



IFTZ Integriertes Forschungs- und Therapiezentrum
MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT INNSBRUCK

Integriertes Forschungs- und Therapiezentrum (IFTZ)

Abschlussbericht



INHALTSVERZEICHNIS

I.	GELEITWORT.....	5
	Vize rektor Univ. Prof. i.R. Dr. Günther Sperk.....	
II.	GELEITWORT.....	6
	o.Univ.-Prof. Dr. Werner Poewe, Vorsitzender des IFTZ- Vorstands, Univ.-Klinik für Neurologie	
	Univ.-Prof. Dr. Lukas A. Huber, stellvertr. Vorsitzender des IFTZ- Vorstands, Biozentrum, Sektion für Zellbiologie	
III.	STRUKTUR DES IFTZ.....	7
IV.	PROJEKTÜBERSICHT	11
V.	ABSCHLUSSBERICHTE PROJEKTE	13
	1) Reticulons in the epileptic brain, Christine Bandtlow.....	13
	2) Antibodies as biological markers in multiple sclerosis: progressing from bench to bedside, Thomas Berger, Markus Reindl.....	17
	3) Spinocerebelläre Ataxie vom Typ 2 (SCA2): Zur CAG-Repeat abhängigen Translations-Induktion von Ataxin2 durch MID1 und deren potentiellen therapeutischen Inhibition durch Lithiumionen, Sylvia Bösch	23
	4) Cell Fate Analysis of Embryonal and Adult Stem Cell-Derived Grafts in the 6-OHDA Model of Parkinson’s Disease, Georg Dechant, Gregor Wenning.....	27
	5) Significance of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT-1) activation in primary tumors for treatment protocols, Wolfgang Doppler.....	31
	6) Tyrosine phosphorylation of p27Kip1 – prognostic and therapeutic potential, Ludger Hengst ..	37
	7) Regulation of antigen presenting properties of dendritic cells by the p14-MP1-MAP kinase scaffolding complex – studies in mouse models and humans, Lukas Huber, Nikolaus Romani.....	41
	8) NOGO receptors in nociception, Michaela Kress.....	49
	9) Der Rolle von Chromatin-modifizierenden Aktivitäten während der Oogenese und frühen Embryonalentwicklung, Alexandra Lusser	51
	10) Charakterisierung von Risiko- und Biomarkern der Parkinson-Krankheit, Klaus Seppi, Christoph Scherfler	53
	11) Bim and Bmf in Breast Cancer, Andreas Villunger	59
	12) Genomic instability and lymphomas, Nikolaos Yannoutsos	63
VI.	LITERATURVERZEICHNIS mit IFTZ-Erwähnung	65
VII.	STATISTIK ZU DEN IFTZ-PROJEKTEN	69
VIII.	ABSCHLUSSBERICHTE der Zentralen Projektgruppen (Core facilities).....	73
IX.	FINANZIELLE ANGABEN ZUM IFTZ	81

I. GELEITWORT

Vizektor Univ. Prof. i.R. Dr. Günther Sperk

Das IFTZ (Integriertes Forschungs- und Therapiezentrum) wurde mit Beschluss des Rektorats der Medizinischen Universität Innsbruck MUI am 28.11.2006 gegründet. Ziel war es, exzellente Arbeitsgruppen der Universität, die sich durch innovative Forschungsideen und hervorragende Vorarbeiten auszeichnen, zu fördern. Daneben wurden erstmalig an der MUI Organisationsstrukturen für Core facilities/Technologieplattformen durch die Einrichtung von Zentralen Projektgruppen gefördert. Das IFTZ startete mit den ersten Projekten im Jahr 2007 (12 Forschungsprojekte und 5 Zentrale Projektgruppen).

Im Jahr 2008 wurde mit dem Ausscheiden von Altrektor Sorg das Programm gestoppt und eine Ausfinanzierung beschlossen.

Der vorliegende Bericht soll darlegen, wie die verausgabten Fördergelder verwendet wurden. Aus den Projekten sind zahlreiche Publikationen hervorgegangen. Außerdem wurden –auch mit Hilfe der Projekte- neue Drittmittelprojekte für die Universität eingeworben. Die Endberichte der eingerichteten Zentralen Projektgruppen unterstreichen die erfolgreiche Maßnahme, die Technologieplattformen an der MUI zu etablieren (Publikationsoutput, Drittmittel, Kooperationen).

Wie sieht die Zukunft aus?

Die intramurale Förderung von exzellenten Projekten kann an der MUI –aufgrund der finanziellen Situation – zurzeit nicht mehr auf Projektebene erfolgen. Die MUI hat sich in den vergangenen Jahren und wird sich in dem Exzellenz Segment auf die Gegenfinanzierung kompetitiv eingeworbener Exzellenzprogramme (SFB und Doktoratskolleg) konzentrieren.

Im Vordergrund der intramuralen Forschungsförderung stand in den vergangenen Jahren die Nachwuchsförderung. Insbesondere durch das neu designte Nachwuchsförderprogramm MUI Start sollen junge WissenschaftlerInnen zur Antragsstellung (FWF- und andere hoch kompetitive Projekte) befähigt werden.

Für die auch ursprünglich im IFTZ verankerten Technologieplattformen (Core Facilities) ist ein Bericht bzw. eine Darstellung der Leistungen geplant. Die Core Facilities wurden in den letzten Jahren weiter ausgebaut und budgetär, soweit möglich, unterlegt und in den Leistungsvereinbarungen 2013-2015 verankert. Durch das Zur-Verfügungstellen von „State of the art Technologie“ für die WissenschaftlerInnen an der Medizinischen Universität verwirklichen die Core Facilities eine wesentliche Forschungsunterstützung der MUI.

Ich möchte mich bei denjenigen, die an der Entstehung des Projekts mitgearbeitet haben bedanken. Dies sind insbesondere die Mitglieder des Vorstands (ein besonderer Dank gilt dem Vorsitzenden Prof. Poewe), die Mitglieder des internen Wissenschaftlichen Beirats und die Mitglieder des Externen Wissenschaftlichen Beirats. Nicht zu vergessen ist auch ein Dank an die IFTZ Geschäftsstelle, hier insbesondere an Herrn Dr. Lohwasser und Dr. Josten, die die Projekte des IFTZ operativ betreut haben. Dr. Peter Josten hat nach Beendigung des Programms 2008 die Finanzierung der laufenden Projekte wie auch der im IFTZ eingerichteten Core facilities bis Ende 2012 betreut. Ihm möchte mich hierbei ganz besonders für sein serviceorientiertes Vorgehen und Engagement

danken. Dank gebührt ihm und dem gesamten Team des Servicecenter Forschung für die Erstellung dieses Berichts (insbes. Nadine Nössing, Reinhard Tschaut).

II. GELEITWORT

o.Univ.-Prof. Dr. Werner Poewe, Vorsitzender des IFTZ- Vorstands, Univ.-Klinik für Neurologie

Univ.-Prof. Dr. Lukas A. Huber, stellvertr. Vorsitzender des IFTZ- Vorstands, Biozentrum, Sektion für Zellbiologie

Das Integrierte Forschungs- und Therapiezentrum (IFTZ) wurde 2006 als MUI-interner, institutionalisierter Forschungsverbund gegründet. Ziel dieser, für die österreichischen Universitäten neuartigen, Struktur war die Schaffung eines speziellen Förderinstrumentes für klinische und translationale Forschung, die sowohl in struktureller, personeller und materieller Hinsicht gestärkt werden sollte. Der besondere Fokus des IFTZ lag auf der Vernetzung von Grundlagenforschung mit krankheitsbezogener, klinischer Forschung. Translationale Projekte mit therapeutischer Perspektive sollten ebenso wie Begleitforschungsprojekte zu klinischen Studien besonders gefördert werden. Ein besonderer Schwerpunkt lag von Anfang an auf der gezielten Unterstützung von Nachwuchsgruppen, sowie der Verbesserung der infrastrukturellen Rahmenbedingungen für klinische Forschung durch Schaffung von zentralen Projektgruppen (Core Facilities).

Obwohl das IFTZ bereits nach der ersten Förderphase aufgrund organisationsrechtlicher Hindernisse gestoppt werden musste, zeigt der vorliegende Abschlussbericht eindrucksvoll die Wirksamkeit eines derartigen Förderinstrumentes in mehrfacher Weise:

- Die geförderten Projektgruppen waren nahezu durchwegs publikatorisch und in der kompetitiven Einwerbung zusätzlicher Drittmittel erfolgreich,
- wichtige Impulse translationaler Forschung mit Interdisziplinarität zwischen Grundlagenforschern und Klinikern wurden auf den Weg gebracht,
- IFTZ-finanzierte Nachwuchswissenschaftler konnten zwischenzeitlich ihre Karriere auf Assistentenstellen der MUI fortsetzen.
- Darüber hinaus wurden durch die zentralen Projektgruppen des IFTZ die Grundsteine für den ortdauernden Ausbau von „Core Facilities“ als wesentlicher Baustein der Forschungsinfrastruktur der MUI gelegt.

Seitens des Gründungsvorstandes des IFTZ möchten wir an dieser Stelle allen geförderten Projektleitern unseren Dank und unsere Anerkennung aussprechen. Gedankt sei auch dem Rektorat, insbesondere Altrektor Univ.-Prof. Dr Clemens Sorg, Rektor Univ.-Prof. Dr. Herbert Lochs, Vizerektor Univ.-Prof. Dr. Günther Sperk und den Herren Dr. Lohwasser und Dr. Josten, die über alle Schwierigkeiten hinweg die Projekte des IFTZ begleitet und betreut haben.

III. STRUKTUR DES IFTZ

1. Gründungsvorstand

IFTZ Vorstand und Organisation des Zentrums

Das IFTZ wurde geleitet von einem Vorstand. Der vom Rektor der Medizinischen Universität Innsbruck berufene Gründungsvorstand setzte sich wie folgt zusammen:

o.Univ.-Prof. Dr. Werner POEWE, Vorsitzender (Universitätsklinik für Neurologie),
 Univ.-Prof. Dr. Lukas HUBER, Stellvertreter (Sektion für Zellbiologie),
 Univ.-Prof. Dr. Christine BANDTLOW, Stellvertreterin, (Sektion für Neurobiochemie),
 Em. o.Univ.-Prof. Dr. Peter FRITSCH, Stellvertreter (Universitätsklinik für Dermatologie und Venerologie),
 Em.Univ.-Prof. Dr. Raimund MARGREITER, Stellvertreter, (Universitätsklinik für Visceral-, Transplantations- und Thoraxchirurgie).

Der Vorstand trat einmal im Monat zusammen, um die Geschäfte des Zentrums im Rahmen der Satzung zu führen.

Da die Struktur des IFTZ in seiner Endausbaustufe nie gelebt wurde, soll an dieser Stelle nur die geplante und eingesetzte Struktur des IFTZs graphisch dargestellt werden.

2. Interner Forschungsrat

Der Interne Forschungsrat des IFTZ hatte die Aufgabe die Universitätsinterne Vorbegutachtung der Anträge vorzunehmen. Dem Forschungsrat gehörten 12 WissenschaftlerInnen der MUI mit ausgewiesener Expertise, internationaler Projektbegutachtung an.

Univ.-Prof. Dr. Günther GASTL (Universitätsklinik für Innere Medizin V),
 Univ.-Prof. Dr. Ludger HENGST (Sektion für Medizinische Biochemie),
 Univ.-Prof. Dr. Lukas HUBER (Sektion für Zellbiologie),
 o.Univ.-Prof. Dr. Werner JASCHKE (Universitätsklinik für Radiologie),
 Univ.-Prof. Dr. Hans-Günther KNAUS (Sektion für Molekulare und Zelluläre Pharmakologie),
 Univ.-Prof. Dr. Reinhard KOFLER (Sektion für Molekulare Pathophysiologie),
 Univ.-Prof. Dr. Florian KRONENBERG (Sektion für Genetische Epidemiologie),
 Em. Univ.-Prof. Dr. Raimund MARGREITER (Universitätsklinik für Visceral-, Transplantations- und Thoraxchirurgie),
 o.Univ.-Prof. Dr. Werner POEWE (Universitätsklinik für Neurologie),
 o.Univ.-Prof. Dr. Monika RITSCH-MARTE (Sektion für Biomedizinische Physik),
 Univ.-Prof. Dr. Günther SPERK (Institut für Pharmakologie),
 Univ.-Prof. Dr. Günter WEISS (Universitätsklinik für Innere Medizin I).

3. Externer Wissenschaftlicher Beirat

Ein Externer Wissenschaftlicher Beirat war eingerichtet. Dabei war der Vorstand des IFTZ an die Entscheidungen des Wissenschaftlichen Beirats gebunden. Die Mitglieder des Wissenschaftlichen Beirats wurden zu gleichen Teilen vom Rektor der Medizinischen Universität und dem IFTZ-Vorstand benannt. Die Vorschläge wurden dem Präsidenten des FWF vorgelegt.

Der Gründungsexterne wissenschaftliche Beirat war besetzt mit:

Prof. Christian BOGDAN (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Erlangen),
Prof. Christian BÜCHEL (Institut für Systemische Neurowissenschaften, Hamburg),
Prof. Reinhard FÄSSLER (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried),
Prof. Ferdinand HOFSTÄDTER (Institut für Pathologie, Regensburg),
Prof. Hans LASSMANN (Zentrum für Gehirnforschung, Wien),
Prof. Christian PESCHEL (III. Medizinische Klinik (Hämatologie und Onkologie), München),
Prof. Otmar SCHOBER (Klinik und Polklinik für Nuklearmedizin, Münster),
Prof. Martin SCHWAB (Gehirnforschungsinstitut, Abteilung für Neuromorphologie, Zürich),
Prof. Thomas SCHWARZ (Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie, Kiel),
Prof. Josef SMOLEN (Universitätsklinik für Innere Medizin III, Wien),
Prof. Klaus TOYKA (Neurologische Klinik und Polklinik, Würzburg),
Prof. Karl WELTE (Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Hannover).

4. Begutachtungsverfahren für Projektskizzen durch den Forschungsrat

Zur Internen Vorbegutachtung durch den Forschungsrat des IFTZ wurden 70 Projektskizzen von WissenschaftlerInnen der MUI eingereicht. Die Begutachtung der Anträge erfolgte durch Bewertungsbögen, die die wissenschaftliche Originalität und Qualität der Projekte berücksichtigten. Außerdem wurde die klinische Relevanz, die qualifizierten Drittmittel zum Thema, die Präzession der Zielsetzung und Fragestellung, der Vernetzungsgrad Vorklinik zur Klinik und die Methoden und Durchführbarkeit bewertet.

Nach Vorbegutachtung und Auswertung der Scores forderte der Interne Forschungsrat nach seiner Sitzung vom 20.03.2007 die AutorInnen der 25 besten Projektskizzen zur Erstellung des Vollartrags auf.

Von diesen 25 Projekten wurden letztlich 13 vom Externen Wissenschaftlichen Beirat zur Förderung empfohlen. 12 Projekte wurden realisiert.

5. Zentrale Projektgruppen (Core Facilities, Technologieplattformen).

Im IFTZ waren 5 dieser Gruppen eingerichtet:

Expression Profiling Unit

Genotyping Sequencing Unit

Proteinanalytik

FACS Sort Core Facility

Transgenomic/ knockout Mouse Unit

Die Zentralen Projektgruppen, Core Facilities bzw. Technologieplattformen, boten und bieten allen MitarbeiterInnen der Universität – auf Anfrage auch externen NutzerInnen – die Möglichkeit, Dienstleistungen und wissenschaftliches Know-how auf neuestem Stand zu erwerben. Angeboten werden vor allem moderne Techniken und Serviceleistungen, die besonders intensive Einarbeitungszeiten und/oder größere Investitionen erfordern würden.

Bündelung von Ressourcen, gesteigerte Effektivität

Zentrale Projektgruppen dienen somit der Bündelung von Ressourcen und Steigerung der Effektivität in der Forschung

- Professionalisierung zentraler Dienstleistungen
- Erhaltung von Know-how
- Verfügbarkeit technischer Innovationen – schnell und serviceorientiert

IV. PROJEKTÜBERSICHT

a) Projekte

ProjektleiterIn	Institut/Klinik	Titel	Seite
Christine Bandtlow	Sektion für Neurobiochemie	Reticulons in the epileptic brain	13
Thomas Berger, Markus Reindl	Universitätsklinik für Neurologie	Antibodies as biological markers in multiple sclerosis: progressing from bench to bedside	17
Sylvia Bösch	Universitätsklinik für Neurologie	Spinocerebelläre Ataxie vom Typ 2 (SCA2): Zur CAG-Repeat-abhängigen Translations-Induktion von Ataxin2 durch MID1 und deren potentiellen therapeutischen Inhibition durch Lithiumionen	23
Georg Dechant, Gregor Wenning	Gemeinsame Einrichtung für Neurowissenschaften	Cell Fate Analysis of Embryonal and Adult Stem Cell-Derived Grafts in the 6-OHDA Model of Parkinson's Disease	27
Wolfgang Doppler	Sektion für Medizinische Biochemie	Significance of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT-1) activation in primary tumors for treatment protocols	31
Ludger Hengst	Sektion für Medizinische Biochemie	Tyrosine phosphorylation of p27 ^{Kip1} – prognostic and therapeutic potential	37
Lukas Huber, Nikolaus Romani	Sektion für Zellbiologie	Regulation of antigen presenting properties of dendritic cells by the p14-MP1-MAP kinase scaffolding complex – studies in mouse models and humans	41
Michaela Kress	Sektion für Physiologie	NOGO receptors in nociception	49
Alexandra Lusser	Sektion für Molekularbiologie	Der Rolle von Chromatin-modifizierenden Aktivitäten während der Oogenese und frühen Embryonalentwicklung	51
Klaus Seppi, Christoph Scherfler	Universitätsklinik für Neurologie	Charakterisierung von Risiko- und Biomarkern der Parkinson-Krankheit	53
Andreas Villunger	Sektion für Entwicklungsimmunologie	Bim and Bmf in Breast Cancer	59
Nikolaos Yannoutsos	Sektion für Zellbiologie	Genomic instability and lymphomas	63

b) Zentrale Projektgruppen (Core Facilities/Technologieplattformen)

ProjektleiterIn	Institut/Klinik	Titel	Seite
Reinhard Kofler	Sektion für Molekulare Pathophysiologie	Expression Profiling Unit	73
Florian Kronenberg	Sektion für Genetische Epidemiologie	Sequencing & Genotyping Unit	74
Herbert Lindner	Sektion für Klinische Biochemie	Protein Mycroanalysis Facility	76
Sieghart Sopper	Universitätsklinik für Innere Medizin V	FACS Sort Core Facility	78
Nikolaos Yannoutsos	Sektion für Zellbiologie	Transgenic/knock-out mouse unit	79

V. ABSCHLUSSBERICHTE PROJEKTE

Die hier abgedruckten Abschlussberichte sind durch die IFTZ ProjektleiterInnen angefertigt worden.

1) Reticulons in the epileptic brain

Univ.-Prof. Dr. Christine Bandtlow

Sektion für Neurobiochemie

Zusammenfassung

Previous data of us and others indicated that neuronal NogoA and NogoB were rapidly upregulated in the epileptic brain. Since Nogo proteins are known to hamper regeneration and structural plasticity, we hypothesized that Nogo is involved in regulating structural and functional plasticity of synaptic connections in epilepsy and possibly also in the intact CNS. Our initial aim was to test whether viral-mediated silencing of NogoA/B affects structural changes and subsequently influences disease onset and progression. In the first funding period we had successfully established the Adeno-associated virus 1/2 (AAV) virions expressing shRNA targeted against Nogo-A (AAV-shNogoA) and NogoA/B (AAV-shNogoA/B) and tested them *in vitro* and *in vivo*. Stereotactically injected virions into the hippocampus of adult rats revealed that all tested constructs showed substantial expression within the hippocampus proper but with different efficiencies (Abb.1). Subsequent studies in the second term of the funding period, however, revealed that only one construct (AAV-shNogoA/B) showed a significant and long-lasting downregulation (59%) of NogoA/B on the mRNA as well as protein levels 4-5 weeks after injection (Abb. 2).

Next we asked, whether AAV-mediated silencing of NogoA/B in the intact adult rat hippocampus leads to synaptic re-arrangements as indicated in previous studies using organotypic hippocampal cultures (Zagrebelsky et al., 2010) or Nogo-KO mice (Su et al., 2008). Interestingly, while constitutive loss of NogoA led to an increase of GAP-43, a marker for axon growth (Su et al. 2008), acute silencing of NogoA/B by AAV-shNogoA/B injection *in vivo*, showed no relevant changes in the expression of GAP-43 in EGFP-positive hippocampal neurons. Similarly, CaMKII a marker enriched at presynaptic nerve terminals was unchanged, suggesting either that acute neuronal downregulation of NogoA/B does not induce detectable axon sprouting or that a partial NogoA/B downregulation was not sufficient to reveal detectable sprouting effects.

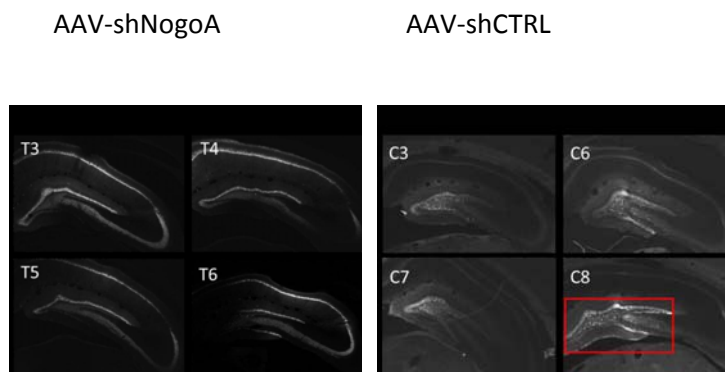
However, immunoreactivity for VGAT, a GABAergic presynaptic marker, was found to be specifically reduced in the dentate gyrus (DG) and CA1 pyramidal cell layer following AAV-shNogoA/B injection. While on the contralateral side, VGAT immunostaining was most intense in the outer GCL and outer molecular layer of the dentate, with less labeling in the inner and middle molecular layers, staining intensity was profoundly reduced on the IPSI-lateral side, as revealed 4 weeks after AAV-shNogoA/B injection (Abb. 3). Quantitative densitometric analysis using the fornix for normalization showed an almost 50% reduction of VGAT immunoreactivity in CA1 and DG. Although normalization of the optical density to the fornix controls for nonspecific overlabeling, it is possible that the observed differences in VGAT labeling were a result of nonspecific globally decreased immunoreactivity because, for example, of tissue-processing artifacts. To control for these artifacts, we examined VGAT labeling in the stratum lucidum, which would not be expected to be affected by the experimental protocol. Moreover, we also analysed the CA3 layer, which showed no EGFP-positive

neurons. Thus, the difference in VGAT optical density observed in the dentate gyrus was robust regardless of whether the measurement was controlled for processing artifacts resulting in over- or underimmunoreactivity. These results strongly suggest that long-term silencing of NogoA/B induces changes in the mature dentate gyrus network, which may result in a reduction in inhibitory tone in the GCL. Although decreased inhibitory innervation of mature DGCs would be most concordant with recent findings of enhanced LTP in NogoA KO mice (Delekante et al., 2011), an increased excitatory drive would also be expected to enhance LTP in mature DGCs. We will therefore examine immunolabeling for VGLUT-1 as a marker for glutamatergic presynaptic terminals in the dentate molecular layer.

In summary, we can conclude that unilateral injection of rAAV-shNogo into adult rat dorsal hippocampus results in significant and region-specific Nogo knockdown on mRNA and protein level. Although we did not observe increased sprouting responses, this acute downregulation of Nogo resulted in region-specific alterations of GABA-ergic synapses supporting a role of Nogo in the stabilization of neuronal networks.

Su Y, Wang F, Zhao SG, Pan SH, Liu P, Teng Y, Cui H (2008) Axonal regeneration after optic nerve crush in Nogo-A/B/C knockout mice. *Mol Vis* 14:268-273.

Zagrebelsky M, Schweigreiter R, Bandtlow CE, Schwab ME, Korte M (2010) Nogo-A Stabilizes the Architecture of Hippocampal Neurons. *J. Neurosci.* 30(40):13220 –13234.



expression patterns.

Abb. 1 Representative images of GFP auto-expression from AAV-shNogoA/B vs. AAV-CTRL group (4 animals each). The differences in viral titer might account for the obviously different EGFP

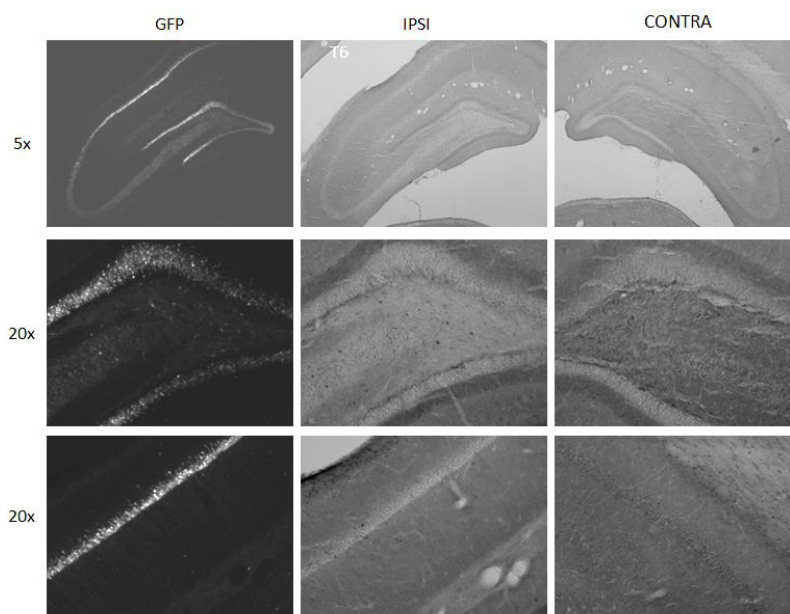


Abb. 2 Four weeks after unilateral AAV-shNogoA/B injection, immunostaining for NogoA is considerably decreased in those cells that had been infected with the virus as displayed via EGFP expression. Non-neuronal cells are not infected by the virus *in vivo* and oligodendrocytes do not appear to have changed Nogo protein levels.

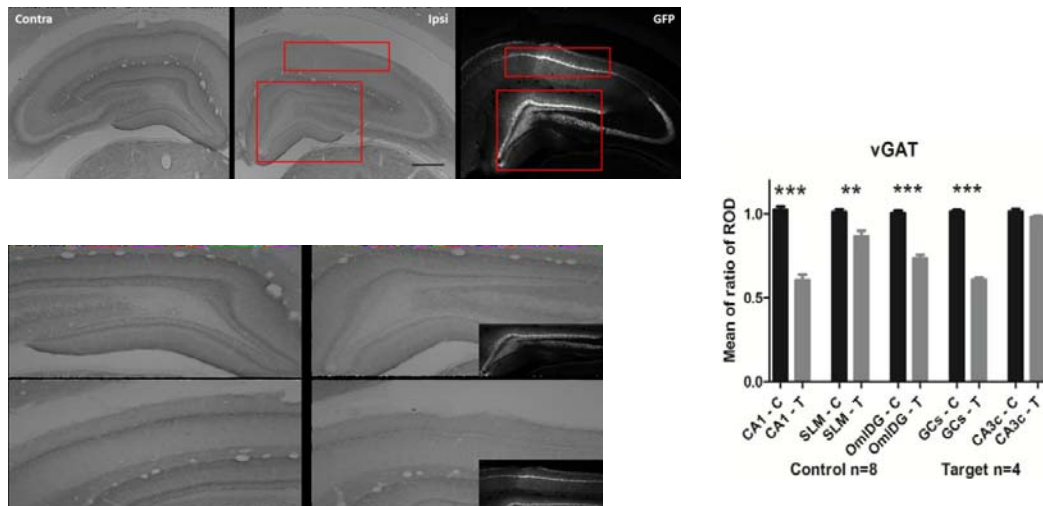


Abb. 3 Staining for VGAT in the dentate gyrus and quantification of the optical densities (normalized to the white matter of the fornix) of injected (Ipsi) and non injected (contra) sides.

Fördervolumen des Projekts innerhalb des IFTZ

Laufzeit des Projekts: 10/2007 – 09/2010
 Sachmittel/Investitionen: € 70.498,48
 Personalstellen: Barbara Meissner; Doktorandin; 36 Monate
 Helene Heiss; TA; 16,25 Monate*

Publikationen ohne IFTZ-Erwähnung

Zagrebelsky, Marta; Schweigreiter, Rüdiger; Bandtlow, Christine E.; Schwab, Martin E.; Korte, Martin (2010): Nogo-A stabilizes the architecture of hippocampal neurons. In: J. Neurosci 30 (40), S. 13220–13234.

* Die Fördermittel zur Finanzierung dieser Stelle wurden nicht über das IFTZ Budget, sondern über andere Forschungsfördertöpfe finanziert

Eingeworbene qualifizierte Drittmittel

Projektleitung	Titel des Vorhabens	Fördernummer u. -organisation	Laufzeit des Projektes	Fördersumme pro Haushaltsjahr
Christine Bandtlow	Interaction partners of Nogo	FWF	2007 - 2013	€ 79.750

Kooperationen mit anderen Teilprojekten / Vernetzung innerhalb des Zentrums

Kooperation mit Prof. G. Sperk, Institut für Pharmakologie, Injektion des AAV-shNogo Vektors in den Rattenhippocampus und Expressionsstudien

Kooperation mit Kress Gruppe über Mechanosensitivität von Nogo-Rezeptor-KO Mäusen

Nachwuchsförderung

Doktorarbeiten

Name, Vorname	Abschluss im Jahr	Universität, Fachbereich	Titel der Arbeit
Meissner, Barbara		MUI, Neuro- wissenschaften	Viral mediated knockdown of Nogo in the intact rat hippocampus

2) Antibodies as biological markers in multiple sclerosis: progressing from bench to bedside

Ao. Univ.-Prof. Dr. Thomas Berger, MSc, und Ao. Univ.-Prof. Dr. Markus Reindl
Universitätsklinik für Neurologie

Zusammenfassung:

The overall goal of our project was to identify relevant autoantibodies (antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG, and aquaporin-4, AQP-4, as well as novel antibodies) as biological markers in multiple sclerosis (MS) and its variant neuromyelitis optica (NMO). Therefore we aimed to identify and characterize pathogenic antibodies *in-vitro* and *in-vivo* (rodents and MS patients), and to correlate these antibodies with clinical and MRI features, as well as treatment responses of MS patients. The specific aims of our project were:

1. To identify pathogenic anti-MOG and anti-AQP4 antibodies using cell-based and fluid-phase immunoassays.

We have now established a highly specific cell-based immunofluorescence immunoassay to detect antibodies to MOG and AQP-4.

a) Our results demonstrated that anti-MOG IgG levels detected with a live cell staining immunofluorescence assay are specific for a subgroup of predominantly pediatric patients with acute disseminating encephalomyelitis (ADEM), clinically isolated syndrome (CIS) and NMO spectrum disorders (NMOSD), but are rarely found in classical MS (Di Pauli et al., 2011; Mader et al., 2011; Rostasy et al., 2012).

b) Our results from 46 Austrian AQP-4 IgG seropositive NMOSD patients indicate that autoantibodies to AQP-4 mainly target conformational epitopes present in the M-23 isoform of AQP-4, whereas much weaker binding was observed to the M-1 isoform of the protein (Mader et al., 2010). Further, we could demonstrate that cerebrospinal fluid (CSF) AQP4-IgG were present in patients with high serum titers and correlated with spinal MRI lesion length and CSF parameters. Clinical improvement was associated with a decrease in CSF, but not serum, AQP4-IgG titers (Dujmovic et al., 2011).

2. To identify novel anti-CNS antibodies in MS using immunohistochemistry.

We tried to identify novel CNS autoantigens by immunofluorescence analysis of sera from patients with MS, ADEM and NMO using commercially available tissue slide of mouse and primate cerebellum. However, only serum samples of NMO patients showed a specific antibody binding to tissue antigens, whereas we failed to detect any binding of ADEM and MS.

3. To analyze the pathogenic role of these antibodies *in-vitro* and *in-vivo*.

We have established an *in-vitro* assay to detect the involvement of anti-MOG and anti-MBP antibodies in antibody-dependent complement cytotoxicity (Mader et al., 2011). Our results revealed that both autoantibodies induce antibody-dependent complement cytotoxicity if present at high titers.

Together with our colleagues from the Brain Research Institute, Vienna Medical University, and from Tohoku University, Sendai, Japan, we could demonstrate that human anti-AQP-4 antibodies are not only important in the diagnosis of NMO, but also augment disease and induce NMO-like lesions in Lewis rats with T-cell mediated brain inflammation (Bradl et al., 2009). Further, our data provide further support for the view that NMO lesions may be induced by a complex interplay of T cell mediated and humoral immune responses against AQP4 (Pohl et al., 2011).

4. To correlate these antibodies with clinical data and MRI features of MS patients

We were able to demonstrate a correlation of AQP4-IgG and MOG-IgG antibodies with clinical data and MRI features of CIS, MS, ADEM and NMO patients (Di Pauli et al., 2010; Mader et al., 2010; Dujmovic et al., 2011; Mader et al., 2011; Rostasy et al., 2012).

5. To use these antibodies as biomarkers to identify MS patients who benefit from B-cell and antibody-directed therapies AQP-4 IgG antibody titers measured by our immunofluorescence assay are already in use for treatment monitoring (plasma-exchange and anti-CD20 monoclonal antibody, Rituximab) in NMO patients (Mader et al., 2010).

6. To finally establish translational projects for broad clinical use of the identified biomarkers Since 2008 we have offered our AQP-4 IgG immunoassay to all Neurological Departments in Austria for the Austrian NMO study group (ARGE NMO) and all costs were covered by this IFTZ project. We have not only collecting well documented serial serum and plasma-exchange samples from 61 AQP-4 IgG positive patients, but we have also for the first time established a NMO register which is crucial for further common scientific and therapeutic projects. Our AQP4-IgG antibody assay is offered to all members of the ARGE NMO Austria free of charge, all costs are covered by our IFTZ research grant of the IFTZ (until end of 2010) and the Austrian MS research society (until end of 2011).

Fördervolumen des Projekts innerhalb des IFTZ

Laufzeit des Projekts:	10/2007 – 09/2010
Sachmittel/Investitionen:	€ 65.919,11
Personalstellen:	Mag. Simone Mader; Doktorandin; 36 Monate Kathrin Schanda; BMA; 36 Monate

Publikationen mit IFTZ-Erwähnung

Kuenz, Bettina; Lutterotti, Andreas; Ehling, Rainer; Gneiss, Claudia; Haemmerle, Monika; Rainer, Carolyn et al. (2008): Cerebrospinal fluid B cells correlate with early brain inflammation in multiple sclerosis. In: *PLoS ONE* 3 (7), S. e2559.

Bradl, Monika; Misu, Tatsuro; Takahashi, Toshiyuki; Watanabe, Mitsutoshi; Mader, Simone; Reindl, Markus et al. (2009): Neuromyelitis optica: pathogenicity of patient immunoglobulin in vivo. In: *Ann. Neurol* 66 (5), S. 630–643.

Mader, Simone; Lutterotti, Andreas; Di Pauli, Franziska; Kuenz, Bettina; Schanda, Kathrin; Aboul-Enein, Fahmy et al. (2010): Patterns of antibody binding to aquaporin-4 isoforms in neuromyelitis optica. In: *PLoS ONE* 5 (5), S. e10455.

Di Pauli, Franziska; Mader, Simone; Rostasy, Kevin; Schanda, Kathrin; Bajer-Kornek, Barbara; Ehling, Rainer et al. (2011): Temporal dynamics of anti-MOG antibodies in CNS demyelinating diseases. In: *Clin. Immunol* 138 (3), S. 247–254.

Dujmovic, Irena; Mader, Simone; Schanda, Kathrin; Deisenhammer, Florian; Stojasavljevic, Nebojsa; Kostic, Jelena et al. (2011): Temporal dynamics of cerebrospinal fluid anti-aquaporin-4 antibodies in patients with neuromyelitis optica spectrum disorders. In: *J. Neuroimmunol* 234 (1-2), S. 124–130.

Pohl M, Fischer MT, Mader S, Schanda K, Kitic M, Sharma R, Wimmer I, Misu T, Fujihara K, Reindl M, Lassmann H, Bradl M (2011). Pathogenic T cell responses against aquaporin 4. In: *Acta Neuropathol* 122, S. 21-34.

Publikationen ohne IFTZ-Erwähnung

Mader S, Deisenhammer F, Reindl M (2010). AQP4-IgG antibodies as biomarkers for early diagnosis of neuromyelitis optica spectrum disorders. In *J Lab Med* 34, S, 337–342.

Jarius S, Christian Jacobi C, Jerome de Seze J, Helene Zephir H, Friedemann Paul F, Diego Franciotta D, Paulus Rommer P, Simone Mader S, Ingo Kleiter I, Markus Reindl M, Gulsen Akman-Demir G, Thomas Seifert-Held T, Wolfgang Kristoferitsch W, Arthur Melms M, Klaus-Peter Wandinger KP, and Brigitte Wildemann B (2011). Frequency and syndrome specificity of antibodies to aquaporin-4 in neurological patients with rheumatic disorders. In *Mult Scler* 17, S. 1067-1073.

Mader S, Gredler V, Schanda K, Rostasy K, Dujmovic I, Pfaller K, Lutterotti A, Jarius S, Di Pauli F, Kuenz B, Ehling R, Hegen H, Deisenhammer F, Aboul-Enein F, Storch MK, Koson P, Drulovic J, Kristoferitsch W, Berger T, Reindl M (2011). Complement activating antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein in neuromyelitis optica and related disorders. In: *J Neuroinflammation* 28;8, S. 184.

Rostasy K, Mader S, Schanda K, Huppke P, Gärtner J, Kraus V, Karenfort M, Tibussek D, Blaschek A, Bajer-Kornek B, Leitz S, Schimmel M, Di Pauli F, Berger T, Reindl M (2012). Anti-MOG antibodies in children with optic neuritis. In: *Arch Neurol* 69, S. 752-756.

Buchbeiträge ohne IFTZ-Erwähnung

Reindl M, Kuenz B, Berger T (2010). B cells and antibodies in MS. *Results Probl Cell Differ* vol.51: 99-113.

Mader S, Obholzer B, Reindl M (2011). Relevance of Autoantibodies for the Classification and Pathogenesis of Neurological Diseases, *Autoimmune Disorders - Current Concepts and Advances from Bedside to Mechanistic Insights*, Fang-Ping Huang (Ed.), ISBN: 978-953-307-653-9, InTech. S 164-190.

Eingeworbene qualifizierte Drittmittel

Projektleitung	Titel des Vorhabens	Fördernummer u. -organisation	Laufzeit des Projektes	Fördersumme pro Haushaltsjahr
Markus Reindl, Thomas Berger	Bestimmung von Aquaporin-4 IgG Auto-Antikörpern bei österreichischen Patienten mit Neuromyelitis Optica im Rahmen der ARGE NMO Österreich	Österreichische MS Forschungs- gesellschaft	01/2010- 12/2011	€ 5.000
Kevin Rostasy (Markus Reindl, Thomas Berger)	Bedeutung von Markern in der Unterscheidung von Hirnerkrankungen der weißen Substanz bei Kindern	Nr. 14158 Jubiläumsfonds der Öster. Nationalbank	02/2011- 01/2013	€ 30.000
Romain Marignier, Hans Lassmann, Markus Reindl (Thomas Berger)	Eugène Devic Europäisches Netzwerk	FWF I 916-B13	01/2012- 12/2014	€ 30.877

Nachwuchsförderung**Diplomarbeiten**

Name, Vorname	Abschluss im Jahr	Universität, Fachbereich	Titel der Arbeit
Meigl, Christine	2011	Medizin, MUI	Kindliche Multiple Sklerose und ADEM in Tirol
Abdel Azim, Mona	2012	Medizin, MUI	Neuromyelits optica in Tirol

Doktorarbeiten

Name, Vorname	Abschluss im Jahr	Universität, Fachbereich	Titel der Arbeit
Mader, Simone	2011	PhD MUI	The biological role of antibodies to aquaporin-4 in neuromyelits optica
Di Pauli, Franziska	Laufend	PhD MUI	Antimyelin antibodies as biological markers for multiple sclerosis

3) Spinocerebelläre Ataxie vom Typ 2 (SCA2): Zur CAG-Repeat abhängigen Translations-Induktion von Ataxin2 durch MID1 und deren potentiellen therapeutischen Inhibition durch Lithiumionen

Priv.-Doz. Dr. Sylvia Bösch

Universitätsklinik für Neurologie

Zusammenfassung

1. Extended clinical re-evaluation of the large Austrian SCA2 family

Within the extended clinical re-evaluation of a large multigenerational SCA2 family we identified a female person with an unusually benign course of disease (Hering et al., 2009). This patient has been taking lithium-carbonate over more than 30 years because of psychotic depression. We determined CAG repeats (and published genetic modifiers) within the whole branch of this SCA2 family. We therefore developed a novel method called „A-overhang dependent repeat expansion determination“ (ADRED) (Achmüller et al., 2008). In addition, we used the ADRED method to count the CAG repeats of two known SCA2 modifiers RAI1 / CACNA1A. Interestingly, a severely affected sister with genetically identical ATXN2 and SCA2-modifier loci was identified. Environmental and life style differences that might have influenced the course of disease were ruled out since both persons live under similar socio-economical circumstances. This observation may support the idea that lithium has disease modifying properties in SCA2.

2. Analysis of the interaction between SCA2-poly (CAG) and the MID1 / PP2A complex and its impact on translation

In earlier experiments we have shown, that the MID1-protein complex binds mRNAs through G-rich RNA motifs. We hypothesized that the MID1 complex might be involved in regulation of translation of poly(CAG) containing mRNAs. Therefore, we intended to determine the role of MID1 in translation of ATXN2 mRNA. To analyse if MID1 has a general effect on translation regulation of poly(CAG) mRNAs we tested whether mRNAs of ATXN2, HTT and AR are also present in the MID1-complex (Krauss et al., 2011 submitted, Köhler et al., 2011 submitted). For this reason we immunoprecipitated MID1-FLAG from HeLa cell extracts with either anti-FLAG antibody or with unspecific immunoglobulins (IgGs) as negative control. The RNA was extracted from the immunoprecipitates and presence of ATXN2, HTT or AR mRNA was analyzed by semiquantitative RT-PCR using specific primers for ATXN2, HTT or AR, respectively. To investigate whether the MID1 complex binds poly(CAG) we used AR mRNA as model RNA. Five different regions of the AR mRNA were transcribed in vitro, biotin-labeled, and incubated with lysates derived from HeLa cells overexpressing MID1-FLAG. Pull-down of the RNA with streptavidin beads and detection of MID1 in the elution fractions by Western blotting showed that the MID1 protein complex binds selectively to the poly(CAG) and the poly(GGY) motifs in the AR mRNA. This finding suggests that the MID1 complex binds trinucleotide repeat regions of ATXN2 or HTT mRNAs.

Mutations in MID1 lead to a disorder called Opitz BBB/G syndrome (OS). We used cell lines of OS patients to analyze the ATXN2 protein and RNA levels. ATXN2 protein level was clearly decreased in different OS cell lines, whereas mRNA level was unchanged compared to control cells. To exclude increased degradation as a main contributor to this phenomenon, we treated cells with cycloheximide (CHX). We observed that ATXN2 degrades faster in control cells. This finding suggests that MID1 may be regulating translation efficiency of ATXN2 mRNA.

3. Development of biochemical methods to quantify normal and mutant ATXN2

For preclinical and clinical testing of candidate substances a quantitative measure to determine translational efficiency is of enormous interest in SCA2 and in polyglutamine disorders in general. A quantitative measurement of pathologic versus normal amounts of a respective protein on an individual level would provide for a biomarker that is of pivotal importance for further clinical studies. To date, there is no method available to quantify the amount of normal and mutated ATXN2 protein.

CNBr-cleavage approach:

Using conventional Westernblot technique normal and expanded ATXN2 cannot be distinguished. Therefore, we propose a strategy to circumvent this problem. In brief, we cut out ATXN2 band containing normal and expanded ATXN2 from a gel, incubate the gel-pieces with CNBr (chemical cleavage C-terminal of Met), re-load the digested fragments onto a second SDS-PAGE gel and westernblot subsequently using a fragment specific antibody that should allow quantification. For this methodological strategy, however, we had to generate a fragment specific antibody. After a series of failed attempts at obtaining such an antibody from different companies (short peptides as immunogenes) we decided to purify a 7.7kDa peptide comprising of 3x Q at the N-terminus followed by the whole amino acid sequence C-terminally of the polyQ stretch until to the next Met. This peptide was successfully purified using the „Npro fusion technology“. We forwarded the pure peptide in the desired concentration to the company Eurogentec. Unfortunately, we could not detect the ATXN2 protein in cell lysates from lymphoblastoid cells of SCA2 patients with the antisera. Moreover, it was also impossible to detect the recombinant over-expressed peptide with these antisera. Prof. Auburger from Frankfurt, a collaboration partner who is working in the SCA2 field, told us that his group was also unsuccessful in obtaining an antibody specific for the desired polyQ fragment with their in-house antibody facility. Therefore, we suggest that the amino acid sequence of this fragment has very low immunogenicity and it is unlikely to get the desired fragment specific antibody. Hence, we are currently using this strategy for another polyQ protein, namely huntingtin, in a new project supported by the "Tiroler Zukunftsstiftung".

We also worked on a second strategy:

We design a spacer which should be able to separate the two ATXN2 isoforms during isotachopheresis. ATXN2 with a polyQ stretch of 22 or 50 has a molecular weight (MW) of 140,1 or 143,7 kDa, respectively. The spacer was an ATXN2 isoform which should not react with the ATXN2 antibody from BD and should have a MW between 140 and 142 kDa. The recognition site of the BD antibody on the ATXN2 protein is at aa 712-903. This region was cut out by restriction enzymes Eam1105I and SdaI, synthesized with inserted mutations to impede immunoreactivity with the ATXN2 antibody and re-inserted by ligation. We intended to express the spacer with a C-terminal 6-His tag using pET30 vector for high level expression in E. coli followed by purification and concentration. After purification, we added the spacer at high concentrations to the cell lysate. The spacer should then have separated the mutated from the normal ATXN2 during isotachopheresis. This should allow the polyQ quantification of both forms by western blot analysis. Unfortunately, we were not able to get any protein expression using different expression conditions combined with different E. coli strains.

Moreover, a codon optimized version of the spacer gene was also not successful. Therefore, we decided to use a different expression system, Pichia pastoris. We constructed expression vectors (pGAPZ, pPICZ) for constitutive and inducible expression and transformed different strains (X-33 and

protease deficient SMD1168H). We tested several different expression conditions and inducer concentrations. Still, we were not able to detect the desired protein by western blot, even after concentrating the samples.

Taken together, we have designed the spacer sequence, disrupted the anti-ATXN2 binding site, but were not able to express the corresponding protein neither in *E. coli* nor in *Pichia pastoris*. Another possibility, so-far unconsidered due to financial limitations, would be to try to hand over the spacer construct to a company to try to express the spacer protein using mammalian cells (e. g. CHO) at large scale.

The technical problems of step 3 prevented us from heading for step 4 pre-clinical trials (facultative) and step 5 clinical trial, phase IIa a “proof of concept” study.

4. Pre-clinical trials (facultative)

5. Clinical Trial, phase IIa “proof of concept” study in 15 SCA2 patients



Abb. 4 Ao.Univ.-Prof. Dr. Rainer Schneider und Priv.-Doz. Dr. Sylvia Bösch (Kooperationspartner im IFTZ)

Fördervolumen des Projekts innerhalb des IFTZ

Laufzeit des Projekts:	11/2007 – 10/2010
Sachmittel/Investitionen:	€ 34.848,47
Personalstellen:	Clemens Achmüller; Univ.-Assistent; 39 Monate* Andrea Köhler; PhD-Studentin; 36 Monate

* Aus personalrechtlichen Gründen konnten PostDocs im IFTZ nur über 4 Jahre angestellt werden (daher Anstellungsdauer > Projektdauer).

Publikationen mit IFTZ-Erwähnung

Achmüller, Clemens; Köhler, Andrea; Bösch, Sylvia; Schneider, Rainer (2008): A-overhang-dependent repeat expansion determination (ADRED). In: BioTechniques 45 (5), S. 577–580.

Hering, Sascha; Achmüller, Clemens; Köhler, Andrea; Poewe, Werner; Schneider, Raine; Boesch, Sylvia M. (2009): Phenotype variability in spinocerebellar ataxia type 2: a longitudinal family survey and a case featuring an unusual benign course of disease. In: Mov. Disord 24 (5), S. 774–777.

Kickstein, Eva; Krauss, Sybille; Thornhill, Paul; Rutschow, Désirée; Zeller, Raphael; Sharkey, John et al. (2010): Biguanide metformin acts on tau phosphorylation via mTOR/protein phosphatase 2A (PP2A) signaling. In: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 107 (50), S. 21830–21835.

Weitere eingeworbene qualifizierte Drittmittel:

Projektleitung	Titel des Vorhabens	Fördernummer u. -organisation	Laufzeit des Projektes	Fördersumme pro Haushaltsjahr
Clemens Achmüller (Sylvia Bösch)	Functional characterization of pure polyQ tracts	TWF	01/2010 – 12/2011	€ 7.500
Rainer Schneider (Sylvia Bösch)	Translationale Kontrolle von Huntingtin	Tiroler Zukunftsstiftung	07/2009 – 06/2012	€ 99.950

Kooperationen mit anderen Teilprojekten / Vernetzung innerhalb des Zentrums und andere Kooperationen

Prof. Rainer Schneider, Universität Innsbruck
Prof. Susann Schweiger, University of Dundee

Nachwuchsförderungen

Doktorarbeiten

Name, Vorname	Abschluss im Jahr	Universität, Fachbereich	Titel der Arbeit
Köhler, Andrea	2009	LFU, Biochemie	Structural and functional dissection of the MID1 complex, a novel regulator in the androgen axis

4) Cell Fate Analysis of Embryonal and Adult Stem Cell-Derived Grafts in the 6-OHDA Model of Parkinson's Disease

Univ.-Prof. Dr. Georg Dechant

Gemeinsame Einrichtung für Neurowissenschaften

Univ.-Prof. Dr. Gregor Wenning

Universitätsklinik für Neurologie

Zusammenfassung

Die Parkinson-Krankheit ist eine neurodegenerative Erkrankung, welche durch progredienten Verlust dopaminergener Neurone in der Substantia nigra pars compacta und konsekutiven striatalen Dopamin-Mangel gekennzeichnet ist. Aufgrund ernster Langzeitkomplikationen der L-Dopa Therapie werden seit über 20 Jahren alternative neurorestaurative Strategien mittels embryonalem Zellersatz („Brain Repair-Konzept“) evaluiert. Tierexperimentell und in offenen Studien bei Parkinson-Patienten konnte die Wirksamkeit der dopaminergen Zellersatz-Therapie belegt werden. In 2 Doppelblindstudien ließ sich dagegen keine signifikante Besserung der Parkinson-Symptomatik nachweisen. Dagegen traten unerwünschte Nebenwirkungen wie Dyskinesien der Extremitäten auf (Freed 2001, Olanow 2003). Aufgrund dieser enttäuschenden Ergebnisse hat sich die translationale Forschung in den letzten Jahren auf die neurobiologischen Grundlagen konzentriert. Im Rahmen unseres Projektes wurden folgende Unterprojekte durchgeführt:

- 1) Optimierung der *in vitro* Stammzell-Differenzierung von Maus ES Zellen in dopaminerge und andere spezifische neuronale Populationen: Dies gelang durch die Etablierung neuer Genexpressionsprofile zur Charakterisierung von Zwischenstadien der Differenzierung (Induktion, Patterning und terminale Differenzierung) basierend auf Erkenntnissen der neuronalen Entwicklung *in vivo*. Integraler Bestandteil dieses Projekts war eine quantitative Bestimmung derselben Marker in den vergleichbaren Entwicklungsstadien *in vivo*. Die neu entwickelten Profile erwiesen sich als außerordentlich hilfreich zu Charakterisierung neuronaler Kulturen und Gewebe und wurden auch in Kollaborationen mit A. Saria und A. Hüttenhofer eingesetzt.
- 2) Optimierung der *in vitro* Differenzierung von humanen ES Zellen in neuronale Derivate durch quantitativen und qualitativen Vergleich von Genexpressionprofilen zwischen maus und humanen ES Zellen.
- 3) Studium der Entwicklung ventral mesencephaler (VM) Grafts *in vivo*. Zu diesem Zweck wurde embryonales Dopamin-reiches VM Gewebe von einer GFP Reporter Maus gewonnen und in das Striatum eines 6OHDA Parkinson-Rattenmodells implantiert. GFP exprimierende Grafts wurden aus dem Empfänger-Striatum entfernt und mittels qRT-PCR unter Verwendung der neuen Markerprofile charakterisiert. Anschließend wurden dopaminerge Signatur-Marker vor und nach der Transplantation verglichen. Der Anteil der Th+ Zellen betrug *in vitro* $2,8 \pm 0,125$ % mit einem 1,7 fachen Anstieg auf $5,1 \pm 0,512$ % im Bereich des Grafts, vereinbar mit einer dopaminergen Differenzierung nach der Transplantation. Die Grafts zeigten auch einen signifikanten Anstieg der Vmat2, Th und DAT Genexpression als Ausdruck des maturierten Dopaminzell-Phänotyps. Gleichzeitig fand sich eine Down-Regulation von Markern des Dopamin-Progenitor-Pools incl. Mash1, Neurog2, Lmx1a, and Foxa2. Zusammenfassend zeigt diese Studie erstmals, daß die VM Grafts korrekten maturierten Dopamin-Zellphänotyp exprimieren. Diese Ergebnisse leisten einen wichtigen Beitrag für das Verständnis der Neurobiologie dopaminergener Grafts.

Fördervolumen des Projekts innerhalb des IFTZ

Laufzeit des Projekts:	01/2008 – 12/2010
Sachmittel/Investitionen:	€ 93.664,67
Personalstellen:	Ahmad Salti; Doktorand; 36 Monate Sonya Neto; Doktorandin; 36 Monate

Publikationen mit IFTZ-Erwähnung

Carvalho Neto Sonya, Salti Ahmad, Puschban Zoe, Stefanova Nadja, Nat Roxana; Dechant Georg and Wenning Gregor. Cell Fate Analysis of Embryonic Ventral Mesencephalic Grafts in the 6-OHDA Model of Parkinson`s Disease (in press PlosOne)

Salti, Ahmad; Nat, Roxana; Neto, Sonya; Puschban, Zoe; Wenning, Gregor; Dechant, Georg (2012): Expression of Early Developmental Markers Predicts the Efficiency of Embryonic Stem Cell Differentiation into Midbrain Dopaminergic Neurons. In: *Stem Cells Dev.*

Nat, Roxana; Salti, Ahmad; Suci, Laura; Ström, Susanne; Dechant, Georg (2012): Pharmacological Modulation of the Hedgehog Pathway Differentially Affects Dorsal/Ventral Patterning in Mouse and Human Embryonic Stem Cell Models of Telencephalic Development. In: *Stem Cells Dev.* 2012 21:1016-46

Publikationen ohne IFTZ-Erwähnung

Skreka K; Schafferer S, Nat R, Zywicki M, Salti A, Apostolova G,; Griehl M, Rederstorff M, Dechant G. and Huettenhofer A. Identification of differentially expressed non-coding RNAs in embryonic stem cell neural differentiation In *Nucl. Acid Res* 2012. 40:6001-15

El Rawas, Rana; Klement, Sabine; Salti, Ahmad; Fritz, Michael; Dechant, Georg; Saria, Alois; Zernig, Gerald (2012): Preventive role of social interaction for cocaine conditioned place preference: correlation with FosB/DeltaFosB and pCREB expression in rat mesocorticolimbic areas. In: *Front Behav Neurosci* 6, S. 8.

Fritz, Michael; El Rawas, Rana; Klement, Sabine; Kummer, Kai; Mayr, Michael J.; Eggart, Vincent et al. (2011): Differential effects of accumbens core vs. shell lesions in a rat concurrent conditioned place preference paradigm for cocaine vs. social interaction. In: *PLoS ONE* 6 (10), S. e26761.

Fritz, Michael; El Rawas, Rana; Salti, Ahmad; Klement, Sabine; Bardo, Michael T.; Kemmler, Georg et al. (2011): Reversal of cocaine-conditioned place preference and mesocorticolimbic Zif268 expression by social interaction in rats. In: *Addict Biol* 16 (2), S. 273–284.

Übersichtsartikel ohne IFTZ-Erwähnung

Nat, Roxana; Dechant, Georg (2011): Milestones of directed differentiation of mouse and human embryonic stem cells into telencephalic neurons based on neural development in vivo. In: Stem Cells Dev 20 (6), S. 947–958.

Nachwuchsförderung

Doktorarbeiten

Name, Vorname	Abschluss im Jahr	Universität, Fachbereich	Titel der Arbeit
Salti, Ahmad	2012	PhD NWI	Cell fate analysis of embryonic stem cells during in vitro differentiation to telencephalic and mesencephalic neurons as compared to in vivo development.
Neto, Sonya	2012	PhD NWI	Cell Fate Analysis of Embryonic Ventral Mesencephalic Grafts in the 6-OHDA Model of Parkinson`s Disease

5) Significance of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT-1) activation in primary tumors for treatment protocols

ao.Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Doppler
Sektion für Medizinische Biochemie

Zusammenfassung

The signal transducer and activator of transcription STAT1 serves as a key mediator of the action of interferons on cells of the innate and acquired immune system. It also can trigger cell cycle arrest and apoptosis in normal as well as cancer cells. The aim of the project was to investigate the role of this protein in the action of chemotherapeutic drugs currently used in the therapy of human breast cancer. Two drugs with different mode of action were studied in detail, namely (a) doxorubicin, which induces double strand breaks and thereby activates the ATM check point and (b) lapatinib, a receptor tyrosine kinase inhibitor, which inhibits HER2/erbB2/neu signaling in breast tumors. Cell culture models and animal models for breast cancer, which have been engineered for inducible knock-down of STAT1 or exhibit a complete STAT1 knock out were established and employed to assess how the action of these two drugs is dependent on STAT1 expression and activation.

Results obtained within the funding period:

1. *STAT1 deficiency causes in vivo resistance of mammary tumor from MMTV-neu transgenic mice to treatment with doxorubicin and lapatinib:* We were successful in establishing STAT1 proficient and deficient MMTV-neu tumor mice which have the same genetic background (FVB/N). These mice were treated over a period of three weeks with either doxorubicin, lapatinib or interferon gamma, or combinations of these three drugs, as soon as the appearance of mammary tumors was detected by palpation. The experiment revealed, that STAT1 deficiency significantly impaired the response to the in vivo mono-treatment with either doxorubicin or lapatinib. In the case of a combined treatment with doxorubicin and lapatinib the inhibition of tumor growth was completely abolished in STAT1 deficient mice. As expected, only STAT1 proficient animals responded to IFN gamma treatment. Since the findings with lapatinib and doxorubicin could be clinically very relevant, extensive investigations on the mechanism, how STAT1 deficiency leads to resistance to treatment were performed.

2. *Decreased sensitivity to chemotherapeutics is non-cell autonomous:* A protocol for establishing explant cultures of MMTV-neu mice was developed (ref. 1) and cultures from STAT1 deficient and proficient tumors used to analyze the response to the chemotherapeutic drugs lapatinib and doxorubicin in vitro. In contrast to the in-vivo results, no difference was observed when comparing cultures which express STAT1 or do not express it. This indicates, that the resistance to drug treatment observed in vivo in STAT1-deficient mice cannot be explained by a tumor epithelium autonomous mechanism. Similar results were obtained when comparing controls and STAT1 knock-down derivatives of the human breast cancer cell line SKBR-3.

3. *In vitro treatment of tumor slice cultures with IFN gamma induces apoptosis in a STAT1 dependent fashion:* We optimized the procedure to make slice cultures from tumors of MMTV-neu mice and published our procedure (ref. 1). The experimental system retains the 3D architecture of the tumor with its stroma. This technique was successfully applied to test the role of myeloid cells infiltrating the tumor stroma: the STAT1 target gene iNOS - predominantly induced by IFN gamma in myeloid

cells - was identified to be at least partially responsible for the induction of apoptosis by IFN gamma (ref. 2). However, with the same experimental system, induction of cell death by treatment with doxorubicin and lapatinib was not found to be dependent on STAT1 expression. This indicates that an *in-vitro* system retaining important structural features of the tumor is still not able to recapitulate the findings observed *in-vivo* regarding resistance of STAT1 deficient mice to drug treatment.

Conclusions and outlook:

By *in vivo* experiments we could verify our initial hypothesis, that STAT1 is an important mediator of sensitivity to chemotherapeutic drugs. Since the striking effects of STAT1 were only observed *in vivo* and not with tumor cell lines *in vitro* or with 3D cultures, we are currently following up the hypothesis, that STAT1 proficient tumor stroma functions as an essential mediator of the response to chemotherapy and that a systemic response via recruitment and activation of immune effector cells contributes to the action of these drugs. We have identified CD11b⁺CD11c⁺ myeloid cells as well as infiltrating T-cells as potential contributors for the observed STAT1 dependent effects. Myeloid cells represent the major population of hematopoietic infiltrating cells in MMTV-neu tumors (ref. 2), are significantly decreased in number in STAT1 deficient tumors and express genes required for antigen presentation in a STAT1 dependent fashion. Furthermore, Stat1-deficient tumor mice exhibited impaired T-cell activation and reduced T-cell infiltration by the tumor in response to drug treatment. The Figure below summarizes our current view. The ongoing studies are currently performed by a Ph.D. student and funded by the Doctoral College in Molecular Cell Biology and Oncology. A manuscript describing these findings is currently under revision. In collaboration with clinical departments, the clinical relevance of our findings obtained in a mouse model is explored by investigating tumor material from breast cancer, colon cancer and head and neck cancer patients (manuscripts in preparation).

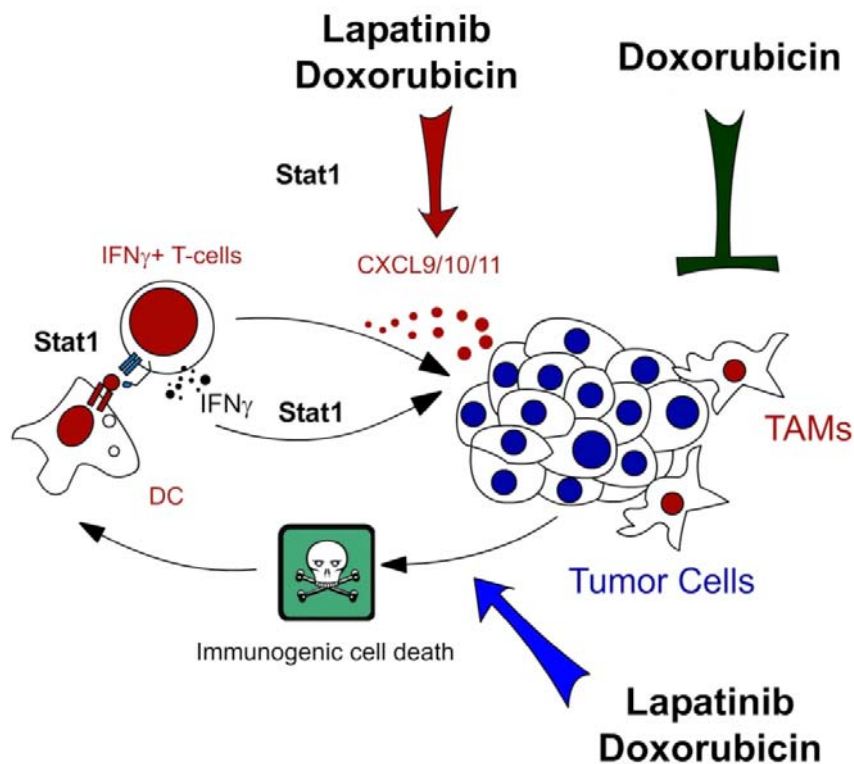


Abb. 5 STAT1 dependent interaction between tumor and infiltrating cells in the response to chemotherapy

Novel findings obtained with STAT1 deficient mice outside the main scope of the funded project:

- a) Teratoma formation: Examination of STAT1 deficient MMTV-neu mice revealed that these mice develop differentiated ovarian teratomas with low penetrance. Investigations on the mechanism point to a role for STAT1 in protecting from teratoma formation in a later step of tumorigenesis, e.g. by inducing apoptosis and eliminating premature or aberrantly formed follicles which have the potential to transform into teratomas (ref. 3).
- b) Early defect in B-cell development: An impaired recovery from myelosuppression after doxorubicin treatment was observed in STAT1 deficient mice. An early defect of B-cell maturation in the bone marrow was discovered as underlying mechanisms in a different project by a Ph.D. student.

Fördervolumen des Projekts innerhalb des IFTZ

Laufzeit des Projekts:	11/2007 – 10/2010
Sachmittel/Investitionen:	€ 94.367,70
Personalstellen:	Sonja Philipp; MTF 50 %; 36 Monate Lára Hannesdóttir, PhD-Studentin; 33,5 Monate

Publikationen mit IFTZ-Erwähnung

Parajuli, Nirmala; Doppler, Wolfgang (2009): Precision-cut slice cultures of tumors from MMTV-neu mice for the study of the ex vivo response to cytokines and cytotoxic drugs. In: In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim 45 (8), S. 442–450.

Parajuli, Nirmala; Müller-Holzner, Elisabeth; Böck, Günther; Werner, Ernst R.; Villunger, Andreas; Doppler, Wolfgang (2010): Infiltrating CD11b+CD11c+ cells have the potential to mediate inducible nitric oxide synthase-dependent cell death in mammary carcinomas of HER-2/neu transgenic mice. In: Int. J. Cancer 126 (4), S. 896–908.

Hannesdóttir, Lára; Daschil, Nina; Philipp, Sonja; Tymoszuk, Piotr; Müller-Holzner, Elisabeth; Klima, Günter; Verdorfer, Irmgard; Doppler, Wolfgang (2012): MMTV-neu mice deficient in STAT1 are susceptible to develop ovarian teratomas. In: Int. J. Dev. Biol. 56 (4), S. 279-283.

Eingeworbene qualifizierte Drittmittel:

Projektleitung	Titel des Vorhabens	Fördernummer u. -organisation	Laufzeit des Projektes	Fördersumme pro Haushaltsjahr
Wolfgang Doppler	Role of STAT1 in early B-cell development	FWF Doktoratskolleg MCBO	03/2009 - 02/2013	€ 40.000
Wolfgang Doppler	Infiltrating immune cells in MMTV-neu tumors	FWF Doktoratskolleg MCBO	12/2009 - 06/2013	€ 40.000
Wolfgang Doppler	Significance of STAT1 activation in colon cancer	Österreichische Krebshilfe	02/2009 - 12/2010	€ 25.000

Kooperationen mit anderen Teilprojekten / Vernetzung innerhalb des Zentrums

Our project was collaborating with the IFTZ Project lead by Andreas Villunger in several aspects: sharing mice for breeding, FACS analysis of infiltrating cells, immunohistochemical analysis of tissue sections, TUNEL assays and RNA isolation. The two technicians employed by the IFTZ (Sonja Philipp and Stephanie Faserl) worked in both projects. We have one joint publication documenting our collaboration:

Parajuli N, Müller-Holzner E, Böck G, Werner ER, Villunger A, Doppler W. (2009) Infiltrating CD11b(+)CD11c(+) cells have the potential to mediate inducible nitric oxide synthase dependent cell death in mammary carcinomas of HER-2/neu transgenic mice. In: *Int. J. Cancer* 126 (4), S. 896–908.

Nachwuchsförderung:

Diplomarbeiten

Name, Vorname	Abschluss im Jahr	Universität, Fachbereich	Titel der Arbeit
Pohle, Susanne	2009	Medizinische Univ. Innsbruck	STAT1 and STAT3 activity in oral squamous cell carcinoma: Significance and correlation with clinical and pathological parameters
Daschil, Nina	2011	Univ. Innsbruck, Molekularbiologie	Durchflusszytometrische Untersuchungen von Mammatumoren und Milchdrüsen in STAT1 defizienten MMTV-neu Mäusen

Doktorarbeiten

Name, Vorname	Abschluss im Jahr	Universität, Fachbereich	Titel der Arbeit
Hannesdottir, Lára	2011	Medizinische Universität Innsbruck, Ph.D. Programm Mol. Onc.	Impact of STAT1 on tumor development and response to therapy in a mouse model of erbB2 positive breast cancer

6) Tyrosine phosphorylation of p27Kip1 – prognostic and therapeutic potential

Univ.-Prof. Dr. Ludger Hengst

Sektion für Medizinische Biochemie

Zusammenfassung

The decision between cell proliferation and exit from the cell cycle is tightly controlled by complex signaling networks that permit necessary and prevent inappropriate cell divisions. If these networks malfunction or become hyperactivated, excessive cell divisions can cause hyperproliferative diseases including cancer. At the molecular level, commitment to cell proliferation converges in the activation of G1-specific cyclin-dependent kinases (Cdks). Mitogenic signals lead to activation of G1 Cdk complexes, whereas antimitogenic signaling prevents their activation. Active G1 Cdks permit the progression from G1 into S-phase. The Cip/Kip Cdk inhibitory proteins p21-Cip1 and p27-Kip1 play a key role in regulating the activation of cyclin-dependent kinases. Usually, Cip/Kip proteins bind and inactivate Cdks. Loss of the Cdk-inhibition by p27 or p21 can be a result of deregulated oncogenic signal transduction pathways. We have recently discovered a novel direct molecular link between p27 and an increasing number of oncogenic tyrosine kinases. These include Lyn, cSrc, BCR-Abl and JAK2, which all can directly phosphorylate p27 on tyrosine residue 88 (Y88), a residue which is also conserved in the related protein p21. Phosphorylation at this position impairs the ability of p27 to inactivate Cdks, without altering its binding or affinity to the Cdk complex. Phosphorylation at Y88 also permits the inhibitor to assemble active Cdks, thus converting the tumor suppressor into an oncogene. Y88 phosphorylation can further initiate and facilitate p27 SCF^{Skp2}-dependent proteasomal degradation.

In order to investigate the role of Cip/Kip protein tyrosine phosphorylation in colon cancer, we generated a mouse model where Y88 is mutated so that it cannot become phosphorylated. We also obtained colon cancer-derived cell lines from the groups of Lukas A. Huber and Raimund Margreiter. 11 cell lines have been used to characterize p27 and p21 expression and p27 tyrosine-88 phosphorylation. We compared the expression to overall tyrosine kinase and specific cSrc activity. In addition, we used inhibitors of tyrosine phosphatases to investigate the role of tyrosine phosphorylation on CDK inhibitor proteins. To determine the potential of p27-Y88 tyrosine phosphorylation in cancer development, we have generated p27-Y88F knock-in mice. We aim to establish a Src-driven colon cancer model and to compare cancer development in wt and p27-Y88F knock-in animals. Due to space problems in the mouse facility, we needed to postpone these experiments until the animal facility is available in Innrain 80/82, later this year.

Interestingly, we observed in course of our experiments that pervanadate leads to a reduction of p27 protein level and induces an even stronger loss of the related CDK inhibitor p21-Cip1. p21 protein level are reduced to less than 30% within 15 min of pervanadate treatment. As the regulation of p21 was very dramatic, we focused on the analysis of a novel pathway which severely impairs the stability of p21. To generate pervanadate, vanadate is incubated with H₂O₂. To our surprise, low concentrations of H₂O₂ are sufficient to eliminate the p21 protein. As mitogens can induce cell proliferation by mild H₂O₂ production, we have further elucidated the molecular mechanisms of this exciting novel posttranscriptional regulation of p21 expression. We found that H₂O₂ induces p21 proteasomal degradation. The regulation of p21 degradation is independent of all so far known p21 E3 ubiquitin ligases. We have identified motives on p21, which mediate the

H₂O₂ triggered degradation of the inhibitor. Results of these studies are currently written into a manuscript.

Fördervolumen des Projekts innerhalb des IFTZ

Laufzeit des Projekts: 01/2008 – 12/2011^{*}
Sachmittel/Investitionen: € 89.373,93
Personalstellen: Univ.-Ass. Dr. Jonathan Vosper; Univ.-Assistent; 48 Monate^{**}

Publikationen ohne IFTZ-Erwähnung

Jäkel, H.; Weinl, C.; Hengst, L. (2011): Phosphorylation of p27Kip1 by JAK2 directly links cytokine receptor signaling to cell cycle control. In: *Oncogene* 30 (32), S. 3502–3512.

Übersichtsartikel mit IFTZ-Erwähnung

Jäkel, Heidelinde; Peschel, Ines; Kunze, Clarissa; Weinl, Christina; Hengst, Ludger (2012): Regulation of p27 (Kip1) by mitogen-induced tyrosine phosphorylation. In: *Cell Cycle* 11 (10), S. 1910–1917.

Übersichtsartikel ohne IFTZ-Erwähnung

Chu, Isabel M.; Hengst, Ludger; Slingerland, Joyce M. (2008): The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. In: *Nat. Rev. Cancer* 8 (4), S. 253–267.

Ecker, Karin; Hengst, Ludger (2009): Skp2: caught in the Akt. In: *Nat. Cell Biol* 11 (4), S. 377–379.

^{*} kostenneutrale Verlängerung von VR Forschung genehmigt.

^{**} Aus personalrechtlichen Gründen konnten PostDocs im IFTZ nur über 4 Jahre angestellt werden (daher Anstellungsdauer > Projektdauer).

Eingeworbene qualifizierte Drittmittel

Projektleitung	Titel des Vorhabens	Fördernummer u. - organisation	Laufzeit des Projektes	Fördersumme pro Haushaltsjahr (gesamte Fördersumme)
Ludger Hengst	Regulation of p27Kip1 by tyrosine phosphorylation	FWF P18873-B12	03/2006 – 04/2011	(€ 357.168 /4) € 89.292
Ludger Hengst	Cell cycle phase- and localisation specific modifications and interactions of p27Kip1	FWF project F2115-B11	01/2008 – 12/2010	(€ 348.450 /3) € 116.150
Ludger Hengst	Regulation of the CDK inhibitor p27Kip1 by phosphatases	FWF - DK-plus project W1101-B12	2008 – 2010	(€ 132.580 /3) € 44.193,33
Ludger Hengst	p27-Y88 phosphorylation by BCR-Abl, JAK2-V617F and FLT3-ITD in tumor development	FWF project P24031-B20	01/2011 – 10/2014	(€ 342.412 /3) € 114.237,33
Ludger Hengst	EPO-Can	EU FP7 project	10/2011 – 09/2014	

Kooperationen mit anderen Teilprojekten / Vernetzung innerhalb des Zentrums

Es wurde mit den Gruppen von Lukas A. Huber und Raimund Margreiter kooperiert.

7) Regulation of antigen presenting properties of dendritic cells by the p14-MP1-MAP kinase scaffolding complex – studies in mouse models and humans

Univ.-Prof. Dr. Lukas A. Huber

Sektion für Zellbiologie

Univ.-Prof. Dr. Nikolaus Romani

Universitätsklinik für Dermatologie und Venerologie

Zusammenfassung

The aim of the project was to investigate the role of the late endosomal adapter protein p14 for dendritic cell function. To elucidate the importance of p14 on molecular and immunological level, collaboration between the laboratory of Prof. Dr. Lukas A. Huber (Division of Cell Biology, Biocenter, Innsbruck Medical University) and Prof. Dr. Nikolaus Romani (Dermatology, Innsbruck Medical University) was established.

Dendritic cells are key players of the immune system and link innate to adaptive immune responses. Their major task is the uptake and processing of pathogens and subsequent presentation of antigens to T cells. These processes are strongly dependent on endosomal/lysosomal trafficking. Conditional gene disruption of the adapter protein p14 in mice demonstrates that the late endosomal p14/MP1-MEK1 signaling complex is required to control endosomal traffic and tissue homeostasis (Teis et al., JCB, 2006). To address the molecular function of p14 in dendritic cells, we generated a conditional knock out mouse model which allows the specific deletion of p14 in CD11c expressing cells.

Results of the Huber group:

The knock out mice were viable but developed a severe pathological phenotype resembling a myeloid proliferative disorder (MPD) at the age of two to three months. The most obvious morphological symptoms included enlarged lymph nodes and splenomegaly. The structural morphology of these organs was disarranged and massive leukocyte infiltrates were observed, which could further be identified as dendritic cells. Additionally, the mice developed infiltrates of monocytes and activated dendritic cells in skin and liver.

These infiltrates were also surrounded by single T cells being known as the direct interaction partners of activated dendritic cells. The bone marrow of the CD11c-p14 knock out mice was hyperplastic, accompanied by an increase of hematopoietic stem cells. Furthermore a MPD characteristic shift from the granulocytic towards the monocytic/dendritic cell lineage, an increase in the T helper cell population and a decrease of the erythrocyte progenitors was observed. In the serum of the CD11c-p14 knock out mice at the age of 1 to 6 months, Flt3-ligand, a specific cytokine inducing conventional dendritic cell differentiation (Merad M. and Manz M., 2009, Blood), was significantly elevated. Additionally, its receptor Flt3 showed an increased surface localization on splenic dendritic cells. Similar observations were made in p14 depleted keratinocytes where the degradation of the EGF receptor was severely disturbed leading to an accumulation on the plasma membrane (Teis D. et al., 2006, JCB). The accumulation of the receptor on the cell surface and the enhanced availability of its ligand resulted in an increased downstream signaling of Flt3 shown by the phosphorylation of the mTOR target p70 S6 kinase 1. This pathway downstream of the Flt3 receptor is known to be crucial for dendritic cell differentiation (Sathaliyawala T. et al., 2010, Immunity). To confirm our hypothesis, control and CD11c-p14 knockout mice were treated with the mTOR inhibitor rapamycin and AC220, a specific Flt3 kinase inhibitor (Zarrinkar P.P. et al., 2009, Blood). Interestingly, both treatments could rescue the phenotype observed in the CD11c-p14 knockout mice. The expansion of the dendritic cell compartment causing morphological alterations

in the lymphoid organs was inhibited and accompanied by a normalization of the T helper cell compartment.

Finally, we can conclude that the p14 deletion in dendritic cells leads to a membranous accumulation of the Flt3 receptor resulting in an increased mTor activation which severely affects tissue homeostasis and eventually leads to a myeloid proliferative disease.

Literature cited

Teis, David; Taub, Nicole; Kurzbauer, Robert; Hilber, Diana; Araujo, Mariana E. de; Erlacher, Miriam et al. (2006): p14-MP1-MEK1 signaling regulates endosomal traffic and cellular proliferation during tissue homeostasis. In: *J. Cell Biol* 175 (6), S. 861–868.

Merad, Miriam; Manz, Markus G. (2009): Dendritic cell homeostasis. In: *Blood* 113 (15), S. 3418–3427.

Sathaliyawala, Taheri; O'Gorman, William E.; Greter, Melanie; Bogunovic, Milena; Konjufca, Vjollca; Hou, Z. Esther et al. (2010): Mammalian target of rapamycin controls dendritic cell development downstream of Flt3 ligand signaling. In: *Immunity* 33 (4), S. 597–606.

Zarrinkar, Patrick P.; Gunawardane, Ruwanthi N.; Cramer, Merryl D.; Garner, Michael F.; Brigham, Daniel et al. (2009): AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML). In: *Blood* 114 (14), S. 2984-2992.

Results of the Romani group:

Focussing on the skin, we found that the CD11c-specific p14 deletion severely affected the *Langerhans cells*, a subpopulation of skin dendritic cells, residing within the suprabasal layer of the epidermis. Detailed flow cytometric, as well as fluorescence microscopic analyses of the skin of adult knock-out mice (Abb. 6), showed an almost complete disappearance of the Langerhans cell population. This striking phenotype was highly consistent. It was also reflected in the skin-draining lymph nodes where the population of langerin+/CD103-negative dendritic cells, i.e. Langerhans cells derived from the epidermis, was largely lacking. The loss of Langerhans cells was specifically related to the loss of p14 in Langerhans cells (i.e. a CD11c-expressing cell) as emphasized by the second subset of dendritically shaped leukocytes in the epidermis, namely the CD11c-negative "dendritic epidermal T cells / DETC", that were completely unaffected in the knock out mice. Furthermore, bone marrow transfer experiments ("chimeric mice") confirmed that the decrease in Langerhans cells is definitely due to the cell-intrinsic deletion of the p14 molecule rather than being dependent on exogenous factors like structural alterations of the skin or altered cytokine secretion, which are known to be crucial for the homeostasis of Langerhans cells in vivo (Kaplan et al., 2007).

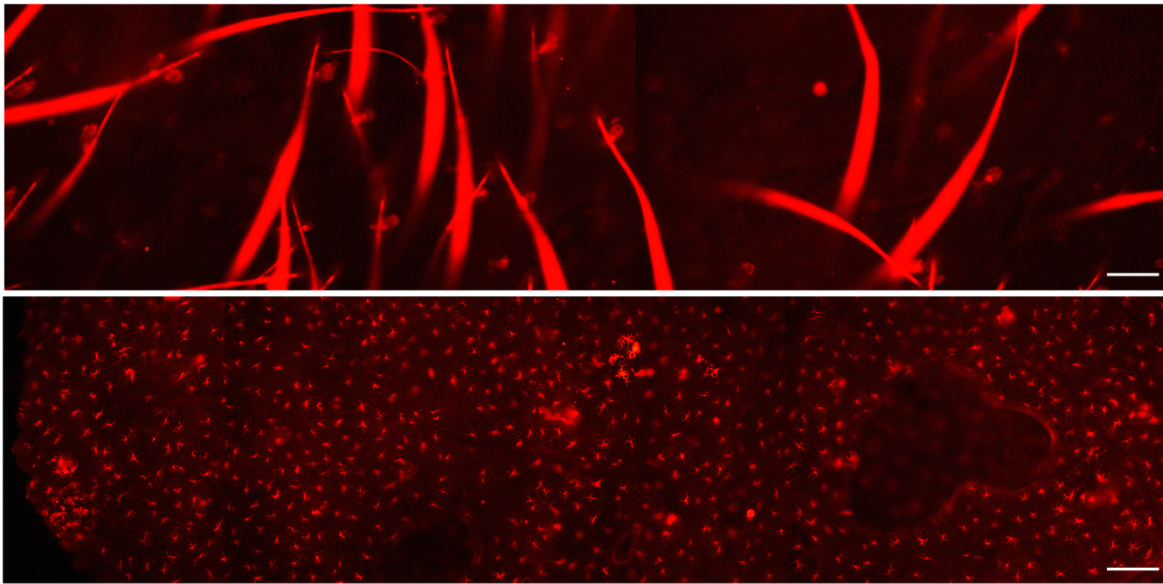


Abb. 6 Illustration of the striking absence of Langerhans cells in p14 knock-out mice. Immunofluorescence of epidermal sheet derived from an adult CD11c-p14_{del} (upper panel) and control mouse (lower panel). The dense network of Langerhans cells in the upper picture is completely absent in the lower picture. Langerhans cells are identified by their MHC class II expression. (Scale bar: 100µm).

We furthermore observed that the decrease of Langerhans cells was accompanied by an increased maturation status of the Langerhans cells and other CD11c+ dendritic cells, indicated by the upregulation of MHC class II as well as of costimulatory molecules, like CD40 and CD86. This was investigated quantitatively as well as qualitatively by flow cytometry and immunofluorescence of skin and skin-draining lymph nodes. As a consequence of this severe skin-related phenotype, the p14 deficient mice showed a significant decrease of antigen-specific T lymphocyte responses upon epicutaneous immunization with a model antigen (ovalbumin), which further highlights the role of Langerhans cells in the induction and regulation of immune responses. In order to study kinetics and mechanisms of the absence of Langerhans cells, we analysed skin of newborn mice. The initial population of the skin by Langerhans cells remained unaffected. It occurred in the same manner as shown by Chorro L et al. (2009) for normal wild-type mice - data that we could readily reproduce. The loss of Langerhans cells started within one week after birth and reached about 100% approximately 3 to 4 weeks later. One hypothetical explanation for the decline of Langerhans cells, that is specific emigration of Langerhans cells to the skin draining lymph nodes shortly after birth could be excluded since flow cytometry of skin-draining lymph nodes of newborn mice did not show any increase in migratory Langerhans cells. Apoptosis, another explanation, is supported by immunofluorescence staining of Langerhans cells *in situ* for the apoptosis marker "active caspase-3". These experiments revealed a significant increase in apoptotic Langerhans cells within the epidermis of p14 deficient mice. In parallel, *in situ* analyses of the proliferation of Langerhans cells did disclose diminished cell division in these cells. Immunofluorescence staining assays for select proliferation makers (phospho-histone-H3) led to these observations.

Thus, the almost complete loss of LCs in adult epidermis, is caused in tandem by increased apoptosis and impaired proliferation of LCs few days after birth. We conclude that p14 acts as an important regulator of LC homeostasis.

Data accumulated within the 3-year IFTZ research period have significantly augmented our knowledge about both the role of the p14 molecule and the regulation of Langerhans cell development and homeostasis. They formed a solid basis for further studies that will eventually lead to a more profound understanding of scaffolding proteins in dendritic cells and thus, eventually, to the harnessing of this knowledge for improved dendritic cell immunotherapy.

Literature cited

Kaplan, Daniel H.; Li, Ming O.; Jenison, Matthew C.; Shlomchik, Warren D.; Flavell, Richard A.; Shlomchik, Mark J. (2007): Autocrine/paracrine TGFbeta1 is required for the development of epidermal Langerhans cells. In: *J. Exp. Med* 204 (11), S. 2545–2552.

Chorro, Laurent; Sarde, Aurélien; Li, Mei; Woollard, Kevin J.; Chambon, Pierre; Malissen, Bernard et al. (2009): Langerhans cell (LC) proliferation mediates neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network. In: *J. Exp. Med* 206 (13), S. 3089–3100.

Fördervolumen des Projekts innerhalb des IFTZ

Laufzeit des Projekts:	04/2008 – 05/2011*
Sachmittel/Investitionen:	€ 76.413,13
Personalstellen:	Julia Scheffler; Doktorandin; 36 Monate Florian Sparber; Doktorand; 36 Monate Karin Gutleben; TA 80 %; 26 Monate

* kostenneutrale Verlängerung von VR Forschung genehmigt

Publikationen mit IFTZ-Erwähnung

Scheffler, Julia ; Sparber, Florian ; Blitz, Johanna; Herrmann, Caroline; Reizis, Boris; Romani, Nikolaus; Stoitzner, Patrizia; Huber, Lukas A.: Conditional gene ablation of the MAP kinase adapter protein p14 in dendritic cells induces a myeloid proliferative disorder.
In submission for publication

Sparber, Florian ; Amberg, Nicole; Scheffler, Julia; Tripp, Christoph H.; Heib, Valeska ; Hermann, Martin ; Aneichyk, Tatsiana; Rainer, Johannes; Zahner, Sonja P.; Clausen, Björn E.; Reizis, Boris; Huber, Lukas A.; Stoitzner, Patrizia; Romani, Nikolaus: The adaptor molecule p14 represents a novel regulator of Langerhans cell homeostasis.
In submission for publication

Additional collaborative publications mit IFTZ-Erwähnung

Tripp, Christoph H.; Sparber, Florian; Hermans, Ian F.; Romani, Nikolaus; Stoitzner, Patrizia (2009): Glycolipids injected into the skin are presented to NKT cells in the draining lymph node independently of migratory skin dendritic cells. In: *J. Immunol* 182 (12), S. 7644–7654.

Sparber, Florian; Tripp, Christoph H.; Hermann, Martin; Romani, Nikolaus; Stoitzner, Patrizia (2010): Langerhans cells and dermal dendritic cells capture protein antigens in the skin: possible targets for vaccination through the skin. In: *Immunobiology* 215 (9-10), S. 770–779.

Additional collaborative publications ohne IFTZ-Erwähnung

Flacher, Vincent; Sparber, Florian; Tripp, Christoph H.; Romani, Nikolaus; Stoitzner, Patrizia (2009): Targeting of epidermal Langerhans cells with antigenic proteins: attempts to harness their properties for immunotherapy. In: *Cancer Immunol. Immunother* 58 (7), S. 1137–1147.

Übersichtsartikel mit IFTZ-Erwähnung

Romani, N.; Flacher, V.; Tripp, C. H.; Sparber, F.; Ebner, S.; Stoitzner, P. (2012): Targeting skin dendritic cells to improve intradermal vaccination. In: *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 351, S. 113–138.

Stoitzner, Patrizia; Sparber, Florian; Tripp, Christoph H.: Langerhans cells as targets for immunotherapy against skin cancer. In: *Immunol. Cell Biol* 88 (4), S. 431–437.

Eingeworbene qualifizierte Drittmittel

Projektleitung	Titel des Vorhabens	Fördernr. und -organisation	Laufzeit des Projektes	Fördersumme pro Haushaltsjahr
Nikolaus Romani	Development of a novel vaccination strategy in humans by harnessing the immunogenic potential of skin dendritic cells - Entwicklung einer neuen Impfstrategie beim Menschen durch gezieltes Ausnützen ("targeted therapy") der immunogenen Eigenschaften der dendritischen Zellen der Haut	ÖNB, Nr.13479	08/2009 - 07/2011	€ 38.500
Nikolaus Romani	The role of the p14-MP1-MAP kinase scaffold complex in Langerhans cell biology	FWF, P23548	05/2011 - 04/2014	€ 100.000

Kooperationen mit anderen Teilprojekten / Vernetzung innerhalb des Zentrums

Innerhalb des IFTZ bestand eine Kollaboration unseres Labors mit Wolfgang Doppler, *Significance of STAT1 activation in primary tumors for treatment protocols*, in Bezug auf die Charakterisierung der Tumor-infiltrierenden Leukozyten. In diese Experimente war auch der IFTZ Doktorand Sparber eingebunden.

Weiters bestanden innerhalb des Biozentrums eine enge Kollaboration mit einem IFTZ Projekt, Nikos Yannoutsos. Hier wurden gemeinsam Maus-knockout Modelle generiert und molekularbiologisch untersucht.

Nachwuchsförderung

Doktorarbeiten

Name, Vorname	Abschluss im Jahr	Universität, Fachbereich	Titel der Arbeit
Sparber, Florian	ca.2011 - 2012	MUI, Q94, MCB	Regulation of antigen presenting properties of dendritic cells by the p14-MP1-MAP kinase scaffolding complex – studies in mouse models and humans
Scheffler, Julia	ca.2011 - 2012	MUI, Q94, MCB	Regulation of antigen presenting properties of dendritic cells by the p14-MP1-MAP kinase scaffolding complex – studies in mouse models and humans

8) NOGO receptors in nociception

*Univ.-Prof. Dr. Michaela Kress
Sektion für Physiologie*

Zusammenfassung

Possible changes in somatosensory processing may either be located at the peripheral nociceptive nerve terminal or at the site of synaptic transmission in the dorsal horn of the spinal cord. Although candidate gene approaches have identified several ion channels that are expressed in mammalian somatosensory neurons, none of these channels has been shown to be essential for mechanotransduction. Moreover, the diversity of mechanosensitive cells suggests that multiple mechanisms underlie transduction and that not only ion channels but tether molecules could be involved. It was hypothesized that reticulons like Nogo could serve as tethers for mechanotransduction, and therefore, mice carrying null mutations for the Nogo receptors Ngr1 or Ngr2 were investigated for their sensitivity to mechanical stimuli.

In order to elucidate the mechanism of the increased mechanosensitivity in Ngr KO mice, the project set out to address the question whether primary afferent nociceptors derived from Ngr KO mice were different from those of wildtype animals. The project plan addressed nociceptive wiring and synaptic transmission in the spinal dorsal horn in Ngr KO vs. wildtype mice and possible differences in gene expression in the dorsal root ganglion and spinal cord dorsal horn that could account for changes in mechanosensation. The overall aim of the project was to identify molecules that mediate mechanotransduction and this is an essential step in elucidating mechanisms that initiate touch and pain. It was expected to promote our understanding of how sensory signaling is altered under conditions of inflammation and chronic pain.

Functional properties (conduction velocity, thermal, mechanical threshold) of nociceptive afferents were determined in the skin-nerve in vitro preparation obtained from wt and knock-out mice. In order to detect differences in the size of specific subpopulations of thinly myelinated and unmyelinated units, we recorded mechanically evoked action potential discharge activity from single primary afferent nerve. Mechanosensitive nociceptors from Ngr KO mice tended to exhibit lower mechanical von Frey thresholds as compared to fiber populations from wt. This was hypothesized to be possibly due to changes in skin architecture and or innervation. Immunohistochemical analyses have been performed in skin sections to screen for morphological changes and changes in innervation density and pattern that might be related to mechanosensation. Innervation density indeed was significantly increased in NGR KO mice as compared to wt littermates.

Gene chip analyses yielded 35 genes that were significantly downregulated by a factor of 2 and 11 genes that were significantly upregulated by a factor of 2 in Ngr2 KO mice. Differences between the strains have to be confirmed with quantitative real time PCR, immune staining and biochemical assays (Western blot, coimmunoprecipitation) and correlated with functional experiments.

Fördervolumen des Projekts innerhalb des IFTZ

Laufzeit des Projekts: 03/2008 – 02/2011
Sachmittel/Investitionen: € 103.331,64
Personalstellen: Alesja Rjabokon; Doktorandin; 14,5 Monate
Claudia Mattissek; Doktorandin; 21 Monate*

Publikationen ohne IFTZ-Erwähnung

Wörter, Verena; Schweigreiter, Rüdiger; Kinzel, Bernd; Mueller, Matthias; Barske, Carmen; Böck, Günther et al. (2009): Inhibitory activity of myelin-associated glycoprotein on sensory neurons is largely independent of NgR1 and NgR2 and resides within Ig-Like domains 4 and 5. In: PLoS ONE 4 (4), S. e5218.

Nachwuchsförderung

Doktorarbeiten

Name, Vorname	Abschluss im Jahr	Universität, Fachbereich	Titel der Arbeit
Mattissek Claudia	2013	MUI	Regulation of neuropathic pain by matrix associated proteins

* Die Fördermittel zur Finanzierung dieser Stelle wurden nicht über das IFTZ Budget, sondern über andere Forschungsfördertöpfe finanziert

9) Der Rolle von Chromatin-modifizierenden Aktivitäten während der Oogenese und frühen Embryonalentwicklung

Ao.Univ.-Prof. Dr. Alexandra Lusser

Sektion für Molekularbiologie

Zusammenfassung

In Metazoa setzt die Befruchtung der Eizelle durch die Samenzelle eine Kaskade von zellulären Prozessen in Gang, die zur Entwicklung eines Embryos mit je einer Kopie des väterlichen und mütterlichen Genoms führt. Damit die Zygotenbildung erfolgen kann, muss es in der befruchteten Eizelle zu einer tiefgreifenden Umgestaltung des väterlichen pronukleären Chromatins kommen.

Ziel dieses Projektes war die Aufklärung der an dieser Restrukturierung des pronukleären Chromatins beteiligten Faktoren und Prozesse. In früheren Arbeiten konnten wir zeigen, dass das molekulare Motorprotein CHD1 eine zentrale Rolle beim Einbau der Histonvariante H3.3 in das paternale pronukleäre Chromatin in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* spielt. Im Rahmen dieses Projekts sollte untersucht werden, ob CHD1 eine ähnliche Bedeutung für die frühe Embryonalentwicklung in Mammalia hat und welche anderen Faktoren daran beteiligt sind. Dazu haben wir 3 spezifische Projektziele definiert: 1) Untersuchung der Mechanismen der Umgestaltung pronukleären Chromatins in *Drosophila*. 2) Charakterisierung von Chd1 und Chd2 in weiblichen Keimbahnzellen von Maus und Mensch. 3) Untersuchung der biologischen Funktionen von Chd1 in der Maus.

Obwohl die Arbeiten an allen drei Projektteilen noch nicht abgeschlossen sind, haben wir insbesondere aus den Teilprojekten 1 und 3 in Zusammenarbeit mit Dr. N. Yannoutsos und Prof. A. Villunger wertvolle Resultate erzielt, die im Falle von Teilprojekt 3 auch die Basis für einen erfolgreichen Projektantrag im Rahmen des SFB F44 „Cell Signaling in Chronic CNS Disorders“ darstellten.

Fördervolumen des Projekts innerhalb des IFTZ

Laufzeit des Projekts:	11/2007 – 10/2010
Sachmittel/Investitionen:	€ 71.967,07
Personalstellen:	Paolo Piatti; Doktorand; 36 Monate Hildegard Wörle; BMA; 36 Monate

Publikationen:

-

Übersichtsartikel

Morettini, Stefano; Podhraski, Valerie; Lusser, Alexandra (2008): ATP-dependent chromatin remodeling enzymes and their various roles in cell cycle control. In: *Front. Biosci* 13, S. 5522–5532.

Eingeworbene qualifizierte Drittmittel

Projektleitung	Titel des Vorhabens	Fördernr. u. - organisation	Laufzeit des Projektes	Fördersumme pro Haushaltsjahr
Alexandra Lusser (Subprojektleiterin; Network Koordinator: Dr. Andreas Ladurner, EMBL	Role of CHD1 in centromeric chromatin assembly	EU: FP7-PEOPLE- ITN: 23817 (Nucleosome4D)	11/2009 – 10/2013	€ 66.446
Alexandra Lusser (Teilprojekt 08, SFB F44; Koordinator: Dr. Jörg Striessnig, LFU Innsbruck)	Chromatin remodeling in neurogenesis and neurological disease	FWF: SFB F44	03/2011 – 02/2015	€ 92.660

Nachwuchsförderung

Diplomarbeiten

Name, Vorname	Abschluss im Jahr	Universität, Fachbereich	Titel der Arbeit
Wille, Alexandra	2012	LFU, Molekularbiologie	Charakterisierung eines konservierten putativen Promotorbereiches des Gens Chd1 in der Maus

Doktorarbeiten

Name, Vorname	Abschluss im Jahr	Universität, Fachbereich	Titel der Arbeit
Piatti, Paolo	2012	MUI, Molekularbiologie	Generation of a Conditional Mouse Model of CHD1

10) Charakterisierung von Risiko- und Biomarkern der Parkinson-Krankheit

Ao.Univ.Prof. Dr. Klaus Seppi, Ao.Univ.Prof. Dr. Christoph Scherfler
 Universitätsklinik für Neurologie

Zusammenfassung

Hintergrund der Studie: Der Morbus Parkinson ist eine häufige neurodegenerative Erkrankung der älteren Bevölkerung. Klinische Studien ergaben, dass zum Zeitpunkt der Diagnosestellung schon über 50 Prozent der dopaminergen Neurone untergegangen sind. Wenn man davon ausgeht, dass es zu einer 7---9---prozentigen jährlichen Abnahme der dopaminergen Zellen kommt, kann man den Krankheitsbeginn beim Auftreten der ersten motorischen Symptome um mindestens 4---6 Jahre zurückrechnen. Derzeit ist eine kausale Behandlung der Parkinson---Krankheit nicht möglich, weshalb die Identifizierung neuroprotektiver Medikamente ein wichtiges Ziel in der Erforschung dieser neurodegenerativen Erkrankung ist. Eine effektive Therapie wäre jedoch nur dann sinnvoll anwendbar, wenn eine sehr frühe Intervention, d. h. noch vor Auftreten der motorischen Symptome, möglich wäre. Zu diesem Zweck ist die Identifizierung von Biomarkern von großem klinischen und wissenschaftlichen Interesse. Biomarker sind messbare biologische Merkmale, die einen normalen biologischen, einen krankhaften Prozess, die Krankheitsdauer oder den Response auf eine Therapie in vivo widerspiegeln.

Arbeitshypothese und Ziele: In dieser Studie soll die prädiktive Wertigkeit der Parameter: Hyposmie, Hyperechogenität im Mittelhirn, strukturelle Veränderungen mittels diffusionsgewichteter MRT-Bildgebung sowie Markes aus dem peripheren Blut als Risikomarker für die Entwicklung einer Parkinson-Krankheit validiert werden. Die Ziele der Studie sind:

- 1) in einem Cross-over Design die prädiktive Wertigkeit der genannten Marker zunächst bei asymptomatischen Patienten mit der [18]F-Dopa PET zu validieren um
- 2) in einer Längsschnittuntersuchung die prädiktive Wertigkeit der erhobenen Krankheitsmerkmale bei Patienten mit neuauftretener Parkinson-Krankheit zu bestimmen. Zur Steigerung der statistischen Aussagekraft wird ein Datenpooling mit den kooperierenden Zentren der Neurologischen Kliniken in Tübingen und Homburg/ Saar durchgeführt.

Marker mit hohem Vorhersagewerte würden maßgeblich zur Identifikation von Risikopersonen beitragen und so neue Strategien in der Entwicklung von neuroprotektiven Therapieansätzen zulassen.

Arbeitsprogramm, Fortschritt der Arbeiten und erste Ergebnisse: Nach entsprechenden Vorbereitungen (Ethikantrag in Südtirol, Organisation der door-to-door Untersuchungen in Südtirol), wurde von Oktober 2008 bis März 2009 die klinische Untersuchung der Bruneck-Studien Kohorte im Rahmen des MJFF Tricenterprojektes "Prospective validation of risk markers for the development of Parkinson's disease" durchgeführt (siehe 4.). Hier erhielten in Form von Hausbesuchen 479 Probanden eine standardisierte klinisch-neurologische Untersuchung (u.a. der Unified Parkinson's disease rating scale – UPDRS) und eine Geruchstestung. Die Baseline-Daten, sowie die Daten dieser ersten Nachuntersuchung wurden unter Federführung des beteiligten Zentrums von Tübingen bereits veröffentlicht (siehe 3; nicht Teil des IFZT-Programms) und zeigen ein ca. 17-fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines MP bei Probanden mit einer Hyperechogenität im Vergleich zu solchen mit einer Normoechogenität nach einem Beobachtungszeitraum von 3 Jahren auf.

Die Rekrutierung der Probanden für die Cross-over Studie des IFZT Projekts zur Validierung der erhobenen Krankheitsmerkmale mit nigrostriataler Funktion erhoben mittels F-Dopa PET fand von

November 2008 bis Oktober 2009 in Rahmen der oben erwähnten ersten Nachuntersuchung statt und umfasste 60 Probanden. Diese wurden einer standardisierten neurologischen Untersuchung inklusive der UPDRS, einer olfaktorischen Testung mittels "Sniffing-Sticks", einer Blutabnahme, einer transkraniellen Parenchymsonographie, sowie einer MR-Bildgebung (u.a. diffusionsgewichtet) und schlussendlich einer [18F]Dopa-PET Untersuchung unterzogen. Die Probanden wurden entsprechend zwei Risikofaktoren in vier Kategorien eingeteilt:

1. Kein Risikofaktor, weder Hyperechognität noch olfaktorische Dysfunktion (Kontroll-Gruppe)
2. Keine Hyperchognität aber olfaktorische Dysfunktion
3. Hyperechognität aber keine olfaktorische Dysfunktion
4. Beide Risikofaktoren, Hyperechognität und olfaktorische Dysfunktion (Zielgruppe)

Die Verarbeitung der Bildgebungs-Rohdaten ist größtenteils abgeschlossen, zurzeit läuft der Abschluss der Bearbeitung der Bildgebungs-Rohdaten und die statistische Auswertung (Gruppenvergleiche von verschiedenen PET- und MRT-Parametern, Korrelationen der Größe der Hyperechogenität mit diesen Parametern, u.a.). Aus dem Serum der Probanden wurden bereits alpha-Synuclein Spiegel bestimmt, hier konnten jedoch keine schlüssigen Ergebnisse erzielt werden. Dies scheint in Anbetracht rezenter Arbeiten, die einerseits zeigen, dass Alpha-Synuclein im Blut in hohem Maße aus Erythrozyten stammt (*Shi et al., 2010*) und andererseits, dass die Messung von alpha-Synuclein Oligomeren dem totalen alpha-Synuclein überlegen ist (*Tokuda et al., 2010*), nicht erstaunlich. Allerdings fanden wir mittels eines "microarray" Proteinexpressionsprofil-Screens erhöhte Werte von PDGF-BB bei neurodegenerativen Parkinsonsyndromen im Vergleich zu Kontrollen (u.a. unter Einschluss von Probanden des IFTZ-Projektes, siehe 3.). Hier sind weitere Analysen des alpha-Synuclein Oligomers und eines weiteren Proteins, des Flt-3 Liganden geplant.

Die Bestimmung der prädiktiven Wertigkeit der erhobenen Krankheitsmerkmale bei Patienten mit neu aufgetretener Parkinson-Krankheit erfolgte in einer Längsschnittuntersuchung. Dabei fand die geplante Nachuntersuchung der 60 Probanden und der gesamten Bruneck-Studien Kohorte im September/Oktober 2010 im Rahmen der Bruneck-Studie 2010 statt. Insgesamt konnten 488 Probanden im KH Bruneck erneut einer standardisierte neurologische Untersuchung u.a. der UPDRS, einer genauen Stand- und Gangprüfung unterzogen werden. Des Weiteren erfolgten jeweils eine internistische, eine rheumatologische, eine diätologische sowie eine psychologische Visite. Die Dateneingabe und Datengegenkontrolle des neurologischen Teils dauerten bis August/September 2011. Im Moment erfolgt die statistische Auswertung der Daten des MJFF Tricenterprojekt "Prospective Validation of Risk Markers for the Development of Parkinson Syndromes (PRIPS): Second Follow Up" (siehe 4.). Diesbezüglich erscheinen die ersten publizierbaren Ergebnisse in Kürze. An unserem Zentrum werden zurzeit die Prävalenz und die Progression von sogenannten "mild parkinsonian signs" (MPS) in der Bruneck-Kohorte erforscht. Die MPS umfassen leichte motorische Einschränkungen, die noch nicht die Diagnose MP erlauben, jedoch ähnlich wie das etablierte Konzept "mild cognitive impairment" bei der Alzheimer Erkrankung eine Vorstufe des MP darstellen könnte. MPS sind häufig in der allgemeinen Bevölkerung, jedoch ist die Progression bzw. Konversion zu einem MP in longitudinalen Studien noch nicht erforscht. MPS könnten einen attraktiven Risikomarker für die Entwicklung eines MP darstellen, da sie leicht und schnell in einer klinischen Untersuchung durch einen erfahrenen Untersucher zu ermitteln sind. Daneben konnten wir erstmals in einer populationsbasierten geriatrischen Kohorte die Prävalenz von Gangstörungen erheben. Diese Auswertung wurde soeben ausgewertet und eingereicht.

Fördervolumen des Projekts innerhalb des IFTZ

Laufzeit des Projekts:	09/2008 – 08/2011
Sachmittel/Investitionen:	€ 54.484,00
Personalstellen:	Philipp Mahlknrecht; Univ.-Assistent; 48 Monate*

Publikationen mit IFTZ-Erwähnung

Berg, Daniela; Behnke, Stefanie; Seppi, Klaus; Godau, Jana; Lerche, Stefanie; Mahlknrecht, Philipp et al. (2012): Enlarged hyperechogenic substantia nigra as a risk marker for Parkinson's disease. In: *Mov. Disord.*

Mahlknrecht, Philipp; Stockner, Heike; Kiechl, Stefan; Willeit, Johann; Rastner, Verena; Gasperi, Arno et al. (2012): Is transcranial sonography useful to distinguish drug-induced parkinsonism from Parkinson's disease? In: *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society.*

Mahlknrecht, Philipp; Stockner, Heike; Nocker, Michael; Kiechl, Stefan; Willeit, Johann; Scherfler, Christoph et al. (2012): A follow-up study of substantia nigra echogenicity in healthy adults. In: *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society.*

Mahlknrecht, Philipp; Stemberger, Sylvia; Sprenger, Fabienne; Rainer, Johannes; Hametner, Eva; Kirchmair, Rudolf et al. (2012): An antibody microarray analysis of serum cytokines in neurodegenerative Parkinsonian syndromes. In: *Proteome Sci* 10 (1), S. 71.

Mahlknrecht, Philipp; Seppi, Klaus; Stockner, Heike; Nocker, Michael; Scherfler, Christoph; Kiechl, Stefan; Willeit, Johann; Schmidauer, Christoph; Gasperi, Arno; Rungger, Gregorio; & Poewe, Werner. (2013) *Substantia Nigra Hyperechogenicity as a Marker for Parkinson's Disease: A Population-Based Study. Neurodegener Dis.*

Mahlknrecht, Philipp; Kiechl, Stefan; Bloem, Bastiaan R.; Willeit, Johann; Scherfler, Christoph; Gasperi, Arno; Rungger, Gregorio; Poewe, Werner & Seppi, Klaus. (2013) *Prevalence and burden of gait disorders in elderly men and women aged 60-97 years: a population-based study. PLoS ONE*, 8, e69627.

Publikationen ohne IFTZ-Erwähnung

Berg, Daniela; Seppi, Klaus; Behnke, Stefanie; Liepelt, Inga; Schweitzer, Katherine; Stockner, Heike et al. (2011): Enlarged substantia nigra hyperechogenicity and risk for Parkinson disease: a 37-month 3-center study of 1847 older persons. In: *Arch. Neurol* 68 (7), S. 932–937.

Berg, Daniela; Seppi, Klaus; Liepelt, Inga; Schweitzer, Katherine; Wollenweber, Frank; Wolf, Björn et al. (2010): Enlarged hyperechogenic substantia nigra is related to motor performance and olfaction in the elderly. In: *Mov. Disord* 25 (10), S. 1464–1469.

Berg, D.; Godau, J.; Seppi, K.; Behnke, S.; Liepelt-Scarfone, I.; Lerche, S. et al. (2012): The PRIPS study: screening battery for subjects at risk for Parkinson's disease. In: *Eur. J. Neurol.*

* Aus personalrechtlichen Gründen konnten PostDocs im IFTZ nur über 4 Jahre angestellt werden (daher Anstellungsdauer > Projektdauer).

Übersichtsartikel ohne IFTZ-Erwähnung

Mahlknecht, P.; Schocke, M.; Seppi, K. (2010): Differenzialdiagnose der Parkinson-Syndrome mittels MRT. In: Nervenarzt 81 (10), S. 1168–1179.

Mahlknecht, Philipp; Hotter, Anna; Hussl, Anna; Esterhammer, Regina; Schocke, Michael; Seppi, Klaus (2010): Significance of MRI in diagnosis and differential diagnosis of Parkinson's disease. In: Neurodegener Dis 7 (5), S. 300–318.

Poewe, Werner; Mahlkecht, Philipp (2009): The clinical progression of Parkinson's disease. In: Parkinsonism Relat. Disord 15 Suppl 4, S. S28-32.

Eingeworbene qualifizierte Drittmittel

Projektleitung	Titel des Vorhabens	Fördernr. und -organisation	Laufzeit des Projektes	Fördersumme pro Haushaltsjahr (Gesamte Fördersumme)
Werner Poewe Klaus Seppi	Prospective validation of risk markers for the development of Parkinson's disease	Nr.: Michael J. Fox Foundation	01/2008 – 06/2009	Gesamt: \$ 94,784.59/Jahr; (\$ 142,176.88)
Werner Poewe Klaus Seppi	Prospective Validation of Risk Markers for the Development of Parkinson Syndromes (PRIPS): Second Follow Up	Nr.: Michael J. Fox Foundation	04/2010 – 10/2011	Gesamt: \$ 94,784.59/Jahr; (\$ 142,176.88)
Klaus Seppi Christoph Scherfler Michael Schocke	Brain Magnetic Resonance Imaging at 3.0 Tesla in neurodegenerative Parkinsonism	OeNB Jubiläumsfond Nr.: 14174	03/2011 – 09/2012	Gesamt: € 47.333,33/Jahr; (€ 71.000,00)
Klaus Seppi Christoph Scherfler Michael Schocke	Morphometric correlates and predictors of impaired gait and balance in Parkinson's Disease	FWF Nr.: KLI 82-B00	Voraussichtlich Ende 2011 bis Ende 2014	Gesamt: € 83.944,00/Jahr; (€ 251.832,00)

Nachwuchsförderung

Diplomarbeiten

Name, Vorname	Abschluss im Jahr	Universität, Fachbereich	Titel der Arbeit
Hofer, Marion	2012	MUI – Humanmedizin	Eine semiquantitative Erfassung von Parkinsonsymptomen anhand des motorischen Teiles der Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) in der Normalbevölkerung
Pinter, Bernadette	2011	MUI – Humanmedizin	Identification of transcranial sonography and olfactory testig as risk markers for Parkinson's disease

Doktorarbeiten

Vorname, Name	Abschluss im Jahr	Universität, Fachbereich	Titel der Arbeit
Mahlknecht, Philipp	2012	MUI – PhD in "Neuroscience"	PD Biomarkers

11) Bim and Bmf in Breast Cancer

Univ. Prof. Dr. Andreas Villunger

Sektion für Entwicklungsimmunologie

Zusammenfassung

Members of the Bcl-2 family are key regulators of cell death triggered along the intrinsic mitochondrial cell death pathway. BH3-only proteins, a subgroup within the Bcl-2 family, act as the most upstream triggers of oncogenic stress-induced apoptosis, which, together with deregulated cell cycle control, constitutes the basis of malignant transformation. Hyperactivation of the Ras/MAPK signalling axis in epithelial tumors can suppress apoptosis by promoting the rapid degradation of the BH3-only protein Bim. In mammary tumors this signalling axis can potentially be activated by the EGF-R family member HER2/ErbB2/Neu, a proto-oncogene frequently amplified and/or mutated in patients suffering from breast cancer. The EGF-receptor (R) signalling pathway is an established target for anti-neoplastic therapy and application of monoclonal antibodies blocking the receptor or its kinase activity are successfully used in the clinic. Most recent studies also implicate the BH3-only protein Bmf as a downstream target of ErbB2-mediated signals that appear to prevent transcriptional activation of this potential tumor suppressor in human breast cancer cell lines. The relevance of Bim and Bmf in the pathogenesis of breast cancer development and tumor drug-responsiveness, however, remains ill-defined.

(i) Here analyzed the relationship between ErbB2-driven oncogenesis and the BH3-only proteins Bim and Bmf. Using a mouse model of mammary cancer, *MMTV/neu*, we addressed whether loss of Bim or Bmf can modulate ErbB2-driven tumorigenesis by generating Bim or Bmf-deficient mice that overexpress the *MMTV/neu* transgene. We noted that during transformation, Bim and Bmf are strongly induced at the protein level in *MMTV/neu* driven tumors suggesting that despite reported suppression of these proteins by the Ras/MAPK signalling axis, both proteins might be induced to limit transformation. However, further analysis of mRNA levels in tumors and premalignant tissue revealed that these changes do not involve transcription of the target genes. A follow up of cohorts of mice expressing *MMTV/neu* as a transgene on a Bim or Bmf-deficient background, however, revealed a surprising result. While loss of Bmf did not affect tumor latency in these mice, absence of Bim clearly delayed onset of disease. The molecular basis of this phenomenon is currently barely understood but we are following up the hypothesis that Bim-deficient mice are less tolerant to the ErbB2 protein, due to defects in lymphocyte development and Treg dynamics. Furthermore, together with R. Kofler, we performed expression profiling comparing wt and Bim deficient tumors and we noted that only a very limited number of genes appeared differentially expressed and none of those provided a clue about a possible mechanism. Currently, we test different hypothesis that may explain the observed results, i.e. reduced tolerance or impaired epithelial cell growth in Bim-defective mice that may explain our observations. These studies are currently supported by the Tiroler Krebshilfe.

(ii) The susceptibility of these tumors to a, so-called BH3-mimetics, targeting the prosurvival members of the Bcl-2 family, provided by ABBOTT and currently in preclinical evaluation, has been tested for its efficacy alone or in combination with other anti-cancer in vitro and as a single drug in vivo. This part of the work was performed in tight collaboration with Prof. Doppler from the Dept. of Medical Biochemistry. Of note, we were unable to see drug-resistance phenotypes in wt vs. Bim or Bmf-deficient tumors in vitro, where ABT-737 potentially induced apoptosis when applied alone or in

combination with other anti-cancer agents. However, when applied in vivo, wt tumors treated with ABT-737 grew almost as efficient as those in untreated mice, suggesting that ABT-737 does not work as a single agent in vivo, at least in this model.

(iii) Based on our findings in mice we wondered if expression levels of Bim mRNA in human cancer tissue would correlate with overall survival. Therefore, we took advantage of the large breast cancer tissue bank generated over the years in the Department of Gynecology of the IMU, headed by Prof. Marth. In collaboration with PD. Dr. Heidi Fiegl, we correlated mRNA expression data of Bmf, Bim, Bcl2, Mcl1 and Bclx with clinical parameters such as overall treatment response, prognosis and survival. However, with the exception of Bcl2 expression none of the clinical parameters correlated with mRNA expression levels of the other target genes, including Bim. As we noted that alterations in gene expression in mice were not dependent on gene transcription we also aimed to assess expression of Bim protein in tumor tissue arrays but unfortunately, due to an error in the documentation system by the company generating the tissue array, the tumor samples could not be assigned to individual patients. Results on mRNA expression and patient data will be summarized for publication.

(iv) As a spin off project we are still analyzing the role of these BH3-proteins in mammary gland remodelling during involution. Preliminary data implicate both Bim and Bmf in this process.

Fördervolumen des Projekts innerhalb des IFTZ

Laufzeit des Projekts:	11/2007 – 10/2010
Sachmittel/Investitionen:	€ 81.002,90
Personalstellen:	Stefanie Faserl; BMA; 36 Monate Florian Baumgartner; Doktorand; 36 Monate

Publikationen mit IFTZ-Erwähnung

Baumgartner, F.; Woess, C.; Pedit, V.; Tzankov, A.; Labi, V.; Villunger, A. (2012): Minor cell-death defects but reduced tumor latency in mice lacking the BH3-only proteins Bad and Bmf. In: *Oncogene*.

Parajuli, Nirmala; Müller-Holzner, Elisabeth; Böck, Günther; Werner, Ernst R.; Villunger, Andreas; Doppler, Wolfgang (2010): Infiltrating CD11b+CD11c+ cells have the potential to mediate inducible nitric oxide synthase-dependent cell death in mammary carcinomas of HER-2/neu transgenic mice. In: *Int. J. Cancer* 126 (4), S. 896–908.

Hannesdóttir L, Tymoszuk P, Parajuli N, Philipp S, Daschil N, Datta S, Koller J, Tripp C, Stoitzner P, Müller-Holzner E, Wieggers J, Villunger A, Doppler W: STAT1 deficiency in Neu/ErbB2-induced mammary tumors confers resistance to chemotherapy: Submitted

Baumgartner F, Pedit V, Tymoszuk P, Wieggers J, Doppler W, Villunger A: Loss of BH3-only protein Bim delays MMTV/neu driven tumorigenesis by restricting epithelial cell growth In prep.

Übersichtsartikel mit IFTZ-Erwähnung

Tischner, D.; Woess, C.; Ottina, E.; Villunger, A. (2010): Bcl-2-regulated cell death signalling in the prevention of autoimmunity. In: *Cell Death Dis* 1, S. e48.

Wiegers, G. Jan; Kaufmann, Manuel; Tischner, Denise; Villunger, Andreas (2011): Shaping the T-cell repertoire: a matter of life and death. In: *Immunol. Cell Biol* 89 (1), S. 33–39.

Labi, V.; Grespi, F.; Baumgartner, F.; Villunger, A. (2008): Targeting the Bcl-2-regulated apoptosis pathway by BH3 mimetics: a breakthrough in anticancer therapy? In: *Cell Death Differ* 15 (6), S. 977–987.

Eingeworbene qualifizierte Drittmittel

Projektleitung	Titel des Vorhabens	Fördernummer u. -organisation	Laufzeit des Projektes	Fördersumme pro Haushaltsjahr
Andreas Villunger	SFB021	FWF	01/2011 – 12/2013	€ 150.000
Andreas Villunger	DK-MCBO	FWF	10/2011 – 09/2014	€ 50.000
Andreas Villunger	P-23510-B19	FWF	10/2011 - 09/2014	€ 100.000

Kooperationen mit anderen Teilprojekten / Vernetzung innerhalb des Zentrums und anderen

Eine anhaltende Kooperation besteht mit der AG von Prof. Wolfgang Doppler, Abtlg. Med. Chemie, hinsichtlich des Einflusses des Immunsystems auf die Erb/B2 bedingten Brustkrebsentwicklung. Die Kollaboration wird gegenwärtig mit Mitteln aus der Krebshilfe und des Doktoratskollegs MCBO fortgeführt um das Projekt zur Publikationsreife zu bringen. In dieses Projekt sind auf Seite der Gynäkologie immer noch PD Müller-Holzner als auch eine MTA, Martina Chamson unterstützend eingebunden (Aufbereitung und Bewertung von Histologie, Immunhistochemie)

Weiters besteht eine anhaltende Kooperation mit PD Heidelinde Fiegl von der Gynäkologie und Geburtshilfe in Sachen Expressionsmuster von BH3-Proteinen im humanen Tumormaterial, als auch in Sachen BH3-Promotermethylierung in haematopoietischen Zellen.

In Kollaboration mit Reinhard Kofler wurden auch Expression profiling Experimente durchgeführt, in denen das Genom von Tumoren aus wt Mäusen- mit denen von Bim-defizienten Mäusen verglichen wurden.

Nachwuchsförderung

Diplomarbeiten

Name, Vorname	Abschluss im Jahr	Universität, Fachbereich	Titel der Arbeit
Pedit Victoria	Mai 2012	LFU, MolBiol	Bim and immune tolerance in breast cancer

Doktorarbeiten

Name, Vorname	Abschluss im Jahr	Universität, Fachbereich	Titel der Arbeit
Baumgartner Florian	Jan 2013	MUI, Q094	Analysis of Bim and Bmf in breast cancer

12) Genomic instability and lymphomas

Dr. Nikolaos Yannoutsos

Sektion für Zellbiologie

Zusammenfassung

The project was based on the idea that follicular lymphoma, i.e., lymphoma due to the aberrant rearrangement of V regions next to an oncogene as a result of wrong action of the Recombination Activating Genes (RAGs), is further induced by the encounter with antigen that activates the B cell receptor of the cells with the aberrant rearrangement. The specific aims included the analysis in normal cells of the proximity of the immunoglobulin locus to the locus of the BCL2 oncogene, but mainly the analysis of material from human patients to examine the presence of clonality of the BCRs in the tumor cells. Possible mono- or oligo- clonal V regions would be subcloned and used to make a transgenic mouse model of the disease: a transgenic mouse carrying the human V region as a transgene would be bred to a transgenic mouse for the BCL2-Ig Enhancer and bone marrow cells from the hybrid mouse transplanted to the bone marrow of wt mice. This mouse would be the model for the disease and would be challenged with an antigen or antibody directed against the V region harbored on cells that also have the BCL2 oncogene driven by the Ig Enhancer, mimicking the aberrant rearrangement.

None of the project aims came to fruition. We did analyse the repertoire of patients and healthy individuals but the results showed polyclonal tumor responses in the few patients analysed. We decided to still pursue the mouse model with randomly chosen V regions and made preliminary experiments with intravenous injections of bone marrow cells into wt mice followed by analysis of the spleens some time later, which were successful, but were not further pursued. We obtained mice that expressed the BCL2 transgene in all hematopoietic tissues and also mice that overexpressed the Brutons Tyrosine kinase (Btk) transgene which should mimic the activation of B cells by antigen, with the idea that such a combination might bypass the need for a specific antigen challenge and also included them in our experiments after incidentally clarifying the integration sites of the transgenes in both these mouse lines. However, all work on this project was interrupted when the funding and the contracts of the technician and the postdoc working on it were terminated and not renewed.

This was a project that takes a long time and for which the IFTZ initial funding for 3 years would only be the beginning. Since there are no results to report I will not bother to detail information showing that the initial set up for this project was successfully optimized and ready to be productive. It should also be noted that the effort involved the setting up of a new laboratory. This was achieved despite the persistent negative politics that have plagued the IFTZ program and the positions awarded to its projects.

Fördervolumen des Projekts innerhalb des IFTZ

Laufzeit des Projekts: 05/2008 – 04/2011
Sachmittel/Investitionen: € 22.461,90
Personalstellen: Przemyslaw Filipek; MTA; 36 Monate
Dr. Vogl; Univ.-Assistent*

Publikationen

Keine

Eingeworbene qualifizierte Drittmittel

Projektleitung	Titel des Vorhabens	Fördernummer und -organisation	Laufzeit des Projektes	Fördersumme pro Haushaltsjahr
Nikolaos Yannoutsos	A mouse model for follicular lymphoma tumors	Österreichische Krebshilfe Tirol	9/2010 - 6/2012	€ 5.000 for all the period

One grant for 5000 Euro from the Österreichische Krebshilfe Tirol was awarded in Fall of 2010 and is still in effect till 30.6.2012. The project with title "A mouse model for follicular lymphoma tumors" was to supplement the project "Genomic Instability and lymphomas" as the funding for the latter had already been exhausted, while Dr. Vogl and the technician Przemek Filipek (Master's Engineer degree from Poland) were still working with the original contracts.

Nachwuchsförderung

Nothing to fill the above Table. However, it should be noted that Przemek Filipek did become a Ph.D. graduate student on the basis of his excellent work on this project and my recommendations.

* Die Fördermittel zur Finanzierung dieser Stelle wurden nicht über das IFTZ Budget, sondern über andere Forschungsfördertöpfe finanziert

VI. LITERATURVERZEICHNIS mit IFTZ-Erwähnung

- Achmüller, Clemens; Köhler, Andrea; Bösch, Sylvia; Schneider, Rainer (2008): A-overhang-dependent repeat expansion determination (ADRED). In: *BioTechniques* 45 (5), S. 577–580. IF: 2,587
- Baumgartner, F.; Woess, C.; Pedit, V.; Tzankov, A.; Labi, V.; Villunger, A. (2012): Minor cell-death defects but reduced tumor latency in mice lacking the BH3-only proteins Bad and Bmf. In: *Oncogene*. IF: 6,373
- Berg, Daniela; Behnke, Stefanie; Seppi, Klaus; Godau, Jana; Lerche, Stefanie; Mahlknecht, Philipp et al. (2012): Enlarged hyperechogenic substantia nigra as a risk marker for Parkinson's disease. In: *Mov. Disord.* IF: 4,505
- Bradl, Monika; Misu, Tatsuro; Takahashi, Toshiyuki; Watanabe, Mitsutoshi; Mader, Simone; Reindl, Markus et al. (2009): Neuromyelitis optica: pathogenicity of patient immunoglobulin in vivo. In: *Ann. Neurol* 66 (5), S. 630–643. IF: 9,317
- Carvalho Neto Sonya, Salti Ahmad, Puschban Zoe, Stefanova Nadja, Nat Roxana; Dechant Georg and Wenning Gregor. Cell Fate Analysis of Embryonic Ventral Mesencephalic Grafts in the 6-OHDA Model of Parkinson`s Disease in press PlosOne. IF: 4,092
- Di Pauli, Franziska; Mader, Simone; Rostasy, Kevin; Schanda, Kathrin; Bajer-Kornek, Barbara; Ehling, Rainer et al. (2011): Temporal dynamics of anti-MOG antibodies in CNS demyelinating diseases. In: *Clin. Immunol* 138 (3), S. 247–254. IF: 3,932
- Dujmovic, Irena; Mader, Simone; Schanda, Kathrin; Deisenhammer, Florian; Stojavljevic, Nebojsa; Kostic, Jelena et al. (2011): Temporal dynamics of cerebrospinal fluid anti-aquaporin-4 antibodies in patients with neuromyelitis optica spectrum disorders. In: *J. Neuroimmunol* 234 (1-2), S. 124–130. IF: 3,901
- Hannesdóttir, Lára; Daschil, Nina; Philipp, Sonja; Tymoszyk, Piotr; Müller-Holzner, Elisabeth; Klima, Günter et al. (2012): MMTV-neu mice deficient in STAT1 are susceptible to develop ovarian teratomas. In: *Int. J. Dev. Biol* 56 (4), S. 279–283. IF: 2,823
- Hering, Sascha; Achmüller, Clemens; Köhler, Andrea; Poewe, Werner; Schneider, Raine; Boesch, Sylvia M. (2009): Phenotype variability in spinocerebellar ataxia type 2: a longitudinal family survey and a case featuring an unusual benign course of disease. In: *Mov. Disord* 24 (5), S. 774–777. IF: 4,014
- Jäkel, Heidelinde; Peschel, Ines; Kunze, Clarissa; Weigl, Christina; Hengst, Ludger (2012): Regulation of p27 (Kip1) by mitogen-induced tyrosine phosphorylation. In: *Cell Cycle* 11 (10), S. 1910–1917. IF: 4,999
- Kickstein, Eva; Krauss, Sybille; Thornhill, Paul; Rutschow, Désirée; Zeller, Raphael; Sharkey, John et al. (2010): Biguanide metformin acts on tau phosphorylation via mTOR/protein phosphatase 2A (PP2A) signaling. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 107 (50), S. 21830–21835. IF: 9,771
- Kuenz, Bettina; Lutterotti, Andreas; Ehling, Rainer; Gneiss, Claudia; Haemmerle, Monika; Rainer, Carolyn et al. (2008): Cerebrospinal fluid B cells correlate with early brain inflammation in multiple sclerosis. In: *PLoS ONE* 3 (7), S. e2559. IF: 4,411
- Labi, V.; Grespi, F.; Baumgartner, F.; Villunger, A. (2008): Targeting the Bcl-2-regulated apoptosis pathway by BH3 mimetics: a breakthrough in anticancer therapy? In: *Cell Death Differ* 15 (6), S. 977–987. IF: 7,548
- Mader, Simone; Lutterotti, Andreas; Di Pauli, Franziska; Kuenz, Bettina; Schanda, Kathrin; Aboul-Enein, Fahmy et al. (2010): Patterns of antibody binding to aquaporin-4 isoforms in neuromyelitis optica. In: *PLoS ONE* 5 (5), S. e10455. IF: 4,411

- Mahlknecht, Philipp; Stemberger, Sylvia; Sprenger, Fabienne; Rainer, Johannes; Hametner, Eva; Kirchmair, Rudolf et al. (2012): An antibody microarray analysis of serum cytokines in neurodegenerative Parkinsonian syndromes. In: *Proteome Sci* 10 (1), S. 71. IF: 2,328
- Mahlknecht, Philipp; Stockner, Heike; Kiechl, Stefan; Willeit, Johann; Rastner, Verena; Gasperi, Arno et al. (2012): Is transcranial sonography useful to distinguish drug-induced parkinsonism from Parkinson's disease? In: *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. IF: 4,480
- Mahlknecht, Philipp; Stockner, Heike; Nocker, Michael; Kiechl, Stefan; Willeit, Johann; Scherfler, Christoph et al. (2012): A follow-up study of substantia nigra echogenicity in healthy adults. In: *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. IF: 4,480
- Mahlknecht, Philipp; Seppi, Klaus; Stockner, Heike; Nocker, Michael; Scherfler, Christoph; Kiechl, Stefan; Willeit, Johann; Schmidauer, Christoph; Gasperi, Arno; Rungger, Gregorio; & Poewe, Werner. (2013) *Substantia Nigra Hyperechogenicity as a Marker for Parkinson's Disease: A Population-Based Study. Neurodegener Dis*. IF: 3,056
- Mahlknecht, Philipp; Kiechl, Stefan; Bloem, Bastiaan R.; Willeit, Johann; Scherfler, Christoph; Gasperi, Arno; Rungger, Gregorio; Poewe, Werner & Seppi, Klaus. (2013) *Prevalence and burden of gait disorders in elderly men and women aged 60-97 years: a population-based study. PLoS ONE*, 8, e69627. IF: 4,774
- Morettini, Stefano; Podhraski, Valerie; Lusser, Alexandra (2008): ATP-dependent chromatin remodeling enzymes and their various roles in cell cycle control. In: *Front. Biosci* 13, S. 5522–5532. IF: 3,308
- Nat, Roxana; Salti, Ahmad; Suciu, Laura; Ström, Susanne; Dechant, Georg (2012): Pharmacological Modulation of the Hedgehog Pathway Differentially Affects Dorsal/Ventral Patterning in Mouse and Human Embryonic Stem Cell Models of Telencephalic Development. In: *Stem cells and development*. IF: 4,791
- Parajuli, Nirmala; Doppler, Wolfgang (2009): Precision-cut slice cultures of tumors from MMTV-neu mice for the study of the ex vivo response to cytokines and cytotoxic drugs. In: *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim* 45 (8), S. 442–450. IF: 0,791
- Parajuli, Nirmala; Müller-Holzner, Elisabeth; Böck, Günther; Werner, Ernst R.; Villunger, Andreas; Doppler, Wolfgang (2010): Infiltrating CD11b+CD11c+ cells have the potential to mediate inducible nitric oxide synthase-dependent cell death in mammary carcinomas of HER-2/neu transgenic mice. In: *Int. J. Cancer* 126 (4), S. 896–908. IF: 4,926
- Pohl, Maria; Fischer, Marie-Therese; Mader, Simone; Schanda, Kathrin; Kitic, Maja; Sharma, Rakhi et al. (2011): Pathogenic T cell responses against aquaporin 4. In: *Acta Neuropathol* 122 (1), S. 21–34. IF: 9,32
- Romani, N.; Flacher, V.; Tripp, C. H.; Sparber, F.; Ebner, S.; Stoitzner, P. (2012): Targeting skin dendritic cells to improve intradermal vaccination. In: *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 351, S. 113–138. IF: 4,925
- Salti, Ahmad; Nat, Roxana; Neto, Sonya; Puschban, Zoe; Wenning, Gregor; Dechant, Georg (2012): Expression of Early Developmental Markers Predicts the Efficiency of Embryonic Stem Cell Differentiation into Midbrain Dopaminergic Neurons. In: *Stem Cells Dev*. IF: 4,459
- Sparber, Florian; Tripp, Christoph H.; Hermann, Martin; Romani, Nikolaus; Stoitzner, Patrizia (2010): Langerhans cells and dermal dendritic cells capture protein antigens in the skin: possible targets for vaccination through the skin. In: *Immunobiology* 215 (9-10), S. 770–779. IF: 4,114

Stoitzner, Patrizia; Sparber, Florian; Tripp, Christoph H.: Langerhans cells as targets for immunotherapy against skin cancer. In: *Immunol. Cell Biol* 88 (4), S. 431–437. IF: 3,741

Tischner, D.; Woess, C.; Ottina, E.; Villunger, A. (2010): Bcl-2-regulated cell death signalling in the prevention of autoimmunity. In: *Cell Death Dis* 1, S. e48. IF 0,00

Tripp, Christoph H.; Sparber, Florian; Hermans, Ian F.; Romani, Nikolaus; Stoitzner, Patrizia (2009): Glycolipids injected into the skin are presented to NKT cells in the draining lymph node independently of migratory skin dendritic cells. In: *J. Immunol* 182 (12), S. 7644–7654. IF: 5,646

Wieggers, G. Jan; Kaufmann, Manuel; Tischner, Denise; Villunger, Andreas (2011): Shaping the T-cell repertoire: a matter of life and death. In: *Immunol. Cell Biol* 89 (1), S. 33–39. IF: 3,741

VII. STATISTIK ZU DEN IFTZ-PROJEKTEN

a) Forschungsoutput

Forschungsoutput	Gesamt
Veröffentlichungen mit IFTZ-Erwähnung*	31
Mittlerer IF	4,566
Publikationen IF >5	6
Diplomarbeiten	8
Doktorarbeiten	13

b) Anzahl eingeworbener Drittmittelprojekte nach Fördergeber

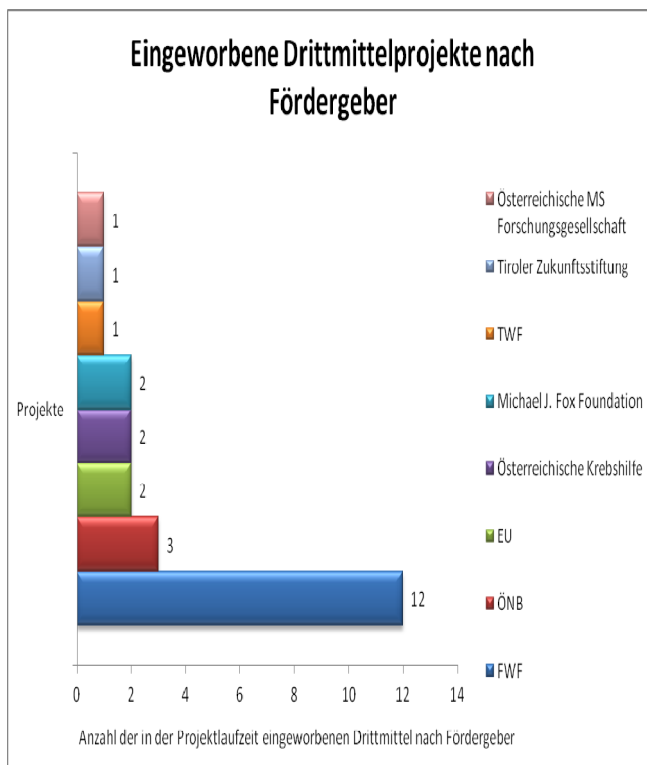


Abb. 7 Aufstellung der Anzahl der eingeworbenen Drittmittelprojekte der IFTZ ProjektleiterInnen (Projektbereich) nach Fördergeber. Es wurden nur jene Projekte berücksichtigt, die innerhalb der laufenden IFTZ Projekte eingeworben wurden.

* Es wurden nur jene Publikationen mit IFTZ-Erwähnung gezählt, die zur Veröffentlichung mindestens in press waren.

c) Anteil Klinik und Theoretische Institute am IFTZ

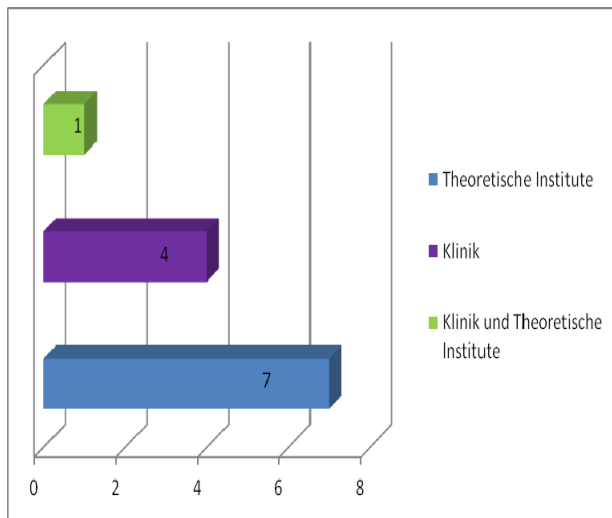


Abb. 8 IFTZ-Projekte der ProjektleiterInnen aufgeteilt nach Klinik bzw. Theoretischen Instituten

d) Verausgabte Mittel der IFTZ- Projekte

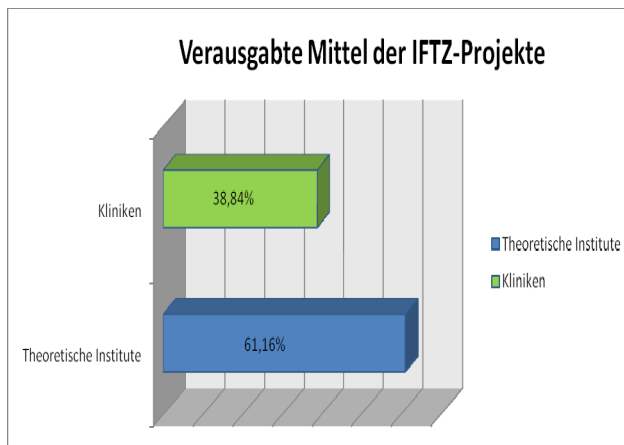


Abb. 9 Dargestellt sind die verausgabten Mittel (Sachmittel, Investitionen, Personal) anteilmäßig nach theoretischen Instituten und Kliniken im Projektbereich. Hierbei wurde die Zugehörigkeit der ProjektleiterInnen herangezogen. Bei doppelter Projektleitung wurden die Mittel entsprechend aliquot geteilt.

e) Ausbildung der ProjektleiterInnen (Medizin/Naturwissenschaften)

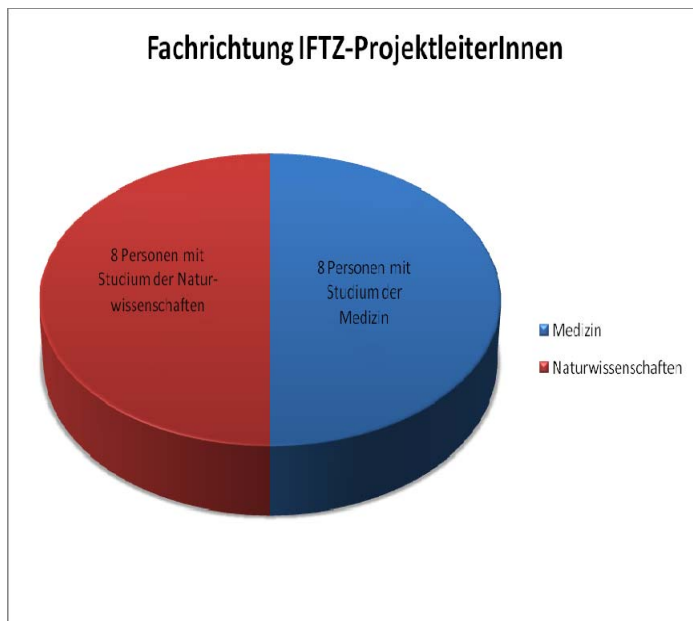


Abb. 10 Darstellung der Anzahl der ProjektleiterInnen mit Studium der Medizin bzw. Naturwissenschaften (Projektbereich).

f) ProjektleiterInnen der IFTZ-Projekte: Genderaspekte

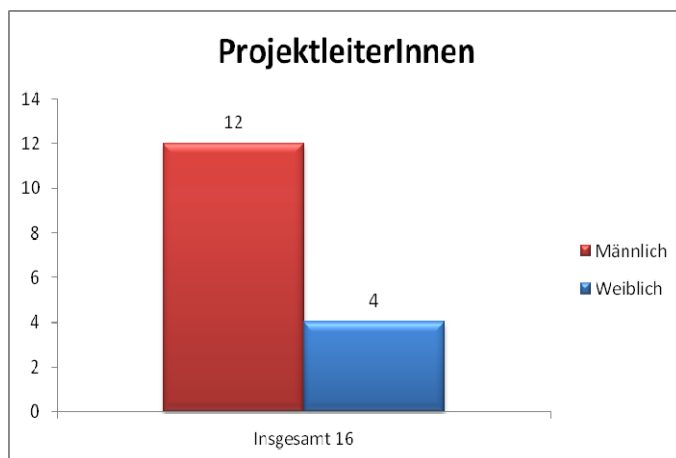


Abb. 11 Dargestellt wieviel männliche bzw. weibliche Personen ein IFTZ-Projekt leiteten.

VIII. ABSCHLUSSBERICHTE der Zentralen Projektgruppen (Core facilities)

Die Zentralen Projektgruppen sind Kern der Bemühungen der Universität, Core facilities an der MUI einzurichten. Das amtierende Rektorat hat über die Leistungsvereinbarungen die Entwicklung der Core facilities vorangetrieben. Stellen, die über das IFTZ für die Core facilities finanziert wurden, sind inzwischen zumindest teilweise verstetigt. Neue Personalstellen wurden geschaffen. Zudem wurden die Core facilities über das Infrastrukturprogramm des Bundes 2011 massiv gestärkt. Inzwischen sind folgende Core facilities am Standort etabliert bzw. laufend:

- Expression Profiling Facility
- Sequencing and Genotyping Facility
- Proteinanalytik
- FACS Sort
- Biooptics (Mikroskopie/Cell Sorting)
- Micro CT
- Neuroimaging Research Core Facility
- Deep Sequencing Facility (befindet sich im Aufbau)
- Elektronenmikroskopie (befindet sich im Aufbau)
- Zentrale Tierversuchsanstalt (inkl. Animal behavior unit; Infektionstierstall)
- Metabolomics

Einen kurzen Abriss über die Bilanz der Zentralen Projektgruppen sind folgend in Tabellenform gelistet.

1. Expression Profiling Unit (Affymetrix Core Facility)

Univ. Prof. Dr. Reinhard Kofler

Sektion für Molekulare Pathophysiologie

Personelle Zusammensetzung der Projektgruppe

Univ. Prof. Dr. R. Kofler, Dr. Johannes Rainer, Mag. Anita Kofler, Mag. Julien Lelong, Martina Brunner

Laufzeit des Projektes	06/2008 – 05/2012
Dienstleistungen	Expression profiling, microarray, ChIP-chip, SNP detection
Großgeräte	Gene Chip Scanner GCS 3000 Instrument System / Affymetrix
Personalstellen, die über das IFTZ finanziert wurden	Christine Mantinger; BMA; 17 Monate Martina Brunner; BMA; 28,5 Monate
Kundenliste	

Interne User: Externe User:	21 User 11 User
Finanzielle Aspekte: Verausgabte IFTZ-Mittel: Davon Sachmittel/Investitionen:	€ 201.652,13 € 44.754,57
Gesamteinnahmen (über Servicedienstleistungen erworbene Einnahmen):	€ 505.156,62 Die aufgeführten Einnahmen wurden zur Gänze ausgegeben, und zwar 60% für Sachmittel und 40% für Personalkosten.
Publikationen, die in Kooperation mit der Core Facility entstanden sind	14 Publikationen
Eingeworbene qualifizierte Drittmittel (während der Laufzeit der Core Facility entstanden)	1 Projekt

2. Sequencing & Genotyping Core Facility

Univ.-Prof. Dr. Florian Kronenberg

Sektion für Genetische Epidemiologie

Personelle Zusammensetzung der Projektgruppe

Weitere Mitarbeiter, die am Erfolg der Core Facility durch ihre Mitarbeit einen wichtigen Beitrag leisten und der GenEpi zugeordnet oder durch Drittmittel finanziert sind (im genannten Zeitraum):

- Projektberatung und Laboraufsicht: Dr. Stefan Coassin und Dr. Anita Kloss-Brandstätter,
- BMAs: Margot Haun, Gertraud Erhart
- Statistische Hilfestellungen: Dr. Barbara Kollerits, Dr. Claudia Lamina
- Informatiker: Hansi Weissensteiner, Sebastian Schönherr, Lukas Forer, Florian Haider, Thomas Kluckner, Thomas Walder, Peter Zangerle, Mathias Neuner
- Administration: Anita Neuner
- Dr. Monika Summerer (Oncotyrol-finanziert 01.01.2009 bis 30.06.2010)

Laufzeit des Projektes:	01/2008 – 11/2011
Dienstleistungen	<ul style="list-style-type: none"> • Automatisierte DNA-Extraktion (Qiagen EZ1 advanced) • Genexpressionsanalysen (Microfluidic cards von Applied Biosystems und quantitative real-time PCR im 384-well Format)

	<ul style="list-style-type: none"> • Sequenzierung von PCR-Produkten oder Plasmiden • Fragmentanalysen zur Detektion von Polymorphismen oder Genvariationen • SNPlex und SNaPshot als Multiplexverfahren zur Genotypisierung. SNPlex wird allerdings nicht mehr weiterbetrieben, da von Life Sciences eingestellt. • Multiplex-Genotypisierung mittels iPLEX-Technologie. • Genotypisierung mittels Taqman Assays. • Ecotilling-Verfahren zur Mutationssuche (erstmalig in Europa im humanen Bereich) • Online – Anmeldung des gewünschten Services: http://genepi_core.i-med.ac.at/ • Web-basierte Übermittlung der Daten
Zugeordnete Großgeräte u. a.	<p>Abi Prism 7900 HT Sequema Detection / Applied Biosystems</p> <p>Freedom Evo Workstation / Tecan</p> <p>Abi Prism 3100 Genetic Analyzer / Applied Biosystems</p> <p>48 Capillary DNA Analyzer / Applied Biosystems</p> <p>Sequenom Plattform / Sequenom GmbH</p>
Personalstellen, die über das IFTZ finanziert wurden	Doreen Dähnhardt; MTF; 37,5 Monate
Leistungsbezieher: Intern Extern	<p>Ca. 34 Nutzer von 14 Organisationseinheiten</p> <p>Ca. 15 Organisationen, die Leistungen meist auf kooperativer Basis in Anspruch genommen haben.</p>
Finanzielle Aspekte: Verausgabte IFTZ-Mittel: Davon Sachmittel und Investitionen:	<p>€ 181.485,10</p> <p>€ 74.448,39</p>
Gesamteinnahmen (über Serviceleistungen erworbene Einnahmen):	€ 445.437,02
Publikationen, die in Kooperation mit der Core Facility entstanden sind:	55 Publikationen, davon sind 2 Publikationen mit IFTZ-Erwähnung
Eingeworbene qualifizierte Drittmittel (während der Laufzeit der Core Facility):	1 Projekt

3. Protein Microanalysis Facility

Ao. Univ.-Prof. Dr. Herbert Lindner
Sektion für Klinische Biochemie

Personelle Zusammensetzung der Projektgruppe:

Ao. Univ. -Prof Dr. Herbert Lindner, Projektleiter
Mag. Klaus Faserl, Technische Fachkraft, 36,5 Monate *
Dr. Leopold Kremser, Assistent, IFTZ-finanziert
Dr. Sabine Hofer, Technische Assistentin, IFTZ-finanziert

Laufzeit des Projektes:	01/2008 – 12/2011
Dienstleistungen	Quantitative Proteomics, Identifizierung und Strukturaufklärung von Peptiden und Proteinen (inkl. PTM's), Quantitative Elementbestimmungen in biologischen Matrices (z.B. Eisen, Selen, Cadmium, Blei etc.), Analytische und semipräparative Chromatographie von Proteinen und Peptiden (SEC, RP, IEC, HILIC), Analyse v. Proteinen und Peptiden und deren Modifikationen mittels Kapillarelektrophorese (CZE, SDS, IEF, MEKC), 1D- und 2D-Gelelektrophorese von Proteinen
Zugeordnete Großgeräte u. a.	3 nLC Systeme, LTQ Orbitrap XL, LTQ Velos Ion trap MS, Microfractioncollector (Probot), Maldi ToF/ToF MS, Atomabsorption, Kapillarelektrophorese plus Laserfluoreszenzdetektor, 3 HPLC Systeme mit Zubehör (Fluoreszenzdet., Probensammler, Autosampler), div. Zentrifugen und Waagen, Cleanbench, Trockenschrank, Lyophilisator, div. Schüttler, Photometer, Ultraschallbäder, Chromatographieschrank, NAS, High-end PC mit Netzwerkfarbdrucker, 1- und 2-D Gelelektrophoresen und div. Kleingeräte

* Die Fördermittel zur Finanzierung dieser Stelle wurden nicht über das IFTZ Budget, sondern über andere Forschungsfördertöpfe finanziert

Personalstellen, die über das IFTZ finanziert wurden bzw. aus dem Globalbudget exklusiv für die Core facilities finanziert wurden	Michaela Pfister; MTF 50%; 5 Monate Sabine Hofer (Chwatal); MTA 60%; 48 Monate Leopold Kremser; Univ.-Assistent; 48 Monate Mag. Klaus Faserl, Technische Fachkraft, 36,5 Monate*
Nutzer der Facility Intern: Extern:	83 38
Finanzielle Aspekte: Verausgabte IFTZ-Mittel: Davon Sachmittel und Investitionen:	€ 481.450,17 € 143.354,63
Gesamteinnahmen (über Servicedienstleistungen erworbene Einnahmen):	€ 91.423,53
Publikationen, die in Kooperation mit der Core Facility entstanden sind (die der Core facility vorliegen):	46 Artikel + 3 Übersichtsartikel
Eingeworbene qualifizierte Drittmittel (während der Laufzeit der Core Facility entstanden):	3 Projekte (In diesen Fällen handelt es sich um Anträge, bei denen die CoreFacility als nationaler Kooperationspartner bzw. Mit Antragsteller geführt ist.)

* Die Fördermittel zur Finanzierung dieser Stelle wurden nicht über das IFTZ Budget, sondern über andere Forschungsfördertöpfe finanziert

4. FACS Sorting Core Facility

PD Dr. Sieghart Sopper (Dr. Anna Maria Wolf bis 2010)

Universitätsklinik für Innere Medizin V

Personelle Zusammensetzung der Projektgruppe

(Dr. Anna Maria Wolf bis 2010)

PD Dr. Sieghart Sopper, 48 Monate

Laufzeit des Projektes:	07/2008 – 06/2012
Dienstleistungen	Durchflusszytometrie
Zugeordnete Großgeräte u. a.	3-Laser Sortiergerät, einem 2-Laser Analysegerät sowie steriler Werkbank, Zentrifuge, Kühlschrank, Mikroskop
Personalstellen, die aus dem Globalbudget exklusiv für die Core facility finanziert wurden.	PD Dr. Sieghart Sopper, 48 Monate
Kundenliste:	
Intern:	11
Extern:	3
Finanzielle Aspekte:	
Verausgabte IFTZ-Mittel (Sachmittel und Investitionen):	€ 31.936,61
Gesamteinnahmen (über Servicedienstleistungen erworbene Einnahmen):	€ 5.025,00
Publikationen, die in Kooperation mit der Core Facility entstanden sind (die der Core facility vorliegen):	8

5. Transgenomic/knock-out mouse unit

Dr. Nikolaos Yannoutsos

Sektion für Zellbiologie

Personelle Zusammensetzung der Projektgruppe

Dr. Nikolaos Yannoutos

Laufzeit des Projektes:	02/2008 – 01/2012
Dienstleistungen	<p>a. facilitating research in the MUI in collaboration with laboratories that are interested in generating mouse models with transgenes or with targeted deletion of loci in the mouse genome.</p> <p>b. rederiving mouse strains to Specific-Pathogen-Free status (SPF).</p> <p>c. facilitating research with mice that requires in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection</p> <p>d. cryopreservation of mouse embryos and sperm.</p> <p>e. mouse stem cell research and technological development of mouse model methodologies (in planning; the University eventually never supported this function).</p>
Personalstellen:	Dr. Nikolaos Yannoutsos; Univ.-Assistent; 48 Monate
Kundenliste:	
Intern:	45
Extern:	9
Finanzielle Aspekte:	
Verausgabte IFTZ-Mittel:	€ 292.152,39
Davon verausgabte Sachmittel/Investitionen	€ 56.110,06
Gesamteinnahmen (über Servicedienstleistungen erworbene Einnahmen):	€ 22.988,49
Publikationen, die in Kooperation mit der Core Facility entstanden sind (die der Core facility vorliegen):	1

IX. FINANZIELLE ANGABEN ZUM IFTZ

VERAUSGABTE MITTEL

	2007	2008	2009	2010	2011	2012	GESAMT
Personal	0,00	511.380,01	675.935,28	681.758,76	238.578,84	65.572,71	2.173.225,60
Sachmittel/Inv.	22.160,15	235.826,09	302.211,65	262.602,37	35.532,74	0,00	858.333,00
GESAMT	22.160,15	747.206,10	978.146,93	944.361,13	274.111,58	65.572,71	3.031.558,60

Abb. 12 Ausgaben der IFTZ-Projekte getrennt in Personal und Sachmittel/ Investitionen pro Jahr und GESAMT

CORE FACILITIES

	2007	2008	2009	2010	2011	2012	GESAMT
Personal	0,00	100.067,18	202.164,87	222.692,82	209.775,80	103.371,47	838.072,14
Sachmittel/Inv.	3.009,47	77.874,13	59.091,98	113.599,70	97.028,98	0,00	350.604,26
GESAMT	3.009,47	177.941,31	261.256,85	336.292,52	306.804,78	103.371,47	1.188.676,40

Abb. 13 Ausgaben aus IFTZ Zuschüssen der Zentralen Projektgruppen getrennt nach Personal, Sachmittel /Investitionen pro Jahr (die Einnahmen bleiben unberücksichtigt) und GESAMT

Gesamtausgaben IFTZ-Projekte – Core Facilities

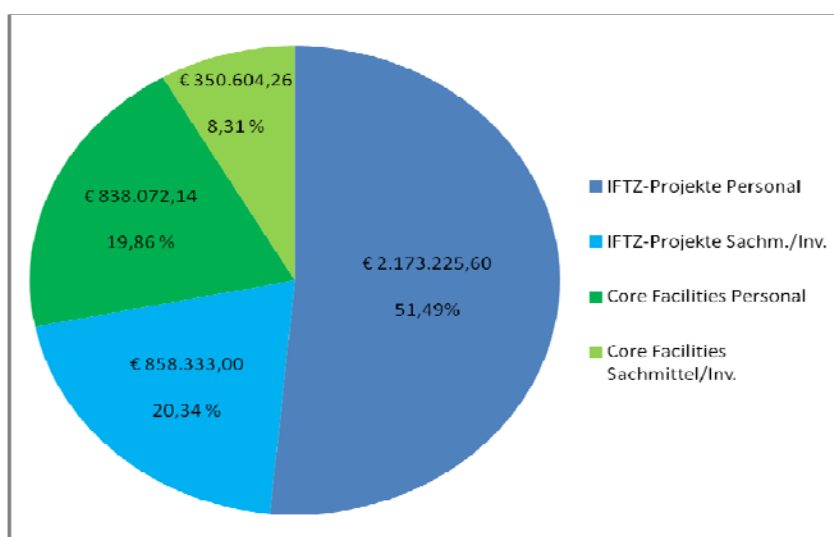


Abb. 14 Ausgaben bzw. Anteile der Ausgaben getrennt nach Personal und Sachmittel. Nicht aufgeführt wurden die Managementkosten, die über das Globalbudget abgewickelt wurden.

Danksagung:

Der Bericht wurde zusammengestellt durch das Servicecenter Forschung. Besonderer Dank an:

- Nadine Nössing, die die Berichte der Projektleiter/innen und den Bericht zusammengestellt hat.
- Reinhard Tschaut, der den Bericht Korrektur gelesen und die Finanzen zusammengefasst hat.

Dr. Peter Josten