wird. Um Aufschluss über die funktionell relevanten Domänen einzelner Komponenten des PAR/aPKC-Komplexes zu erhalten, wurden Struktur-Funktionsanalysen durchgeführt und neue mutante Allele molekular und phänotypisch charakterisiert. Weiterhin konnten in zwei genetischen Screens neue Gene identifiziert werden, die für die asymmetrische Teilung von Stammzellen essentiell sind.

1. Asymmetric Division of Stem Cells

Stem cells possess the unique ability to generate a large spectrum of different cell types despite retaining an undifferentiated phenotype themselves. This property of stem cells is mainly due to their ability to divide asymmetrically. An asymmetric cell division generates two different daughter cells. In general, one daughter cell has a restricted developmental potential and will give rise to terminally differentiated cell types after one or more additional cell divisions. In contrast, the other daughter cell retains its stem cell character and its ability to divide asymmetrically. By this mechanism the stem cell population in the organism is maintained and can serve as a continuous source for the generation of differentiated cell types.

We have shown that the evolutionarily conserved PAR/aPKC complex has a key function in the molecular control of asymmetric cell divisions. In particular, this protein complex controls the polarization of the stem cell, which is the prerequisite for the asymmetric localization of cell fate determinants, the proper orientation of the mitotic spindle and the unequal size of the two daughter cells. In order to uncover the mechanisms of how the PAR/aPKC complex interacts with the plasma membrane, the cytoskeleton and the mitotic spindle, we have performed several protein-protein interaction screens (yeast

two-hybrid screens) using different regions of Bazooka/PAR-3 as bait. These screens led to the identification of several very interesting interaction partners whose function in the asymmetric division of stem cells is currently under intense investigation. In order to gain insight into the functionally relevant protein domains of individual components of the PAR/aPKC complex, we have performed structure-function analyses and characterized novel mutant alleles at the molecular and phenotypic level. Furthermore, in two genetic screens we have identified new genes required for the asymmetric division of stem cells.

Arbeitsgruppenleiter/innen | Group Leaders

Prof. Dr. Andreas Wodarz

Kooperationen | Cooperations

Y. Bellaïche, Institut Curie, Paris, Frankreich

A. Ephrussi, EMBL, Heidelberg

B. Giebel, Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika, Universität Düsseldorf

C. Gonzalez, ICREA-IRB-PCB, Barcelona, Spanien

W. Huttner, M. Gonzalez-Gaitan, Max-Planck-Institut für Zellbiologie und Genetik, Dresden

E. Knust, Institut für Genetik, Universität Düsseldorf

Drittmittelförderung | Funding

DFG, Forschungszentrum für Molekularphysiologie des Gehirns (CMPB), 2004-2006

DFG, Normalverfahren, WO584/4-1, 4-2, 2000-2003

DFG, SFB 590, TP A2, 2001-2005

DFG, SPP 1109, WO584/5-1, WO584/7-1, 2001-2006

DFG, SPP 1111, WO584/6-1, 6-2, 2001-2006

DFG, SPP 1111, KL588/15-1, 15-2, 2003-2007

Ausgewählte Publikationen | Selected Publications

Wodarz A, Gonzalez C (2006) Connecting cancer to the asymmetric division of stem cells. *Cell*, 124: 1121-3.

von Stein W, Ramrath A, Grimm A, Müller-Borg M, Wodarz A (2005) Direct association of Bazooka/PAR-3 with the lipid phosphatase PTEN reveals a link between the PAR/aPKC complex and phosphoinositide signalling. *Development*, 132: 1675-86.

Wodarz A (2005) Molecular control of cell polarity and asymmetric cell division in *Drosophila* neuroblasts. *Curr Opin Cell Biol*, 17: 475-81.

Yoshida S, Müller HAJ, Wodarz A, Ephrussi A (2004) PKA-R1 spatially restricts Oskar expression for *Drosophila* embryonic patterning. *Development*, 131: 1401-10.

Wodarz A, Huttner WB (2003) Asymmetric cell division during neurogenesis in *Drosophila* and vertebrates. *Mech Dev*, 120: 1297-309.

2. Molekulare Kontrolle der Zellpolarität in Epithelien

Epithelien sind Gewebe, die eine ausgeprägte Polarität entlang der apiko-basalen Achse aufweisen und fast immer eine Grenze zwischen verschiedenen Kompartimenten eines Organismus darstellen. So trennt beispielsweise das Darmepithel das Darmlumen vom Blutgefäßsystem und ist für den Transport von Nährstoffen aus dem Lumen ins Blut verantwortlich. Damit Epithelien ihre Funktion ausüben können, müssen die Epithelzellen polarisiert sein. Das bedeutet, dass die Zellen verschiedene Plasmamembrankompartimente etablieren und aufrechterhalten müssen, die sich in ihrer Protein- und Lipidzusammensetzung unterscheiden und durch Zellkontaktstrukturen voneinander getrennt werden.

Wir untersuchen die molekularen Mechanismen, die in der Taufliede *Drosophila* für die Ausbildung und Aufrechterhaltung epithelialer Polarität verantwortlich sind. In den letzten Jahren konnten wir eine Reihe von Genen identifizieren und funktionell charakterisieren, die eine Schlüsselfunktion in diesem Prozess ausüben. Hier kommt den Komponenten des so genannten PAR/aPKC-Komplexes eine besondere Bedeutung zu, da sie nicht nur die Polarität von Epithelien, sondern auch die Polarität zahlreicher anderer Zelltypen, einschließlich Stammzellen und Eizellen, kontrollieren. Wir haben in dem bereits unter (1.) erwähnten Interaktions-Screen mehrere Interaktionspartner des Bazooka/PAR-3 Proteins identifiziert, die spezifisch in ektodermalen Epithelien exprimiert sind. Eines dieser Proteine ist ausschließlich im apikalen Cytokortex lokalisiert und stellt somit einen exzellenten Kandidaten für ein Protein mit einer Funktion in der Kontrolle der Zellpolarität dar. Außerdem untersuchen wir in Struktur-Funktionsanalysen die Bedeutung verschiedener Proteindomänen von Bazooka/PAR-3 und der atypischen Proteinkinase C (aPKC) bei der Kontrolle der Zellpolarität in embryonalen und adulten Epithelien.

2. Molecular Control of Epithelial Cell Polarity

Epithelia are tissues with a pronounced polarity along the apical-basal axis that very often form a boundary between different compartments of an organism. The gut epithelium, for instance, separates the gut lumen from the vascular system and is responsible for the transport of nutrients from the lumen into the blood. Epithelia have to be polarized to function properly. This means that the cells have to establish and maintain different plasma membrane compartments that differ in their protein- and lipid composition and are separated by intercellular junctions.

We investigate the molecular mechanisms that are responsible for the establishment and maintenance of epithelial cell polarity in the fruit fly *Drosophila*. We have recently identified several genes that function as key regulators of cell polarity and have analyzed their function in this process. The components of the so called PAR/aPKC complex are of particular importance in this context, because they do not only control epithelial polarity but also the polarity of many other cell types, including stem cells and oocytes. In the protein-protein interaction screen that was already mentioned before (1.), we have identified several interaction partners of Bazooka/PAR-3 that are specifically expressed in ectodermal epithelia. One of these proteins is localized exclusively in the apical cytocortex and thus is a prime candidate for a protein that functions in the control of cell polarity. In addition to this approach, we also investigate the requirements for individual protein domains of Bazooka/PAR-3 and atypical protein kinase C in the control of cell polarity in embryonic and adult epithelia by means of structure-function analyses.

Arbeitsgruppenleiter/innen | Group Leaders

Prof. Dr. Andreas Wodarz

Kooperationen | Cooperations

O. Bossinger, E. Knust, A. Müller, Institut für Genetik, Universität Düsseldorf

A. Ephrussi, EMBL, Heidelberg

W. Huttner, Max-Planck-Institut für Zellbiologie und Genetik, Dresden

W. J. Nelson, Stanford University, USA

M. Schneider, Lund University, Schweden

Drittmittelförderung | Funding

DFG, Forschungszentrum für Molekularphysiologie des Gehirns (CMPB), 2004-2006

DFG, Normalverfahren, WO584/4-1, 4-2, 2000-2003

DFG, SPP 1109, WO584/5-1, WO584/7-1, 2001-2006

DFG, SPP 1111, WO584/6-1, 6-2, 2001-2006

DFG, SPP 1111, KL588/15-1, 15-2, 2003-2007

DFG, SFB 590, TP A2, 2001-2005

Ausgewählte Publikationen | Selected PublicationsGiebel B, Wodarz A (2006) Tumour suppressors: Control of signalling by endocytosis. *Curr Biol*, 16: R91-2.von Stein W, Ramrath A, Grimm A, Müller-Borg M, Wodarz A (2005) Direct association of Bazooka/PAR-3 with the lipid phosphatase PTEN reveals a link between the PAR/aPKC complex and phosphoinositide signalling. *Development*, 132: 1675-86.Wodarz A (2005) Molecular control of cell polarity and asymmetric cell division in *Drosophila* neuroblasts. *Curr Opin Cell Biol*, 17: 475-81.Yoshida S, Müller HAJ, Wodarz A, Ephrussi A (2004) PKA-R1 spatially restricts Oskar expression for *Drosophila* embryonic patterning. *Development*, 131: 1401-10.Johnson K, Wodarz A (2003) A genetic hierarchy controlling cell polarity. *Nature Cell Biol*, 5: 12-4.Wodarz A (2002) Establishing cell polarity in development. *Nature Cell Biol*, 4: E39-44.

3. Kontrolle planarer Zellpolarität und Cadherin-vermittelter Zelladhäsion durch den Wnt Signalweg

Der Wnt/Wingless Signalweg ist von großer Bedeutung für die Musterbildung während der Entwicklung und für die Kontrolle der Zellproliferation und Differenzierung in adulten Geweben. Eine zentrale Komponente des Wnt/Wingless Signalwegs ist beta-Catenin, das bei Aktivierung des Signalwegs im Zellkern akkumuliert und dort als Transkriptions-Koaktivator die Transkription verschiedener Zielgene anschaltet. beta-Catenin besitzt außerdem eine zentrale Funktion als Bestandteil des Cadherin-Catenin-Komplexes an Zellkontaktstrukturen, wo es für die Etablierung Cadherin-abhängiger Zelladhäsion erforderlich ist. Die Wnt Signalkaskade ist nach neueren Erkenntnissen nicht strikt linear organisiert, sondern verzweigt sich nach der Rezeption des Wnt Signals an der Zelloberfläche. Eine Schlüsselrolle kommt hierbei dem zytoplasmatischen Protein Dishevelled (Dsh) zu, das sowohl bei der Kontrolle planarer Zellpolarität als auch im beta-Catenin-abhängigen kanonischen Wnt-Signalweg benötigt wird. Sowohl bei der Kontrolle der planaren Zellpolarität als auch bei der Kontrolle der Cadherin-vermittelten Zelladhäsion gibt es neuerdings starke Hinweise auf eine transkriptionsunabhängige Funktion des Wnt Signalwegs.

Wir haben durch eine Struktur-Funktionsanalyse des Dsh-Proteins die Bedeutung einzelner Proteindomänen und potentieller Phosphorylierungsstellen für den kanonischen und

den planaren Polaritäts-Zweig des Wnt Signalwegs untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die potentiellen Phosphorylierungsstellen des Dsh Proteins für seine Funktion im kanonischen Wnt Signalweg entbehrlich sind, nicht jedoch für seine Funktion in der Kontrolle planarer Polarität. In einer zweiten Versuchsreihe untersuchten wir den Einfluss des Wnt Signalwegs auf die Cadherin-vermittelte Zelladhäsion. Wir konnten zeigen, dass als unmittelbare Folge der Aktivierung des Wnt-Signalwegs die Cadherin-vermittelte Zelladhäsion stark reduziert wird. Bei langanhaltender Stimulation wird dieser Effekt durch eine transkriptionelle Aktivierung des E-cadherin Gens wieder kompensiert. Wir schließen daraus, dass der Wnt Signalweg eine wichtige Funktion bei der Modulation Cadherin-abhängiger Zellkontakte ausübt. Diese Untersuchungen sollen im Rahmen einer DFG Forschergruppe weitergeführt und auf das Säugersystem übertragen werden.

3. Control of Planar Cell Polarity and of Cadherin Mediated Cell Adhesion by Wnt Signalling

The Wnt/Wingless signalling pathway is of great importance for pattern formation during development and for the control of cell proliferation and differentiation in adult tissues. A central component of the Wnt pathway is beta catenin which upon activation of the pathway accumulates in the nucleus where it functions as a transcriptional co-activator to switch on downstream target genes. Beta catenin has a second important function as a component of the cadherin catenin complex at cell junctions, where it is required for the establishment of cadherin dependent cell adhesion. According to recent results, the Wnt pathway is not organized in a simple, linear fashion, but rather branches after reception of the Wnt signal at the cell surface. A key switch at this branchpoint appears to be the cytoplasmic protein Dishevelled (Dsh), which is required both for the planar polarity branch of the pathway and for canonical, beta catenin dependent Wnt signalling. There is growing evidence of transcription-independent functions of the Wnt pathway both in planar polarity signalling as well as in the control of cadherin dependent cell adhesion.

In a structure-function study of the Dsh protein, we have investigated the functional requirements for individual protein domains and potential phosphorylation sites for canonical Wnt signalling and for the planar polarity branch of the pathway. As a result, the potential phosphorylation sites of Dsh are dispensable for canonical Wnt signalling but are essential for planar polarity signalling. In a second series of experiments, we have analyzed the effects of Wnt signalling on cadherin mediated cell adhesion. We have shown that cadherin-mediated adhesion is reduced upon short term exposure of the cells to the Wnt signal. On extended stimulation of the cells by Wnt, this effect is compensated for by the transcriptional up regulation of the E-cadherin gene. We conclude that Wnt signalling has an important function in the modulation of cadherin-mediated cell adhesion. These studies will be continued in the frame-

work of a research consortium (Forschergruppe, DFG) and the analyses will be extended to mammalian cell culture systems.

Arbeitsgruppenleiter/innen | Group Leaders

Prof. Dr. Andreas Wodarz

Kooperationen | Cooperations

W. J. Nelson, Stanford University, USA

R. Nusse, Stanford University, USA

Drittmittelförderung | Funding

DFG, Forschungszentrum für Molekularphysiologie des Gehirns (CMPB), 2004-2006

Ausgewählte Publikationen | Selected Publications

Wodarz A, Stewart DB, Nelson WJ, Nusse R (2006) Wingless signalling modulates cadherin-mediated cell adhesion in *Drosophila* imaginal disc cells. *J Cell Science*, 119: 2425-34.

Penton A, Wodarz A, Nusse R (2002) A mutational analysis of dishevelled in *Drosophila* defines novel domains in the Dishevelled protein as well as novel suppressing alleles of axin. *Genetics* 161: 747-62.

Anhang | Appendix

Naturwissenschaftliche und andere Dissertationen (Dr. rer. nat. und andere) | Doctorate Theses (Dr. rer. nat. and others)

Takizawa, Chieko, Dr. rer. nat., Functional analysis of a new dominant-negative allele of miranda during CNS development in *Drosophila*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 2006.

von Stein, Walter, Dr. rer. nat., Charakterisierung von PTEN, FKBP59 und CG4420, Interaktions-partnern des PDZ-Domänen-Proteins Bazooka aus *Drosophila melanogaster*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 2006.

Egger-Adam, Diane, Dr. rer. nat., Identifikation neuer Interaktionspartner des Bazooka-Proteins in *Drosophila melanogaster*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 2005.

Diplom- und Masterarbeiten | Diploma and Master Theses

Breuer, Manuel, Dipl. Biol., Untersuchungen zur Funktion des Gens CG17064 während der Entwicklung von *Drosophila*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 2005

Jünger, Svenja, Dipl. Biol., Identifizierung und Charakterisierung von Stammzell-spezifisch exprimierten Genen am Beispiel des humanen Systems, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 2005

Spanholtz, Jan, Dipl. Biol., Die Bedeutung der Schicksalsdeterminante Numb für die Entwicklung humaner hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 2005

Koch, Carmen, Dipl. Biol., Molekulare und funktionelle Analyse eines Interaktionspartners der N-terminalen Region des Bazooka Proteins aus *Drosophila melanogaster*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 2004

Mitgliedschaften und Mitarbeit in wissenschaftlichen Gremien und Kommissionen | Memberships and Activities in Scientific Boards and Committees

Prof. Dr. Andreas Wodarz

Fakultätsmitglied Faculty of 1000, Sektion Zellbiologie

Universitäre Gremien | University Boards

Prof. Dr. Andreas Wodarz

Ko-Koordinator des Bereichs B1 „From neurogenesis to synaptogenesis“ des DFG Forschungszentrums Molekularphysiologie des Gehirns (CMPB)

Fachgutachtertätigkeit | Function as Expert Consultant

Prof. Dr. Andreas Wodarz

Für wissenschaftliche Fachzeitschriften:

Cell; Current Biology; Development; Developmental Cell; Developmental Dynamics; Development, Genes and Evolution; EMBO Journal; Gene; Genes and Development; Journal of Cell Biology; Journal of Cell Science; Mechanisms of Development; Molecular and Cellular Biology; Nature; Nature Cell Biology; Trends in Genetics

Für Institutionen der Forschungsförderung:

Boehringer Ingelheim Fonds; Deutsche Forschungsgemeinschaft; Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (FWF; Österreich); Französisches Wissenschaftsministerium; German Israeli Foundation for scientific research and development (GIF); Horizon Programm, The Netherlands Organisation for Health Research and Development; Italian Association for Cancer Research; Volkswagenstiftung; Wellcome Trust

Internationale wissenschaftliche Kooperationen International Scientific Cooperations

Y. Bellaiche, Institut Curie, Paris, Frankreich

C. Gonzalez, ICREA-IRB-PCB, Barcelona, Spanien

W. J. Nelson, R. Nusse, Stanford University, USA

M. Schneider, Lund University, Schweden

Vorhandene forschungsrelevante Großgeräte Specialised Research Equipment

Fluoreszenzmikroskop Zeiss AxioImager Z1 m. Apotom

Fluoreszenz-Stereomikroskop Leica MZ16-FA

Konfokales Laser Scanning Mikroskop Zeiss LSM 510 Meta