

## Institut für Molekular- und Zellphysiologie

### ■ Direktor: Prof. Dr. Bernhard Brenner

Tel.: 0511/532-6397 • E-Mail: Brenner.Bernhard@MH-Hannover.de • [www.mh-hannover.de/molzell.html](http://www.mh-hannover.de/molzell.html)

### Forschungsprofil

Seit vielen Jahren stehen die molekularen Grundprinzipien der Funktion der sog. Motorproteine im Zentrum der wissenschaftlichen Interessen des Instituts. Diese Motorproteine treiben praktisch alle bekannten Bewegungs- und Transportprozesse an, beispielsweise intrazelluläre Transportphänomene, Formänderungen von Zellen sowie verschiedensten Arten der Fortbewegung von Zellen und Organismen. Die vielfältigen Transport- und Bewegungsphänomene werden von Motorproteinen aus drei Familien angetrieben, den Myosinen, die mit Aktinfilamenten interagieren, sowie den Dyneinen und Kinesinen. Diese erzeugen Kräfte und Bewegungen im Zusammenspiel mit den Mikrotubuli des Zytoskeletts.

Die Relevanz dieser Motorproteine wird durch eine Vielzahl von Erkrankungen verdeutlicht, die auf Veränderungen in den Motorproteinen selbst oder assoziierten Proteinen beruhen. Beispiele sind die Familiäre hypertrophe Kardiomyopathie (FHC oder HCM), degenerative Erkrankungen der Motoneurone, die Alzheimer-Demenz oder die Metastasierung von Tumoren.

Ein Schwerpunkt unserer Forschung ist aufzuklären, wie Mutationen in Motorproteinen deren molekulare Funktionsprinzipien verändern und zum Krankheitsbild der familiären hypertrophen Kardiomyopathie führen können. Die Aufklärung der direkten funktionellen Auswirkungen solcher FHC-assoziierten Mutationen kann einerseits Ansatzpunkte für korrigierende pharmakologische Beeinflussung der primären Funktionsstörungen und des resultierenden Krankheitsbildes eröffnen, andererseits erlauben die direkten funktionellen Auswirkungen solcher Mutationen Einblick in die molekularen Funktionsprinzipien der Motorproteine.

Bisher waren wir für unsere Untersuchungen zur familiären hypertrophen Kardiomyopathie auf skelettmuskuläre Biopsien und Myokardproben aus Myektomien oder aus Transplantaten betroffener FHC-Patienten angewiesen. Um von solchen Proben unabhängiger zu werden und auch longitudinale Studien zur Pathogenese der FHC angehen zu können, oder auch Mutationen untersuchen zu können, für die wir keinen Zugang zu Patientenproben haben, etablieren wir derzeit drei Ansätze. Einerseits die Expression von Kopfdomänen des kardialen Myosins in C2C12 Myotuben, andererseits die Differenzierung von Kardiomyozyten aus induzierten pluripotenten Stammzellen, die aus Hautfibroblasten betroffener Patienten generiert werden, und schließlich drittens die Entwicklung eines Großtiermodells (Schwein), das erlaubt, die Entwicklung des Phänotyps der familiären hypertrophen Kardiomyopathie im Detail zu verfolgen.

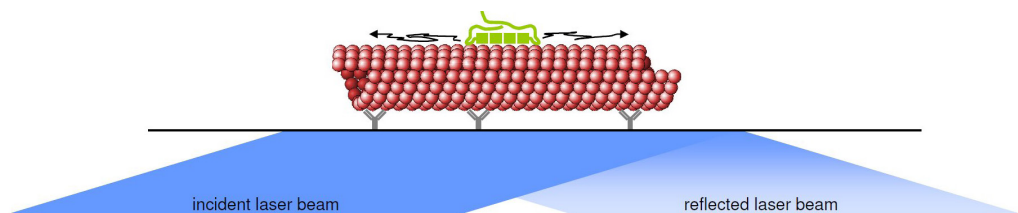
Zur funktionellen Charakterisierung der Proben haben wir ein breites Methodenspektrum etabliert, um auch an kleinsten Proben, z.B. Myofibrillen oder direkt am Einzelmolekül mittels Laserfalle und TIRF-Mikroskopie, funktionelle Auswirkungen von FHC-Mutationen erkennen und charakterisieren zu können.

## Forschungsprojekte

### Zelluläre Verteilungsmechanismen des mit der Alzheimer-Krankheit assoziierten Tau Proteins

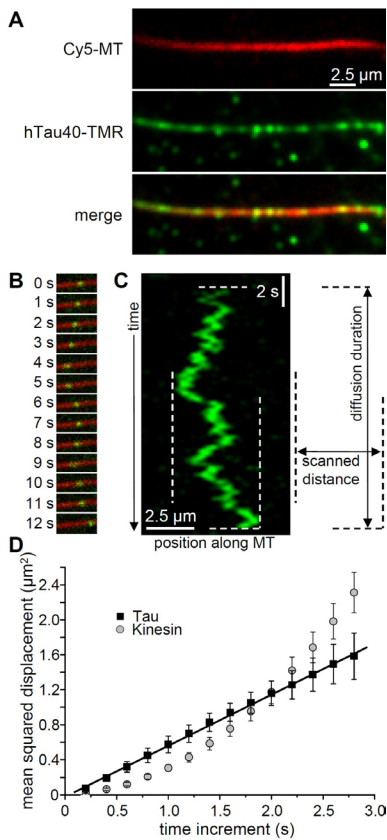
Tau is a structural microtubule-associated protein (MAP) which is located predominantly in the axons of neurons where it supports assembly and stabilization of microtubules. In many neurodegenerative diseases like Alzheimer disease Tau protein is highly expressed, mislocated to the somatodendritic compartment, and forms pathological aggregates (paired helical filaments, PHF). It was found that overexpression of Tau in axons inhibits anterograde vesicle and organelle transport, and interferes in vitro with kinesin and dynein motile functions. However, despite this interference with microtubule-dependent and motor-driven transport Tau protein is still able to disperse along axons. This led to the proposal of different mechanisms, and their combinations, for physiological distribution of tau in cells: co-transport with short microtubule-fragments along microtubules, kinesin-driven transport, and Tau diffusion in the cytoplasm. As some members of the microtubule-dependent kinesin motors family as well as the dynein/dynactin complex were shown to exhibit one-dimensional Brownian motion along MTs, we hypothesized that diffusive behaviour along their microtubule tracks could also be relevant for Tau.

We used single molecule Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) microscopy to probe for diffusion of individual fluorescently labelled Tau molecules along microtubules (Figure 1). This allowed us to avoid the problem that microtubule-dependent diffusion could be masked by excess of labelled Tau in solution that might occur in in vivo overexpression experiments.



**Fig. 1:** Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy assay of individual fluorescently labelled Tau molecules (green) diffusing along antibody (black) bound microtubules (red).

We found that about half of the individually detected Tau molecules moved bi-directionally along microtubules over distances up to several micrometers (Figure 2). Diffusion parameters such as diffusion coefficient, interaction time, and scanned microtubule length did not change with Tau concentration. Tau binding and diffusion along the microtubule lattice, however, were sensitive to ionic strength and pH and drastically reduced upon enzymatic removal of the negatively charged carboxy termini of tubulin, the building blocks of microtubules. This suggests that Tau uses the C-terminus of tubulin as an interaction partner for diffusion along the microtubule lattice.



**Fig. 2:** Tau molecules diffuse along microtubules. (A) TIRF microscopy images of a Cy5 labelled microtubule (red) and TMR labelled Tau molecules (green). Tau shows clear colocalization and enrichment on Cy5 labelled microtubules. (B) Sequential frames of a TMR labelled Tau molecule (green) moving along an immobilized Cy5 labelled microtubule (red) in the absence of ATP. Time intervals as indicated. (C) Kymograph of the movement of the Tau molecule shown in B. Horizontal dashed lines indicate start and end of diffusive interaction, respectively. The extreme positions along the microtubule reached during this diffusive encounter of ~ 15 s are depicted as vertical dashed lines. (D) Mean squared displacement  $\langle x^2 \rangle$  of the same Tau molecule (black squares) plotted against time increment, i.e. different time intervals over which displacement was determined. Data fitted by a linear regression (black line) to the equation  $\langle x^2 \rangle = 2Dt$  yield a diffusion coefficient  $D$  of ~0.3 µm<sup>2</sup>/s. As an example for directed motion the gray circles depict data derived from a single kinesin-1 molecule moving linearly along a microtubule with a speed of ~0.5 µm/s in the presence of 1 mM ATP. Error bars represent the SEM of the squared displacement values.

We propose one-dimensional Tau diffusion guided by the microtubule lattice as one possible additional mechanism for Tau distribution. By such one-dimensional microtubule lattice diffusion, Tau could be guided to both microtubule ends, i.e. the sites where Tau is needed during microtubule polymerisation, independently of directed motor-dependent transport. This could be important especially in conditions where active transport along microtubules might be compromised.

■ Projektleitung: Scholz, Tim (Dr.); Kooperationspartner: Mandelkow, Eckhard (Prof. Dr.), DZNE und CAESAR Institut, Bonn; van Ham, Marco (Dr.), HZI Braunschweig; Walter, Wilhelm (Dr.), TU Dresden; Förderung: DFG, StrucMed

## Weitere Forschungsprojekte

### Funktionelle Auswirkungen von FHC-assoziierten Mutationen in der Myosin-Kopfdomäne. Biomechanische Untersuchungen an einzelnen Muskelfasern aus M. soleus-Biopsien von FHC-Patienten

■ Projektleitung: Kraft, Theresia (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Francino, Antonio (Dr.), Hospital Clinic, Barcelona, E; Navarro-Lopez, Francesc (Prof. Dr.), Hospital Clinic, Barcelona, E; Perrot, Andreas, Charité, Berlin; Bauersachs, Johann (Prof. Dr.), Klinik f. Kardiologie und Angiologie, MHH; Thum, Thomas (Prof. Dr.), IFB-Molekulare und Translationale Therapiestrategien, MHH; Schmidtke, Jörg (Prof. Dr.), Institut f. Humangenetik, MHH; Stuhmann-Spangenberg, Manfred (Prof. Dr.), Institut f. Humangenetik, MHH; McKenna, William (Prof. Dr.), The Heart Hospital, Univ. College London, UK; Förderung: DFG

**Hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie: Genotypisierung und Charakterisierung des molekularen Phänotyps durch Untersuchungen an Myektomieproben**

■ Projektleitung: Kraft, Theresia (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Perrot, Andreas, Charité, Berlin; Thum, Thomas (Prof. Dr.), IFB-Molekulare und Translationale Therapiestrategien, MHH; Francino, Antonio (Dr.), Hospital Clinic, Barcelona, E; Navarro-Lopez, Francesc (Prof. Dr.), Hospital Clinic, Barcelona, E; Dos Remedios, Christobal (Prof. Dr.), Univ. Sydney, AUS; Fokstuen, Siv (Dr.), Centre Médical Universitaire, Genf, CH; Förderung: DFG, StrucMed, MHH

**Kardiomyozyten aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen als in vitro Modell der Familiären Hypertrophen Kardiomyopathie**

■ Projektleitung: Kraft, Theresia (Prof. Dr.); Brenner, Bernhard (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Zweigerdt, Robert (Dr.) HTTG Chirurgie, MHH; Martin, Ulrich (Prof. Dr.), HTTG Chirurgie, MHH; Francino, Antonio (Dr.), Hospital Clinic, Barcelona, E; Navarro-Lopez, Francesc (Prof. Dr.), Hospital Clinic, Barcelona, E

**Generierung eines knock-in FHC-Schweinemodells mit Punktmutation im  $\beta$ -kardialen Myosin zur Charakterisierung der Pathogenese der FHC**

■ Projektleitung: Brenner, Bernhard (Prof. Dr.); Kraft, Theresia (Prof. Dr.); Montag, Judith (Dr.); Kooperationspartner: Niemann, Heiner (Prof. Dr.), FLI Mariensee; Petersen, Björn (Dr.), FLI Mariensee

**Expressionsanalyse mutierter  $\beta$ -Myosin-mRNA in laser-mikrodissektierten Kardiomyozyten aus Patienten mit Familiärer Hypertropher Kardiomyopathie**

■ Projektleitung: Montag, Judith (Dr.); Kraft, Theresia (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Wissel, Kirsten (Dr.), HNO-Klinik, MHH; Francino, Antonio (Dr.), Hospital Clinic, Barcelona, E; Navarro-Lopez, Francesc (Prof. Dr.), Hospital Clinic, Barcelona, E; Perrot, Andreas, Charité, Berlin; Förderung: HiLF, MHH

**Relative Quantifizierung des Anteils an wildtyp - und mutiertem  $\beta$ -kardialem Myosin auf mRNA und Protein-Ebene in myokardialem Gewebe und Soleusbiopsien von FHC-Patienten**

■ Projektleitung: Montag, Judith (Dr.); Kraft, Theresia (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Pich, Andreas (Prof. Dr.), Toxikologie, MHH; Francino, Antonio (Dr.), Hospital Clinic, Barcelona, E; Navarro-Lopez, Francesc (Prof. Dr.), Hospital Clinic, Barcelona, E; Perrot, Andreas, Charité, Berlin; Förderung: DFG, StrucMed, MHH

**Analyse der molekularen Mechanismen der allelischen Imbalance bei FHC**

■ Projektleitung: Montag, Judith (Dr.); Kraft, Theresia (Prof. Dr.); Förderung: DFG, StrucMed, MHH

**Charakterisierung von Veränderungen der Kontraktionseigenschaften und  $Ca^{++}$ -Transienten isolierter Kardiomyozyten bei Hypertrophie-Entwicklung von Mäusen mit muscle RING finger (MuRF) Protein-knock-out**

■ Projektleitung: Geers-Knörr, Cornelia (Dr.); Kraft, Theresia (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Fielitz, Jens (Prof. Dr.), Charité, MDC, Berlin; Förderung: DFG

**ATP-Umsatz des individuellen Myosinmoleküls. Analyse mittels TIRF-Mikroskopie**

■ Projektleitung: Brenner, Bernhard (Prof. Dr.); Amrute-Nayak, Mamta (Dr.); Kooperationspartner: Kojima, Hiroaki (Dr.) KARC, Kobe, Japan; Förderung: DFG

**Single molecule studies on  $\beta$ -cardiac myosin heavy chain mutations linked to hypertrophic cardiomyopathy (HCM) in humans**

■ Projektleitung: Amrute-Nayak, Mamta (Dr.); Förderung: HiLF, MHH

**Kraftbeitrag und Molekülsteifheit im Verlauf des Myosin-Kraftschlages. Mikromechanische Messungen am individuellen Myosinmolekül mittels optischer Pinzette.**

■ Projektleitung: Brenner, Bernhard (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Steffen, Walter (PD Dr.), Molekular- u. Zellphysiologie, MHH; Förderung: DFG

**Molekulare Grundlage der Funktionsweise von Myosin 2**

■ Projektleitung: Steffen, Walter (PD Dr.), Molekular- u. Zellphysiologie, MHH; Kooperationspartner: Brenner, Bernhard (Prof. Dr.), Molekular- u. Zellphysiologie, MHH; Manstein, Dietmar (Prof. Dr.), Biophysikalische Chemie, MHH; Chantler, Peter (Prof. Dr.), Royal Veterinary School, London, UK; Förderung: DFG

**Charakterisierung der Motormechanik einzelner Dyneinmoleküle mit Hilfe der optischen Falle**

■ Projektleitung: Steffen, Walter (PD Dr.), Molekular- u. Zellphysiologie, MHH; Kooperationspartner: Koonce, Michael (Dr.), Wadsworth Center, Albany, NY, USA; Kon, Takahide (Prof. Dr.), Osaka University, Japan; Förderung: DFG

**Funktionelle Charakterisierung von Myofibrillen aus Myektomieproben bei hypertrophisch obstruktiver Form der FHC (HOCM)**

■ Projektleitung: Jorga, Bogdan (Dr.), Kraft, Theresia (Prof. Dr.), Brenner, Bernhard (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Perrot, Andreas, Charité, Berlin; Förderung: DFG

**3D Rekonstruktion der Motordomäne des muskulären Myosins in verschiedenen Zwischenzuständen der ATP-Hydrolyse**

■ Projektleitung: Hodgkinson, Julie Lynne (Dr.); Kooperationspartner: Brenner, Bernhard (Prof. Dr.), Molekular- u. Zellphysiologie, MHH; Morris, Edward (Dr.), The Institute of Cancer Research, London, UK

**Wirkungsmechanismen kleinmolekularer Hemmstoffe auf mitotische Kinesinmoleküle**

■ Projektleitung: Scholz, Tim (Dr.); Kooperationspartner: Kirschning, Andreas (Prof. Dr.), Organische Chemie, LUH; Schmidt, Christoph F. (Prof. Dr.), III. Physikalisches Institut, Universität Göttingen; Sasse, Florenz (Dr.), HZI Braunschweig; Förderung: StrucMed

**Klasse 1 Myosine als Regulatoren von Mikrotubulidynamik und Kinesinfunktion**

■ Projektleitung: Scholz, Tim (Dr.); Kooperationspartner: Tsiavalariis, Georgios (Prof. Dr.), Biophysikalische Chemie, MHH; Förderung: DFG

**Funktionelle Charakterisierung von FHC-assoziierten Mutationen in der Myosin-Kopfdomäne mittels des Aktinfilament-Gleitassays**

■ Projektleitung: Scholz, Tim (Dr.); Kraft, Theresia (Prof. Dr.); Brenner, Bernhard (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Francino, Antonio (Dr.), Hospital Clinic, Barcelona, E; Navarro-Lopez, Francesc (Prof. Dr.), Hospital Clinic, Barcelona, E; Perrot, Andreas, Charité, Berlin; Förderung: DFG

**CO<sub>2</sub>-Permeabilität biologischer Membranen: Untersuchungen der Mechanismen der Gaspermeation durch Membranproteine, die als Gaskanäle fungieren**

■ Projektleitung: Endeward, Volker (Dr.), Gros, Gerolf (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Hedfalk, Kristina (Prof. Dr.), Dept. Chemistry Biochemistry, University of Göteborg, SW; Cartron, Jean-Pierre (Dr.), Centre National de la Transfusion Sanguine, INSERM, Paris, FR; Rojek, Aleksandra (Dr.), Dept. Anatomy, University of Aarhus, DK; Deen, Peter M.T. (Prof. Dr.), Dept. Physiology, Radboud University Medical Centre, Nijmegen, NL; Förderung: DFG

**CO<sub>2</sub>-Permeabilität künstlicher Lipid-Bilayer-Membranen**

■ Projektleitung: Endeward, Volker (Dr.); Gros, Gerolf (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Itel, Fabian, Dept. Chemie, Univ. Baser, Schweiz; Förderung: DFG

## Mechanismus der Interaktion des Anionenaustauschers AE1 und der cytosolischen Carboanhydrase II

■ Projektleitung: Endeward, Volker (Dr.); Gros, Gerolf (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Supuran, Claudiu (Prof. Dr.), Dept. Chemistry, Universität Florenz, Italien; Sly, William S. (Prof. Dr.), Dept. Biochemistry and Molecular Biology, St. Louis University School of Medicine, St. Louis, USA; Alper, Seth (Prof. Dr.), Harvard University Medical School, Boston, USA; Papadopoulos, Symeon (Prof. Dr.), Institut für Physiologie, Universität Köln; Förderung: DFG

## Mechanismen der metabolischen Anpassung bei der Weiß-Rot-Transformation des Skelettmuskels. Untersuchungen der Auswirkung von Ca<sup>2+</sup>-Ionophor bzw. verschiedener Glukosekonzentrationen auf die Aktivität von Energiestoffwechsellzymen sowie die mRNA-Expression und Promoteraktivität ihrer Gene

■ Projektleitung: Meißner, Joachim (Dr.); Gros, Gerolf (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Scheibe, Renate (Dr.), Physiologische Chemie, MHH; Umeda, P.K. (Prof. Dr.), University of Alabama, Birmingham, USA; Chang, K.-C. (Prof. Dr.), Faculty of Medicine & Health Sciences, University of Nottingham, UK; Kubis, Hans-Peter (Dr.), School of Sport, Health and Exercise Sciences, University of Bangor, UK

## Originalpublikationen

Brenner B, Hahn N, Hanke E, Matinmehr F, Scholz T, Steffen W, Kraft T. Mechanical and kinetic properties of beta-cardiac/slow skeletal muscle myosin. *J Muscle Res Cell Motil*; 2012;33(6):403-417

Endeward V. The rate of the deoxygenation reaction limits myoglobin- and hemoglobin-facilitated O<sub>2</sub> diffusion in cells. *J Appl Physiol*; 2012;112(9):1466-1473

Hinrichs MH, Jalal A, Brenner B, Mandelkow E, Kumar S, Scholz T. Tau protein diffuses along the microtubule lattice. *J Biol Chem*; 2012;287(46):38559-38568

Itel F, Al-Samir S, Oberg F, Chami M, Kumar M, Supuran CT, Deen PM, Meier W, Hedfalk K, Gros G, Endeward V. CO<sub>2</sub> permeability of cell membranes is regulated by membrane cholesterol and protein gas channels. *FASEB J*; 2012;26(12):5182-5191

Kumarswamy R, Lyon AR, Volkman I, Mills AM, Bretthauer J, Pahuja A, Geers-Knörr C, Kraft T, Hajjar RJ, Macleod KT, Harding SE, Thum T. SERCA2a gene therapy restores microRNA-1 expression in heart failure via an Akt/FoxO3A-dependent pathway. *Eur Heart J*; 2012;33(9):1067-1075

Walter WJ, Koonce MP, Brenner B, Steffen W. Two independent switches regulate cytoplasmic dynein's processivity and directionality. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 2012;109(14):5289-5293

## Abstracts

2012 wurden 17 Abstracts publiziert.

## Promotionen

Al-Samir, Samer (Dr. rer. nat.): Mechanismen des CO<sub>2</sub>- und HCO<sub>3</sub>-Transports an Zellmembranen.

## Bachelor

Jablonski, J (B.Sc.): Direkte Beobachtung des ATP-Umsatzes am individuellen Myosinmolekül mittels TIRF-Mikroskopie.

Kestner, M (B.Sc.): Einführung der V606M-Mutation in ein MYH7-Minigen.

## Weitere Tätigkeiten in der Forschung

Brenner, Bernhard (Prof. Dr.): Gutachter für diverse Forschungsförderungs-Institutionen, diverse Zeitschriften.

Kraft, Theresia (Prof. Dr.): Gutachter DFG, diverse Zeitschriften.

Steffen, Walter (PD Dr.): Gutachter für diverse Zeitschriften.

Scholz, Tim (Dr.): Gutachter für diverse Zeitschriften.

Gros, Gerolf (Prof. Dr.): Gutachter für diverse Forschungsförderungs-Institutionen und Zeitschriften.

Endeward, Volker (Dr.): Gutachter für diverse Zeitschriften.

Meißner, Joachim (Dr.): Gutachter für diverse Zeitschriften.