

## Institut für Klinische Chemie

### ■ Direktor: Prof. Dr. Korbinian Brand

Tel.: 0511/532-6614 • E-Mail: brand.korbinian@mh-hannover.de • [www.mh-hannover.de/zentrallabor.html](http://www.mh-hannover.de/zentrallabor.html)

- Keywords: Signalübertragung/Genregulation, Molekulare Diagnostik, Referenzsysteme/Drug Monitoring, Toleranz, Auflösung von Entzündung, Monozyten/Makrophagen, NF-kappaB, C/EBPbeta, Lymphozytenbiologie, Lungentzündung, Virale Infektion, Allergie, Mastzellen, Membrane Trafficking, Aktin-Zytoskelett

## Forschungsprofil

Die wissenschaftliche Tätigkeit unseres Instituts ist auf folgende Schwerpunkte ausgerichtet:

### 1. Untersuchung von Mechanismen der Signalübertragung in monozytären Zellen (Leitung: Prof. Dr. Brand, Dr. Huber)

Übergeordnetes Ziel unserer Forschungstätigkeit ist ein besseres Verständnis von Mechanismen der Signalübertragung in monozytären Zellen mit Bezug zu entzündlich-immunologischen Prozessen. Ein Schwerpunkt stellt dabei die Untersuchung von Mechanismen dar, die an der Terminierung inflammatorischer Signalübertragung beteiligt sind. Ein weiteres Ziel ist die Analyse von Signalwegen, die zur monozytären Differenzierung beitragen. Diese Mechanismen besitzen eine Relevanz für akute und chronische entzündliche Erkrankungen.

### 2. Zelluläre und molekulare Mechanismen von Entzündungsreaktionen (Leitung: Prof. Dr. Lee, Dr. Föger)

Die Forschungsgruppe für Entzündungsforschung (Leitung Prof. Lee) untersucht neuartige regulatorische Motive bei Entzündungsreaktionen in Hinblick auf die Immunabwehr gegen Infektionen. Das übergreifende Forschungsziel ist hierbei die Identifizierung molekularer und zellulärer Schlüsselmechanismen die Virus-induzierten Entzündungsreaktionen zugrunde liegen, als auch die Entwicklung neuartiger Perspektiven für klinische Anwendungen. Die Studien verfolgen einen multidisziplinären Forschungsansatz, bei dem zellbiologische, immunologische und genetische Methoden in Kombination mit Tier- und Krankheitsmodellen eingesetzt werden.

### 3. Molekulare Diagnostik (Leitung: Prof. Dr. Lichtinghagen)

In diesen Projekten sollen molekulare Ansätze für verschiedene diagnostische Verfahren erarbeitet werden, z.B. Analyse der Pharmakogenetik bzw. Identifizierung diagnostischer und/oder prognostischer Marker bei verschiedenen Krankheitsbildern (Immunsuppression, Schlaganfall, chronische Entzündung).

### 4. Referenzsysteme und Drug Monitoring (Leitung: Prof. Dr. Brand, Dr. Grote-Koska)

In diesen Projekten wurden Referenzsysteme für Messgrößen im Serum untersucht und entwickelt, z.B. zur Bestimmung des pH, von Elektrolyt- und Substratkonzentrationen, sowie für verschiedene Pharmaka im Plasma oder Blut. Das Kalibrierlabor ist akkreditiert nach ISO 17025 und ISO 15195, seine Kompetenz für die Kalibrierung von standardisierten Verfahren zur Bestimmung katalytischer Enzymkonzentrationen ist international anerkannt. Darüber hinaus wurde mit LC-MS/MS ein Referenzverfahren für das Immunsuppressivum Cyclosporin A aufgebaut. Nach erfolgreicher Etablierung ist die Entwicklung weiterer Referenzverfahren für Immunsuppressiva (Sirolimus, Everolimus, Tacrolimus) geplant. Bezüglich des Drug Monitorings dieser vier Immunsuppressiva ist im Rahmen einer Firmenkooperation die Tauglichkeit eines neuartigen Messsystems für die Routine-Analytik von Patientenproben untersucht worden.

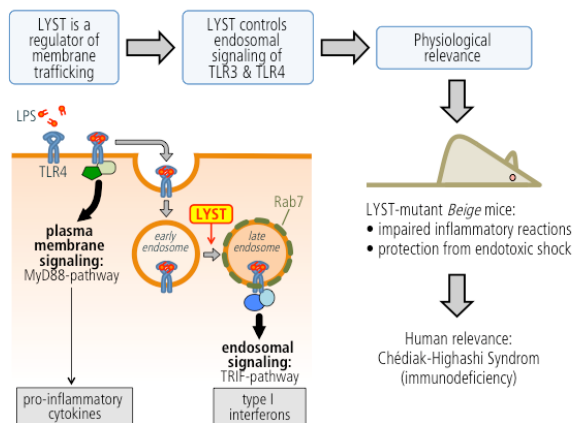
## Ausgewähltes Forschungsprojekt

### Identification of novel regulatory mechanisms for inflammatory responses and septic shock

The Inflammation Research Group (Head: Prof. Lee) for investigates novel regulatory principles that play a critical role for Toll-like receptor (TLR)-mediated inflammatory responses. Here the group is working intensively on a molecule called LYST, a lysosomal trafficking regulator that is defective in patients with Chédiak-Higashi syndrome (CHS). CHS and its orthologous murine disorder *beige* are characterized by defects in endolysosomal biogenesis that result in enlarged lysosome-related structures due to mutations in the LYST gene. CHS patients suffer from recurrent bacterial infections due to severe immune defects. The mechanistic link between altered lysosomal organization in LYST-mutant cells and the immunological pathophysiology of CHS is, however, still only poorly understood.

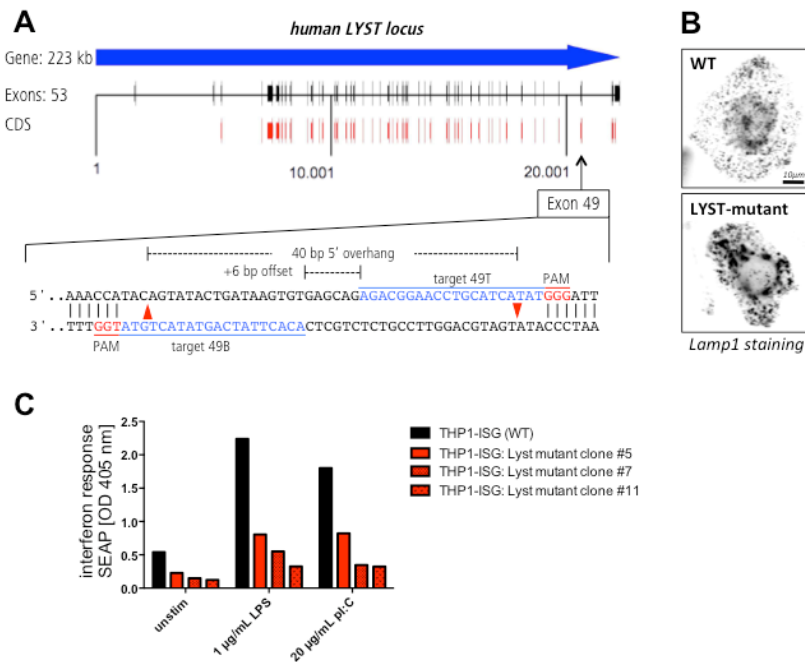
Our studies revealed that lysosomal trafficking regulator LYST links endolysosomal organization to specific TLR signaling pathways. By utilizing *Lyst*-mutant *beige* mice we could demonstrate in *in vitro* and *in vivo* experiments that LYST selectively controls TLR3- and TLR4-mediated pro-inflammatory responses. Consequently, *Lyst* mutant *beige* mice showed increased susceptibility to bacterial infection and were largely resistant to endotoxin-induced septic shock.

Mechanistic analysis in LYST-mutant cells showed defective TLR3- and TLR4-induced phosphorylation and nuclear translocation of IRF3, a key event in the so called TRIF-signaling pathway. The TRIF-pathway is transduced from endosomal structures and is an integral component of TLR3 and TLR4 signaling that is not utilized by any other TLR. While the relevance of TLR3/4-mediated TRIF pathways for protective immunity is well demonstrated for many infectious diseases, the specific subcellular localization of endosomal TRIF signaling is still not very well defined. Microscopy studies revealed that loss of functional LYST leads to dysregulated endolysosomal trafficking of TLR4 due to defective phagosomal maturation. LYST-mutant cells showed defective conversion from EEA1+ early phagosomes to Rab7+ late phagosomal compartments. In further imaging studies we were able to directly visualize the localization of TRIF-mediated signaling events at Rab7+ late endosomal/phagosomal compartments in primary macrophages. These studies provide first direct evidence that Rab7+ compartments serve as an important signaling platform for TRIF-mediated TLR signaling. Moreover, the data reveal a novel function of LYST that couples the regulation of endolysosomal trafficking to specific TLR-signaling pathways (TLR3- and TLR4-mediated endosomal TRIF signaling).



**Abb. 1:** Model: Regulation of TLR3- & TLR4-mediated endosomal signaling and inflammatory reactions by lysosomal trafficking regulator LYST.

To explore whether the immunoregulatory function of LYST on selected TLR pathways is conserved in human cells, we generated LYST-mutant human monocytic THP1 cells by utilizing the recently developed CRISPR/Cas9 genome editing technology. In our mutational approach we specifically targeted the WD40 domain of human LYST, as mutations within this region have been described in patients with CHS and the beige mutation in LYST-mutant mice also affects this domain. LYST-mutant THP1 cells displayed enlarged lysosome-related structures, a classic diagnostic feature of CHS. Importantly, consistent with our results in beige cells, LYST-mutant THP-1 cells were severely compromised in their ability to activate the TRIF-dependent interferon response upon stimulation with TLR3 or TLR4 ligands. Thus, by employing CRISPR/Cas9-mediated gene inactivation, we were able to confirm the immunoregulatory role of LYST on TLR-signaling pathways in human cells. Defects in TLR3- and TLR4-mediated endosomal TRIF-signaling likely also contribute to the high susceptibility of CHS patients to infections.



**Abb. 2:** CrispR/Cas9-mediated genome editing reveals impaired TLR3- and TLR4-induced interferon responses in LYST-mutant human cells. (A) Strategy for Cas9-mediated double nicking (red arrows) in exon 49 of human LYST. Target sequences (blue) and protospacer-adjacent motifs (PAMs) (red) are indicated. (B) Immunofluorescence staining with anti-Lamp1 reveals enlarged lysosome-related structures in LYST-mutant human THP1 cells. (C) LYST-mutant THP1-ISG cells, that carry a SEAP reporter construct for interferon-stimulated genes, exhibit impaired interferon responses upon stimulation with Poly:C (TLR3 ligand) and LPS (TLR4 ligand).

Taken together, the identification of Lyst as a specific regulator of TLR3- and TLR4-mediated TRIF signaling pathways in mice and humans reveals how the regulation of the intracellular membrane trafficking network is functionally linked to specific TLR signaling pathways. Importantly, the results highlight the significance of this interrelation for inflammatory reactions in vivo. The findings do not only have implications for our understanding of normal and pathophysiological processes during inflammatory reactions, but may also open up prospects for future therapeutic interventions by specifically targeting intracellular TLR trafficking routes.

■ Projektleitung: Lee, Kyeong-Hee (Prof. Dr. rer. nat.); Föger, Niko (Dr. rer. nat.); Förderung: DFG (LE 1254/3-1)

## Weitere Forschungsprojekte (mit Stichtag 01.12.2015)

### Charakterisierung des LMTP-Signalprinzips in myelomonozytären Zellen am Beispiel von C/EBPbeta

■ Projektleitung: Brand, Korbinian (Prof. Dr. med.); Förderung: DGKL

### Novel regulatory themes in TLR-receptor signal transduction and inflammation

■ Projektleitung: Lee, Kyeong-Hee (Prof. Dr. rer. nat.); Förderung: DFG (LE 1254/3-1)

### The role of actin-regulatory proteins for mast cell mediated allergic reactions

■ Projektleitung: Föger, Niko (Dr. rer. nat.); Förderung: DFG (FO 688/2-1)

### Diagnostic and therapeutic potential of Toso-specific antibodies in inflammatory disease

■ Projektleitung: Lee, Kyeong-Hee (Prof. Dr. rer. nat.); Förderung: Stiftung für Pathobiochemie und Molekulare Diagnostik

### Toso (Faim3) in T cell activation, survival and memory generation

■ Projektleitung: Lee, Kyeong-Hee (Prof. Dr. rer. nat.); Förderung: DFG (LE 1254/2-2)

### Entwicklung von Referenzsystemen für international standardisierte Messverfahren zur Bestimmung katalytischer Enzymkonzentrationen sowie für die Bestimmung von Pharmaka (z.B. Immunsuppressiva, Antiepileptika), Proteine (z.B. Gesamt-Hämoglobin), Elektrolyt- und Substratkonzentrationen bzw. die pH-Messung

■ Projektleitung: Grote-Koska, Denis (Dr. rer. nat.); Brand, Korbinian (Prof. Dr. med.); Förderung: DGKL

### Entwicklung eines Referenzsystems zur Bestimmung der katalytischen Konzentration von Lipase im Serum

■ Projektleitung: Grote-Koska, Denis (Dr. rer. nat.); Brand, Korbinian (Prof. Dr. med.); Förderung: IFCC, DGKL

### Systemic analysis of E3 ubiquitin ligases required for monocyte differentiation

■ Projektleitung: Christmann, Martin (Dr. rer. nat.); Förderung: DGKL

### Characterization of the effect of different anticoagulants on the regulation of matrix metalloprotease-9 and the identification of participating signaling pathways and transcription factors

■ Projektleitung: Lichtinghagen, Ralf (Prof. Dr. rer. nat.); Abedalkhader, Rozan (M.Sc.); Kooperationspartner: Weißenborn, Karin (Prof. Dr. med.); Förderung: DGKL

### Charakterisierung von molekularen Mechanismen der TNF-Toleranz

■ Projektleitung: Brand, Korbinian (Prof. Dr. med.); Förderung: DGKL

### Diagnostische und prognostische Marker unter Berücksichtigung multiparametrischer Ansätze bei chronischen Lebererkrankungen und beim Schlaganfall

■ Projektleitung: Lichtinghagen, Ralf (Prof. Dr. rer. nat.); Kooperationspartner: Weißenborn, Karin (Prof. Dr. med.), Klinik für Neurologie, Worthmann, Hans (Dr. med.), Klinik für Neurologie; Förderung: Siemens

#### Originalpublikationen

Balzer MS, Gross MM, Lichtinghagen R, Haller H, Schmitt R. Got Milk? Breastfeeding and Milk Analysis of a Mother on Chronic Hemodialysis. PLoS One 2015;10(11):e0143340

Beckmann EA, Köhler AM, Meister C, Christmann M, Draht OW, Rakebrandt N, Valerius O, Braus GH. Integration of the catalytic subunit activates deneddylase activity in vivo as final step in fungal COP9 signalosome assembly. Mol Microbiol 2015;97(1):110-124

Ettinger M, Calliess T, Kielstein JT, Sibai J, Brückner T, Lichtinghagen R, Windhagen H, Lukas A. Circulating Biomarkers for Discrimination Between Aseptic Joint Failure, Low-Grade Infection And High-Grade Septic Failure. Clin Infect Dis 2015;61(3):332-341

Frenzel E, Wrenger S, Brügger B, Salipalli S, Immenschuh S, Aggarwal N, Lichtinghagen R, Mahadeva R, Marcondes AM, Dinarello CA, Welte T, Janciauskiene S. alpha1-Antitrypsin Combines with Plasma

Fatty Acids and Induces Angiotensin-like Protein 4 Expression. *J Immunol* 2015;195(8):3605-3616

Haufe S, Kaminski J, Utz W, Haas V, Mähler A, Daniels MA, Birkenfeld AL, Lichtinghagen R, Luft FC, Schulz-Menger J, Engeli S, Jordan J. Differential response of the natriuretic peptide system to weight loss and exercise in overweight or obese patients. *J Hypertens* 2015;33(7):1458-1464

Heberlein A, Büscher P, Schuster R, Kleimann A, Lichtinghagen R, Rhein M, Kornhuber J, Bleich S, Frieling H, Hillemacher T. Do changes in the BDNF promoter methylation indicate the risk of alcohol relapse? *Eur Neuropsychopharmacol* 2015;25(11):1892-1897

Huber R, Panterodt T, Welz B, Christmann M, Friesenhagen J, Westphal A, Pietsch D, Brand K. C/EBPbeta-LAP<sup>\*</sup>/LAP Expression Is Mediated by RSK/eIF4B-Dependent Signalling and Boosted by Increased Protein Stability in Models of Monocytic Differentiation. *PLoS One* 2015;10(12):e0144338

Kahl KG, Schweiger U, Pars K, Kunikowska A, Deuschle M, Gutberlet M, Lichtinghagen R, Bleich S, Hüper K, Hartung D. Adrenal gland volume, intra-abdominal and pericardial adipose tissue in major depressive disorder. *Psychoneuroendocrinology* 2015;58:1-8

Karlas T, Dietrich A, Peter V, Wittekind C, Lichtinghagen R, Garnov N, Linder N, Schaudinn A, Busse H, Prettin C, Keim V, Tröltzsch M, Schütz T, Wiegand J. Evaluation of Transient Elastography, Acoustic Radiation Force Impulse Imaging (ARFI), and Enhanced Liver Function (ELF) Score for Detection of Fibrosis in Morbidly Obese Patients. *PLoS One* 2015;10(11):e0141649

Kubagawa H, Carroll MC, Jacob CO, Lang KS, Lee KH, Mak T, McAndrews M, Morse HC 3rd, Nolan GP, Ohno H, Richter GH, Seal R, Wang JY, Wiestner A, Coligan JE. Nomenclature of Toso, Fas apoptosis inhibitory molecule 3, and IgM FcR. *J Immunol* 2015;194(9):4055-4057

Lapke N, Tartz S, Lee KH, Jacobs T. The application of anti-Toso antibody enhances CD8(+) T cell responses in experimental malaria vaccination and disease. *Vaccine* 2015;33(48):6763-6770

Lau T, Wrann C, Hoffmann-Castendiek B, Pietsch D, Hubner L, Kielstein H. Altered NK cell function in obese healthy humans. *BMC Obesity* 2015;2(1):1

Schäfer T, Klintschar M, Lichtinghagen R, Plagemann I, Smith A, Budde E, Hagemeyer L. Xanthochromia of the skull bone associated with HbA1c. *Forensic Sci Int* 2016;260:54-58

Schrimpf C, Gillmann HJ, Sahlmann B, Meinders A, Larmann J, Wilhelm M, Aper T, Rustum S, Lichtinghagen R, Theilmeier G, Teebken OE. Renal function interferes with copeptin in prediction of major adverse cardiac events in patients undergoing vascular surgery. *PLoS One* 2015;10(4):e0123093

Witt L, Glage S, Lichtinghagen R, Pape L, Boethig D, Dennhardt N, Heiderich S, Leffler A, Sümpelmann R. Impact of high doses of 6% hydroxyethyl starch 130/0.42 and 4% gelatin on renal function in a pediatric animal model. *Paediatr Anaesth* 2016;26(3):259-265

Worthmann H, Tryck AB, Dirks M, Schuppner R, Brand K, Klawonn F, Lichtinghagen R, Weissenborn K. Lipopolysaccharide binding protein, interleukin-10, interleukin-6 and C-reactive protein blood levels in acute ischemic stroke patients with post-stroke infection. *J Neuroinflammation* 2015;12(1):13-014-0231-2

Yee CS, Massaad MJ, Bainter W, Ohsumi TK, Föger N, Chan AC, Akarsu NA, Aytakin C, Ayvaz DC, Tezcan I, Sanal Ö, Geha RS, Chou J. Recurrent viral infections associated with a homozygous CORO1A mutation that disrupts oligomerization and cytoskeletal association. *J Allergy Clin Immunol* 2015;DOI: 10.1016/j.jaci.2015.08.020

### Abstracts

2015 wurden 9 Abstracts publiziert.

### Promotionen

Panterodt, Thomas (Dr. rer. nat.): Die Regulation des Transkriptionsfaktors CEBP $\beta$  während monozytärer Differenzierung.

### Wissenschaftspreise

Andreas Westphal: 4th European Congress of Immunology 2015: Poster Award; Thema: Lysosomal trafficking regulator Lyst links membrane trafficking to Toll-like receptor-mediated inflammatory Responses.

Jinbo Yu: Symposium 50 Jahre MHH: Best Clinical and Translational Poster Award; Thema: Toso links regulatory B cell function to T cell-dependent immune responses during viral infection.

### Weitere Tätigkeiten in der Forschung

Brand, Korbinian (Prof. Dr. med.): Eingeladener Redner und Chairman bei verschiedenen Veranstaltungen; Wissenschaftlicher Sekretär der Stiftung für Pathobiochemie und Molekulare Diagnostik der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL); Gutachter für folgende Institutionen: DFG, DGKL, div. Hochschulen (Lehrstuhlbesetzungen, Habilitationsverfahren); Gutachter für folgende Zeitschriften: Proceedings of the National Academy of Sciences; Marine Drugs; Journal of Endocrinology and Diabetes; Journal of the American Heart Association; Journal of Parasitology Research; Journal of Leukocyte Biology

Lichtinghagen, Ralf (Prof. Dr. rer. nat.): Eingeladener Redner und Chairman bei verschiedenen Veranstaltungen; Mitglied in der Weiterbildungskommission (Klinischer Chemiker) der DGKL; Veranstalter eines Repetitoriums für Klinische Chemiker und Laborärzte; Chair of the Education and Training Committee of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM); Mitglied im Editorial Board folgender Zeitschriften: Disease Markers (Hindawi Publishing Corporation); Gutachter für folgende Zeitschriften: Liver International; Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International; PLoS One; La Prensa Medica

Huber, René (Dr. rer. nat.): Gutachter für folgende Institutionen: DGKL; Gutachter für folgende Zeitschriften: Rheumatology; British Journal of Haematology; MedChemComm; Journal of Biological Chemistry

Grote-Koska, Denis (Dr. rer. nat.): Mitglied des Committee for Reference Systems of Enzymes (C-RSE) der IFCC mit wesentlicher Beteiligung an der Entwicklung einer international anerkannten Referenzmethode zur Bestimmung der Lipase im Serum. Eine Standardisierung der Messmethode stellt für die Bestimmung in der Patientenversorgung ein wichtiges Qualitätsmerkmal dar;

Delegierter des DIN und Experte für die Normung von Referenzsystemen bei der International Organization for Standardization (ISO), Technical Committee 212 (Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems), Working Group 2; Gutachter für folgende Zeitschriften: Journal of Clinical Laboratory Analysis